

Received: 2007.07.09
Accepted: 2007.09.17
Published: 2007.10.15

Czynniki transkrypcyjne w powstawaniu i progresji czerniaka*

Transcription factors in the development and progression of melanoma

Karolina Lesiak, Małgorzata Sztiler-Sikorska, Małgorzata Czyż

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Czerniak (łac. *melanoma malignum*) jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z melanocytów, komórek barwnikowych skóry wytwarzających melaninę. Na powstanie i rozwój nowotworu mają wpływ zarówno czynniki środowiskowe jak i predyspozycje genetyczne. Poza wczesną interwencją chirurgiczną, brak jest skutecznych metod leczenia pacjentów z czerniakiem. Poznanie mechanizmów rozwoju nowotworu może doprowadzić do powstania nowych strategii leczenia. W artykule przedstawiono wybrane aspekty biologii molekularnej czerniaka ze szczególnym uwzględnieniem czynników transkrypcyjnych. Regulując ekspresję genów, białka te pełnią istotną rolę w procesach komórkowych, natomiast zaburzenia w ich funkcji mogą prowadzić do rozwoju chorób, w tym nowotworowych. W oparciu o najnowsze piśmiennictwo przedstawiono przyczyny oraz skutki zmian w ekspresji i/lub aktywności czynników transkrypcyjnych: MITF, NF-κB, AP-1, AP-2α, Notch, CREB, Ets-1, β-katenina/LEF/TCF, PAX3, Ski, Snail i STAT obserwowane w różnych fazach rozwoju czerniaka.

Słowa kluczowe: czerniak • przerzuty • czynniki transkrypcyjne • ekspresja genów • regulacja transkrypcji

Summary

Melanoma (*melanoma malignum*) is a malignant tumor derived from melanin-producing melanocytes. Both environmental factors and genetic predisposition are important in tumor development and progression. If not detected and removed early, it is very aggressive and unresponsive to current therapeutic approaches. Therefore, one of the major goals of melanoma research is to better understand cancer biology, which in turn might result in the development of novel treatment strategies. This article reviews selected aspects of the molecular biology of melanoma with an emphasis on describing the role of transcription factors. These regulatory proteins modulate the expressions of genes, and alterations in transcription factor function are associated with human diseases, including cancer. The transcription factors MITF, NF-κB, AP-1, AP-2α, Notch, CREB, Ets-1, LEF/TCF/β-catenin, PAX3, Ski, Snail, and STAT play important roles during the development and progression of melanoma. Both the causes and the consequences of changes in transcription factor expression and/or activity are described based on the most recent literature.

Key words: melanoma • metastasis • transcription factors • gene expression • transcriptional regulation

* Opracowano w ramach działalności statutowej Zakładu finansowanej przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (nr tematu: 503-1099-2).

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11353.pdf

Word count: 8648

Tables: –

Figures: 9

References: 148

Adres autorki: dr hab. Małgorzata Czyż, prof. UM, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: mczyk@csk.umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa; **AP-1** – czynnik transkrypcyjny (activating protein-1); **AP-2** – czynnik transkrypcyjny (activating enhancer-binding protein 2); **APC** – białko supresorowe, negatywny regulator szlaku transdukcji Wnt; **ATF-1** – czynnik transkrypcyjny (activating transcription factor 1); **Bax** – białko apoptotyczne należące do rodziny białek Bcl; **Bcl-2** – białko inhibitorowe apoptozy (B cell lymphoma antigen-2); **Bcl-X_L** – białko inhibitorowe apoptozy; **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (basic fibroblast growth factor); **BRAF** – protoonkogenna kinaza serynowo-treoninowa (*BRAF* – v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1); **c-Kit** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej; **c-Myc** – czynnik transkrypcyjny (cellular homologue to the transforming sequences of the avian myelocytomatosis retrovirus); **CRE** – region promotora DNA aktywowany z udziałem CREB (cyclic-AMP response element); **CREB** – czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP (cyclic-AMP response element-binding); **Erk1/2** – kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe (extracellular signal-regulated kinase 1/2); **Ets** – czynnik transkrypcyjny (E26 transformation-specific); **FAK** – kinaza ognisk adhezyjnych (focal adhesion kinase); **FHL-2** – białko regulatorowe szlaku Wnt/ β -katenina (four and half LIM domain); **Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra2)** – podjednostki czynnika transkrypcyjnego AP-1; **Gsk3 β** – kinaza (glycogen synthase kinase 3 β); **HES** – czynnik transkrypcyjny (hairy/enhancer-of-split); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **IGFBP** – białko typu 3 wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor binding protein 3); **IKK** – kompleks kinaz białkowych inhibitora I κ B (I κ B kinase complex); **IL** – interleukina; **I κ B** – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF κ B (inhibitor of NF kappa B); **JNK** – kinaza białka c-Jun (c-Jun N-terminal kinase); **Jun (c-Jun, JunB, JunD)** – podjednostki czynnika transkrypcyjnego AP-1; **KCREB** – „negatywny” wariant białka CREB; **LEF1** – czynnik transkrypcyjny (lymphoid-enhancing factor); **MAPK** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny (mitogen-activated protein kinase); **MCAM/MUC18** – cząsteczka adhezji komórkowej (melanoma cell adhesion molecule); **MEK** – kinaza kinaz MAP-Erk; **Mel-CAM** – cząsteczka adhezji/antygen obecny na powierzchni komórek czerniaka (melanoma cell adhesion molecule); **MITF** – czynnik transkrypcyjny (microphthalmia-associated transcription factor); **MMP** – metaloproteinaza macierzy (matrix metalloproteinase); **mTOR** – kinaza serynowo-treoninowa (mammalian target of rapamycin); **N-CoR** – korepresor receptora jądrowego (nuclear hormone receptor corepressor); **NF- κ B** – czynnik transkrypcyjny (nuclear factor kappa B); **N^{ic}** – podjednostka wewnątrzkomórkowa receptorowego białka Notch, właściwy czynnik transkrypcyjny (intracellular subunit); **NRAS** – onkogen (neuroblastoma RAS); **Nr-CAM** – neuronalna cząsteczka adhezyjna (neuronal cell adhesion molecule); **p21^{WAF1}** – białko regulatorowe cyklu komórkowego o masie cząsteczkowej 21kDa, inhibitor kinaz cyklinozależnych; **p300/CBP** – koaktywator transkrypcji (p300/cyclic-AMP-response-element binding protein); **p53** – białko o masie cząsteczkowej 53kDa, supresor nowotworów; **PAI-1** – inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (plasminogen activator inhibitor-1); **PAX3, PAX6** – czynniki transkrypcyjne (paired box 3, 6); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet derived growth factor); **PIAS** – inhibitory STAT (protein inhibitors of activated STATs); **PTEN** – białko supresorowe, fosfataza kinazy PI3K (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10); **Raf** – kinaza serynowo-treoninowa (Ras-activated factor); **Ras** – rodzina kinaz protoonkogennych; **RGP** – pierwotna faza wzrostu powierzchniowego (radialnego) komórek czerniaka (radial growth phase); **RhoA** – kinaza należąca do rodziny białek G (ras homolog gene family, member A); **SCF** – cytokina wiążąca c-Kit (stem cell factor); **siRNA** – małe interferujące RNA (small interfering RNA); **Ski** – czynnik transkrypcyjny (Sloan-Kettering institute protoonkogen); **SnoN** – czynnik transkrypcyjny (ski-related novel oncogene); **SPARC** – osteonektyna (secreted protein acidic and rich in cysteines); **STAT** – czynnik transkrypcyjny, transduktor sygnału i aktywator

transkrypcji (signal transducers and activator of transcription); **TGF- α/β** – transformujący czynnik wzrostu α/β (transforming growth factor α/β); **TGF- β RI/II** – receptor typu I/II białka TGF- β (transforming growth factor receptor type I/II); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α); **uPA** – urokinazowy aktywator plazminogenu (urokinase-type plasminogen activator); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (vascular endothelial growth factor); **VGP** – faza wzrostu pionowego (wertykalnego) komórek czerniaka (vertical growth phase); **Wnt** – białko sekrecyjne typu Wingless (Wingless-type).

WSTĘP

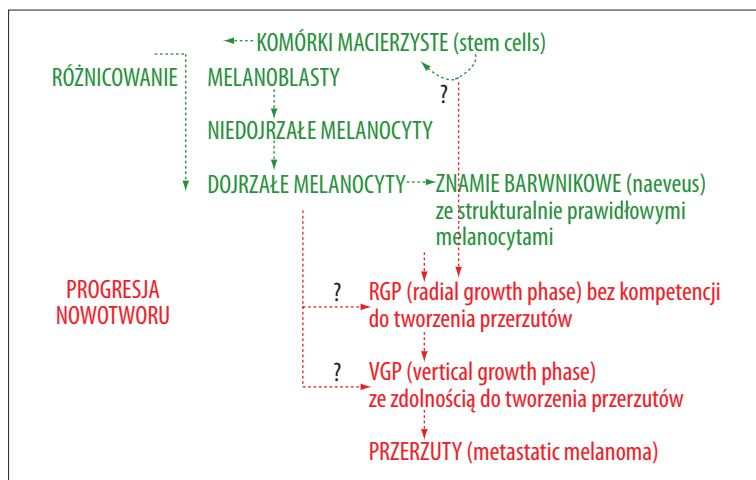
Melanocyty, komórki pochodzące z grzebienia nerwowego (neural crest) są komórkami barwnikowymi umiejscowionymi w warstwie podstawnej naskórka oraz w torebkach włosowych. Wytwarzają melaninę, pigment nadający barwę skórze i włosom. Melanina gromadzona jest w organelach zwanych melanosomami. Są one eksportowane z melanocytów do keratynocytów. Różnice w barwie skóry czy włosów wynikają głównie z różnic w ilości, wielkości, kompozycji i rozkładzie melanosomów, podczas gdy liczba melanocytów w zasadzie pozostaje stała. Melanocyty znajdują się pod ścisłą kontrolą keratynocytów. W odpowiedzi na promieniowanie ultrafioletowe (UV) keratynocyty wydzielają substancje, które regulują proliferację, różnicowanie, oraz ruchliwość melanocytów, a także stymulują melanocyty do wytwarzania melaniny, co w konsekwencji powoduje powstanie silniejszego, ochronnego zabarwienia skóry. W ten sposób melanocyty chronią komórki skóry przed uszkodzeniami spowodowanymi promieniowaniem UV.

Melanocyty są także komórkami, z których wywodzą się komórki czerniaka skóry, jednego z najgroźniejszych nowotworów. Wczesna diagnoza i interwencja chirurgiczna, gdy czerniak znajduje się w początkowych fazach rozwoju, daje pacjentom szansę na całkowite wyleczenie. Natomiast czerniak w fazie przerzutów uważany jest za chorobę nieuleczalną, a pacjenci z przerzutami do narządów wewnętrznych na ogół nie odpowiadają na żadną ze znanych terapii przeciwnowotworowych i tylko sporadycznie odnotowuje się przypadki wyzdrowienia. Z tych powodów bardzo istotne jest poszukiwanie przyczyn powstania nowotworu, markerów poszczególnych faz rozwoju oraz skutecznych terapii.

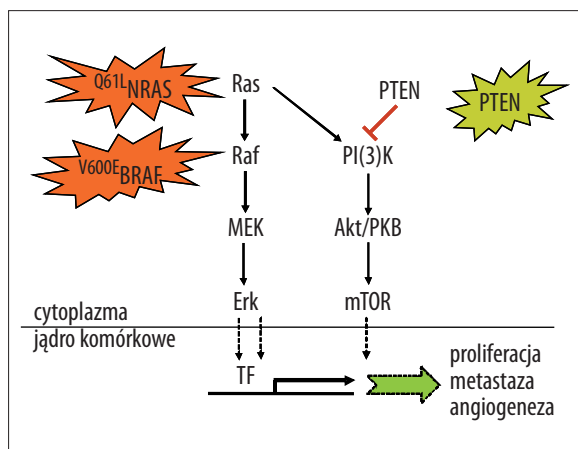
U podłoża rozwoju czerniaka leżą zarówno predyspozycje genetyczne jak i czynniki środowiskowe [71]. Mutacje w genach odpowiedzialnych za proliferację i apoptozę, zmiany epigenetyczne [101], wytwarzanie autokrynych czynników wzrostu, utrata zdolności do adhezji, to czynniki, które wywołują zmiany w szlakach przekazywania sygnałów w melanocytach i uwalniają je spod ścisłej kontroli keratynocytów [45]. Kolejne przejścia od zmian dysplastycznych do czerniaka pierwotnego o wzroście powierzchniowym (RGP – radial growth phase) bez kompetencji do tworzenia przerzutów, następnie o wzroście wertykalnym (VGP – vertical growth phase) z możliwością tworzenia przerzutów i wreszcie powstawanie ognisk przerzutów w węzłach chłonnych i w odległych narządach (ryc. 1), wymagają wielu zmian na poziomie molekularnym. Niektóre z nich są brane pod uwagę jako markery progresji nowotworu, aczkolwiek nie ma jeszcze molekularnych markerów czerniaka, które miałyby większą wartość prognostyczną niż konwencjonalna klasyfikacja histologiczna [13].

W trakcie rozwoju czerniaka pojawia się wiele zmian w szlakach sygnałowych (ryc. 2). W melanocytach szlak sygnałowy Ras/Raf/MEK/Erk jest aktywowany przez czynniki wzrostu, takie jak SCF (stem cell factor), FGF (fibroblast growth factor) i HGF (hepatocyte growth factor) [12]. Proliferacja melanocytów wymaga współdziałania wielu czynników wzrostu, a aktywacja kinazy Erk (extracellular signal-regulated kinase) przez pojedyncze czynniki jest słaba i przejściowa.

W czerniaku, w ponad 90% przypadków aktywność kinazy Erk jest podwyższona [24]. Kinaza ta jest aktywowana przez autokryne czynniki wzrostu [105]. Dużo większy udział w stymulacji aktywności Erk ma mutacja w NRAS, jednym z trzech ludzkich genów Ras. Gen ten jest zmu-



Ryc. 1. Różnicowanie komórek w kierunku melanocytów oraz progresja czerniaka

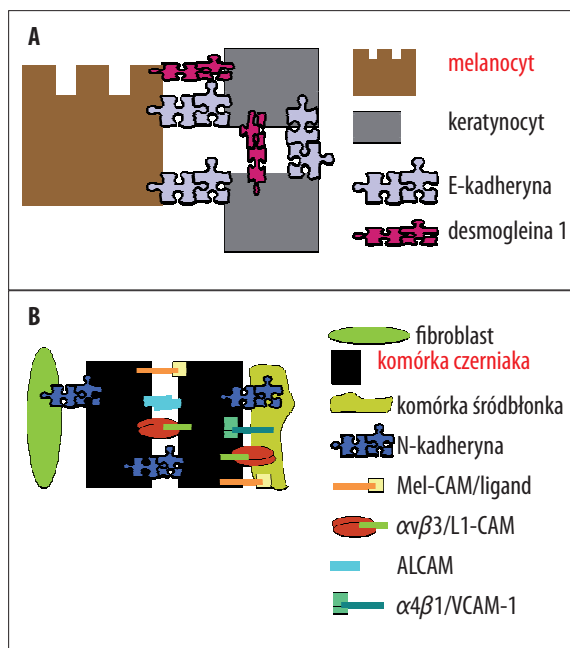


Ryc. 2. Onkogenne mutacje w genach kodujących białka szlaków sygnałowych występujące w komórkach czerniaka. Uwzględniono tylko najczęściej występujące mutacje $Q61L$ NRAS, $V600E$ BRAF oraz PTEN. Mutacje w NRAS i BRAF oraz NRAS i PTEN wzajemnie się wykluczają, podczas gdy mutacja w BRAF i mutacja w PTEN często występują razem (TF – czynniki transkrypcyjne)

towany w 15–30% przypadków czerniaka skóry, głównie przez podstawienie prowadzące do zamiany leucyny na glutaminę w pozycji 61 ($Q61L$) [28,40]. Jednak najczęściej odnotowywaną w komórkach czerniaka zmianą genetyczną (50–70%) skutkującą zaburzeniami w drodze sygnałowej Ras/Erk jest mutacja w BRAF, genie z grupy Raf. Stwierdzono ponad 30 możliwych mutacji w tym genie, przy czym zdecydowanie przeważa zamiana waliny na kwas glutaminowy w pozycji 600 ($V600E$) [28,40]. $V600E$ BRAF konstytutywnie aktywując szlak sygnałowy Erk, stymuluje proliferację komórek i powoduje przyrost masy guza [42]. $V600E$ BRAF ma również swój udział w neoangiogenezie guza przez stymulację sekrecji VEGF [108].

Innym szlakiem sygnałowym istotnym w rozwoju czerniaka jest Ras-PI(3)K-Akt/mTOR, regulujący proliferację i migrację komórek. W 3% przypadków czerniaka z miejsc przerzutów występują mutacje w genie kodującym PI(3)K (phosphoinositide 3-kinase) [91]. Mutacje są obserwowane również w genach kodujących białka funkcjonalnie powiązane z PI(3)K, np. w PTEN [40,135], czy w genie kodującym kinazę Akt [112]. Badając poziom ekspresji Akt w biopsjach pobranych z różnych faz rozwoju czerniaka, zaobserwowano wzrost aktywności Akt przy przejściu od znamion barwnikowych do pierwotnego czerniaka oraz od pierwotnego czerniaka do przerzutów. Wysoki poziom tej kinazy odnotowano w 17% przypadków znamion łagodnych, w 43% znamion dysplastycznych, 49% pierwotnego czerniaka i 77% czerniaka z miejsc przerzutów [27].

Stosując trójwymiarowe hodowle czerniaka wykazano, że oba szlaki sygnałowe, PI(3)K oraz Erk muszą zostać zablokowane, aby mogła być zahamowana proliferacja [111]. Stwierdzono również, że mutacje w NRAS i BRAF oraz NRAS i PTEN wzajemnie się wykluczają, podczas gdy mutacja w BRAF i mutacja w PTEN, prowadząca do inaktywacji fosfatazy, występują razem w ponad 20% przypadków [120,122]. Aktywność BRAF i PI(3)K zależy od aktywności Ras. Stąd uważa się, że w obecności onkogen-



Ryc. 3. Progresja czerniaka obserwowana jako zdolność do tworzenia przerzutów wynika m.in. ze zmian na poziomie interakcji międzykomórkowych. Zdolność do adhezji i migracji jest inna w melanocytach i komórkach czerniaka. Melanocyty pozostają związane z keratynocytami i znajdują się pod ich kontrolą; **A.** Adhezja między melanocytami i keratynocytami zachodzi z udziałem E-kadheryny i desmogleiny 1. W komórkach czerniaka następuje ograniczenie ekspresji E-kadheryny i wzrost ekspresji N-kadheryny. **B.** Powoduje to utratę kontaktu z keratynocytami i pojawienie się możliwości tworzenia skupisk komórek czerniaka oraz oddziaływań komórek czerniaka z fibroblastami i komórkami śródbłonna. Oddziaływanie między komórkami czerniaka i śródbłonna są wzmacniane przez utworzenie połączeń integrzyn $\alpha\beta3$ z L1-CAM, $\alpha4\beta1$ z VCAM-1 oraz między Mel-CAM komórek czerniaka i ligandem na powierzchni komórek śródbłonna. Te nowe interakcje międzykomórkowe umożliwiają migrację komórek czerniaka do odległych narządów

nego NRAS, dodatkowe mutacje w BRAF i PTEN nie są konieczne, aby wystąpiła transformacja nowotworowa.

W rozwoju czerniaka są obserwowane zmiany na poziomie interakcji komórkowych. Keratynocyty kontrolują wzrost melanocytów i ich funkcjonowanie za pomocą skomplikowanego systemu parakrynnych czynników wzrostu i cząsteczek adhezyjnych. Zmiany występujące w szlakach sygnałowych i ekspresji genów prowadzą do zaburzeń na poziomie interakcji komórkowych, zmian w potencjale proliferacyjnym melanocytów i przyczyniają się do przekształcenia melanocytów w inwazyjne komórki czerniaka. Powstające komórki nowotworowe uwalniają się spod kontroli keratynocytów w wyniku:

- (1) obniżenia poziomu receptorów istotnych dla interakcji z keratynocytami, w tym: E-kadheryny, P-kadheryny, desmogleiny, koneksyn;
- (2) podwyższenia poziomu receptorów i cząsteczek sygnałowych, które nie występują w melanocytach, ale są ważne dla interakcji między komórkami czerniaka oraz między komórkami czerniaka i fibroblastami lub

- komórkami śródbłonna, np. N-kadheryny, Mel-CAM i ZO-1 (zonula occludens protein-1);
- (3) utraty połączenia z warstwą podstawną naskórka przez zaburzenia w ekspresji białek integrynowych [46]. Zmiany na poziomie interakcji komórkowych schematycznie przedstawiono na rycinie 3.

CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE W POWSTAWANIU I PROGRESJI CZERNIAKA

Zaburzenia w ekspresji i aktywności białek regulatorowych, takich jak receptory, kinazy i fosfatazy są częstą przyczyną wystąpienia zmian prowadzących do rozwoju nowotworu. Badając progresję czerniaka odnotowano również wiele zmian na poziomie ekspresji i aktywności czynników transkrypcyjnych. Zmiany te mogą być zarówno przyczyną, jak i skutkiem zmian obserwowanych w komórkowych szlakach sygnałowych i relacjach między komórką i jej mikrootoczeniem.

MITF

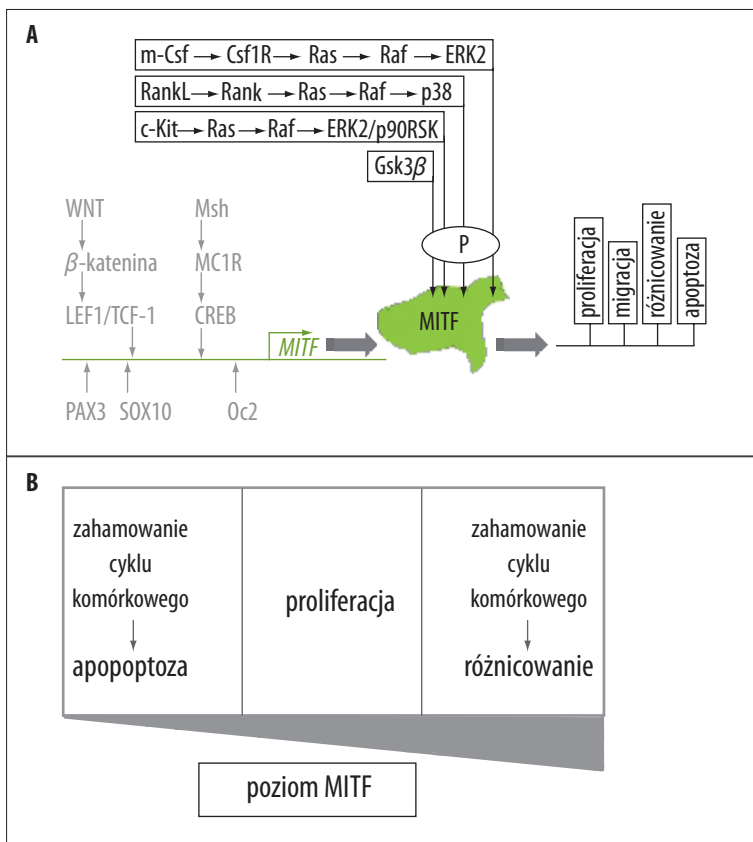
MITF (microphthalmia-associated transcription factor) jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym niezbędnym w powstawaniu melanocytów w rozwoju embrionalnym, na wszystkich etapach procesu różnicowania oraz w prawidłowym funkcjonowaniu dojrzałych komórek [113,132]. Białko to, zawierające motyw helisa-pętla-helisa z suwakiem leucynowym, funkcjonuje jako dimer wiążący się w regionach promotorowych wielu genów kodujących białka odpowiedzialne za te procesy. Istnieją 4 izoformy MITF: MITF-A, -C, -H i -M. Ekspresja *MITF* jest kontrolowana przez wiele czynników. Najlepiej zbadana jest ekspresja *MITF-M*. W promotorze tego genu znajdują się m.in. miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych PAX3 [129], SOX10 [126], LEF-1/TCF [72], CREB [10], a także MITF (ryc. 4A). Różnorodność czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za ekspresję *MITF* wskazuje na złożoność mechanizmów kontrolnych oraz możliwość regulacji tej ekspresji przez wiele szlaków sygnałowych. Również aktywność białka MITF jest ściśle regulowana. Aktywność wiążąca DNA i zdolność do transaktywacji jest wzmocniana przez fosforylację seryny w pozycji 298 przez kinazę Gsk3β [67] oraz seryny w pozycji 73 przez Erk2. Stabilność MITF jest regulowana przez fosforylację w tej samej pozycji (Ser73) oraz seryny w pozycji 409 przez RSK (ribosomal s6 kinase). Zmiany te powstają w wyniku aktywacji receptora c-Kit przez SCF. Fosforylacja prowadzi do ubikwitylacji białka MITF i jego degradacji [136]. Efektywność MITF jako czynnika transkrypcyjnego w dużym stopniu zależy od współdziałania z innymi białkami jądrowymi, do których należą m.in. koaktywator p300/CBP, retinoblastoma (Rb), czynniki transkrypcyjne PAX6 i LEF1, Fos (podjednostka czynnika transkrypcyjnego AP-1) oraz inhibitor PIAS3 [113]. Szczególnie interesującym mechanizmem regulacyjnym jest interakcja MITF z PIAS3, który wprowadza grupy SUMO (small ubiquitin-related modifier) do czynników transkrypcyjnych, w tym również do MITF [127].

Czynnik transkrypcyjny MITF rozpoznaje sekwencję AGTCATGTG nazywaną „M-box”. Wiążąc ten motyw reguluje ekspresję genów kodujących m.in. tyrozynazę, Tyrp1 (tyrosinase-related protein-1), Dct, QNR71,

Silver/GP100, receptor melanokortyny 1 oraz MART-1 (melan-A) [4,32,39,75]. Wynika z tego, że MITF jest odpowiedzialny za różnicowanie prowadzące do powstania melanocytów. Obecność miejsc wiązania MITF w promotorach genów, takich jak *SLUG* czy *TBX2* wskazuje na rolę tego czynnika w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za migrację melanoblastów i melanocytów [125].

MITF jest jednak odpowiedzialny nie tylko za prawidłowy rozwój melanoblastów i ich różnicowanie w kierunku melanocytów, ale jest także istotny w powstawaniu stanów patologicznych, w tym w rozwoju czerniaka. Odpowiada on za ekspresję genów uważanych za markery tego nowotworu. Czynnik ten ma znaczenie w proliferacji komórek czerniaka oraz w rozwoju inwazyjności tego nowotworu [18]. Czynnik transkrypcyjny MITF, uczestnicząc w regulacji proliferacji i migracji zarówno melanoblastów, jak i komórek czerniaka, jest przykładem białka regulatorowego, które jest istotne zarówno w prawidłowym rozwoju, jak i w powstawaniu zmian nowotworowych. Wydaje się, że o roli MITF decyduje poziom tego czynnika transkrypcyjnego w komórce. Ekspresja MITF w komórkach czerniaka jest wyraźnie niższa niż w melanocytach. Podwyższenie poziomu MITF hamuje proliferację komórek czerniaka, nawet w obecności onkogennej BRAF [131]. Bardzo wysoki poziom MITF oznacza zahamowanie rozwoju czerniaka [107]. Wynika z tego, że w zależności od ilości tego czynnika transkrypcyjnego, w komórkach uruchamiane są różne procesy. Wysoki poziom oznacza zahamowanie cyklu komórkowego i różnicowanie [75], niższy stymuluje proliferację, podczas gdy bardzo niski poziom MITF wywołuje zahamowanie cyklu komórkowego i apoptozę (ryc. 4B).

Zmiana poziomu MITF jest niewystarczająca, aby wywołać transformację nowotworową. Czynnik ten jest uważany za swoisty dla melanocytów onkogen, ale tylko jeżeli współdziała z białkami onkogennymi, np. z ^{V600E}BRAF. Wykazano, że MITF współuczestniczy z ^{V600E}BRAF w regulacji ekspresji m.in. podjednostki katalitycznej telomerazy TERT oraz kinazy Cdk4 [38]. Stwierdzono również, że konstytutywna aktywacja Erk przez ^{V600E}BRAF wywołana w melanocytach powoduje obniżenie poziomu aktywnego białka MITF w wyniku jego degradacji [38,131,136]. Jednak wydaje się, że w komórkach czerniaka został rozwinięty mechanizm przeciwdziałający nadmiernemu, mogącemu prowadzić do apoptozy, obniżeniu poziomu MITF. Wykazano mianowicie, że w 10–16% przypadków przerzutów czerniaka, w których *BRAF* jest zmutowany, *MITF* ulega amplifikacji [38]. Chociaż liczba kopii genu może wzrosnąć nawet do 10–100, poziom białka MITF rośnie mniej niż dwukrotnie w porównaniu z poziomem w komórkach, w których nie wystąpiła amplifikacja genu. Potwierdza to wcześniejsze spostrzeżenie, że poziom MITF jest bardzo istotny dla pełnionych przez ten czynnik transkrypcyjny funkcji. Biorąc pod uwagę, że tylko 10–16% przypadków czerniaka z mutacjami w *BRAF* zawiera amplifikację *MITF*, otwartym pozostaje pytanie, w jaki sposób w pozostałych przypadkach tego nowotworu (84–90%) możliwe jest zapobieganie nadmiernemu obniżeniu poziomu MITF. Jeden z proponowanych mechanizmów zakłada udział β-keniny, transkrypcyjnego koaktywatora, który może indukować ekspresję *MITF* za pośrednictwem wiązania czynnika transkrypcyjnego LEF1/TCF-1 w promotorze *MITF* [116]. Chociaż mutacje stabilizujące β-keninę



Ryc. 4. Czynniki transkrypcyjny MITF – struktura i funkcja; **A.** Ekspresja i aktywacja czynnika transkrypcyjnego MITF jest wynikiem aktywacji wielu szlaków sygnałowych, które uaktywniają czynniki transkrypcyjne wiążące się w promotorze *MITF*, a także wywołują modyfikacje posttranslacyjne w cząsteczce MITF. Czynniki transkrypcyjny MITF z kolei jest odpowiedzialny za transkrypcję wielu genów związanych z różnicowaniem, proliferacją, migracją i śmiercią komórek. **B.** Wymienione procesy komórkowe są uruchamiane w zależności od poziomu aktywnego białka MITF. Wysoki poziom MITF hamuje proliferację i uruchamia różnicowanie. Ten proces przeważa w prawidłowym rozwoju melanocytów. W czerniaku, konstytutywna aktywacja ERK przez onkogenny BRAF powoduje obniżenie poziomu MITF i przewagę proliferacji nad różnicowaniem. Zbyt niski poziom MITF wywołuje apoptozę

są rzadkie w czerniaku [92], nadmierne gromadzenie aktywnej β-kateniny w jądrze i cytoplazmie zostało stwierdzone w 28% przypadkach przerzutów czerniaka [99]. Mechanizmy odpowiedzialne za precyzyjną regulację poziomu MITF w komórkach czerniaka nie są do końca poznane i trwają intensywne poszukiwania białek uczestniczących w tej regulacji.

NF-κB

Czynnik transkrypcyjny NF-κB (nuclear factor kappa B) obejmuje homo- i heterodimery tworzone przez 2 spośród 5 podjednostek należących do rodziny białek Rel: RelA/p65, RelB, cRel, p105/p50 (NF-κB1), p100/p52 (NF-κB2). W zależności od składu podjednostkowego NF-κB, czynnik ten może pełnić funkcję aktywatora np. heterodimery zbudowane z białek RelA, RelB lub cRel lub represora transkrypcji np. homodimery p50 i p52. Główną formą NF-κB w komórce jest heterodimer RelA/p50. Cechą wspólną czynników transkrypcyjnych NF-κB jest obecność na N-końcu domeny homologii Rel (RHD), odpowiedzialnej za dimeryzację, interakcje z inhibitorami IκB, lokalizację jądrową i wiązanie w obrębie regionów regulatorowych genów. Białka RelA, RelB, cRel syntetyzowane są w formie dojrzalej, natomiast podjednostki p50 i p52 jako białka prekursorowe p105 i p100. W komórkach niestymulowanych, czynniki NF-κB połączone są z białkami inhibitorowymi IκB (inhibitor of NF-κB): IκBα, IκBβ, IκBε, Bcl-3, IκBδ i IκBγ. Powinowactwo inhibitorów do poszczególnych podjednostek NF-κB jest różne. Na przykład, białko IκBα tworzy stabilne kompleksy z RelA/p50 w porównaniu z jego słabym powinowactwem do homodimerów RelA.

Czynnik NF-κB jest aktywowany przez sygnały zewnątrzkomórkowe, takie jak cytokiny, mitogeny, czynniki wzrostu, infekcje wirusowe i bakteryjne oraz czynniki fizyczne, m.in. promieniowanie UV. Uwolnienie NF-κB z kompleksu z inhibitorem, jego aktywacja i translokacja do jądra komórkowego jest konsekwencją fosforylacji inhibitora przez kinazy IKK i jego degradacji. Główny szlak aktywacji NF-κB zależy od kinazy IKKβ, której celem są inhibitory IκBα, IκBβ, IκBγ. IKKβ jest aktywowana w odpowiedzi na czynnik martwicy nowotworów (TNF-α), interleukinę 1 (IL-1), lipopolisacharydy (LPS), oraz dwuniciowe RNA. Z kolei kinaza IKKα selektywnie aktywuje kompleksy RelB/p52 przez indukcję proteolizy prekursora p105. Szlak ten jest aktywowany przez białko BAFF (B cell-activating factor from the tumor necrosis factor family), RANKL (receptor activator of NF-κB ligand), immunomodulator CD40 (cluster of differentiation 40) lub limfotoksynę β (LTβ).

Aktywny NF-κB rozpoznaje 10 nukleotydową sekwencję zwaną miejscem κB: 5'GGGRNNYYCC'3, gdzie R oznacza purynę, N jakąkolwiek zasadę, a Y pirymidynę. Miejsca κB odnajdywane są w regionach promotorowych genów, których produkty białkowe są zaangażowane m.in. w procesy odpowiedzi immunologicznej, proliferacji oraz apoptozy [26,34,47,51].

W hodowlach komórkowych czerniaka, czynnik transkrypcyjny NF-κB jest konstytutywnie aktywny, co może być następstwem zmian w mechanizmach regulatorowych działających na każdym etapie szlaku IKK/IκB/NF-κB. Stwierdzono, że w komórkach czerniaka kinazy IKKα

i IKK β wykazują nawet 14-krotnie wyższą aktywność niż w prawidłowych melanocytach [142]. Dowiedziono również, że w cytoplazmie komórek nowotworowych poziom podjednostek RelA, cRel, formy prekursorowej i dojrzalej białka p50 oraz inhibitorów IkB α , IkB β i IkB ϵ jest wyższy niż w melanocytach prawidłowych [30,82]. Stosując metody immunohistochemiczne, zaobserwowano istotną różnicę w poziomie białka NF- κ B w preparatach wykonanych z biopsji czerniaka pobranych od pacjentów w różnych fazach rozwoju choroby. Po wyznakowaniu preparatów przeciwciałami swoistymi dla podjednostki RelA, wykazano wyższy poziom tego białka w komórkach czerniaka i melanocytach znamion łagodnych w porównaniu z melanocytami skóry prawidłowej. Także poziom ufosforylowanej podjednostki RelA w białku NF- κ B był wyższy w tych komórkach. Zmianom w poziomie podjednostki RelA towarzyszył podwyższony poziom inhibitora IkB α [81]. Wykryto również rosnący, w miarę progresji czerniaka, poziom podjednostki p105/p50. Istotne różnice w poziomie p105/p50 zaobserwowano w komórkach znamion dysplastycznych w porównaniu ze znamionami łagodnymi. Poszukiwano związku między ilością tego białka w komórce a rozwojem czerniaka. W badaniach *in vitro* określono potencjalny wpływ podjednostki p50 na właściwości migracyjne komórek czerniaka. Transfekcja komórek pochodzących z przerzutów czerniaka wektorem ekspresyjnym niosącym gen *NF- κ B1* (kodujący prekursor podjednostki p50) i indukowana nadekspresja tego genu powodowała nasilenie migracji komórek czerniaka. Ponadto, obniżenie w komórkach czerniaka poziomu białka prekursorowego p105 (i w konsekwencji jego formy dojrzalej, p50) metodą wyciszenia genu za pomocą siRNA, spowodowało spadek ich potencjału migracyjnego. W badaniach przeprowadzonych na komórkach czerniaka transfekowanych *NF- κ B1* zwrócono również uwagę na podwyższoną aktywność białek RhoA i Rock w porównaniu z komórkami kontrolnymi, do których wprowadzono „pusty” wektor. Biorąc pod uwagę to, że białka rodziny Rho zaangażowane są m.in. w reorganizację cytoszkieletu podczas migracji komórek, dowiedziono, że dimery NF- κ B z udziałem podjednostki p50 pełnią ważną rolę w tych procesach i mogą sprzyjać naciekaniu przez komórki czerniaka głębszych warstw skóry. W związku z tym próbowano określić status podjednostki p50 jako czynnika prognostycznego w grupie pacjentów wysokiego ryzyka, tzn. takich, u których głębokość naciekania guza wynosi >2 mm. Stosując analizę Kaplana-Meiera wykazano odwrotną zależność między dużą zawartością podjednostki p50 w jądrach komórkowych czerniaka, a procentem szans na 5-letnie przeżycie [37].

Konsekwencje podwyższonej aktywności szlaku IKK/IkB/NF- κ B mogą być bardzo różnorodne i sprzyjać wielu procesom związanym z transformacją nowotworową. W melanocytach p16^{INK4a}/p14^{ARF}-negatywnych, do których wprowadzono konstrukt zawierający gen *RAS* z obecną w kodonie 12 aktywującą mutacją punktową (^{V12}HRAS), brak białek supresorowych p16^{INK4a} i p14^{ARF} i konstytutywna aktywność onkogenu HRAS powodowały wzrost aktywności NF- κ B i podwyższoną proliferację komórek. Dalsze badania *in vitro* i *in vivo* dowiodły, że ^{V12}HRAS inicjując transformację nowotworową w melanocytach, do swojej aktywności wymaga obecności aktywnych dimerów zawierających podjednostkę RelA. Stwierdzono, że aktywacja tych dimerów zachodzi za pośrednictwem indukcji

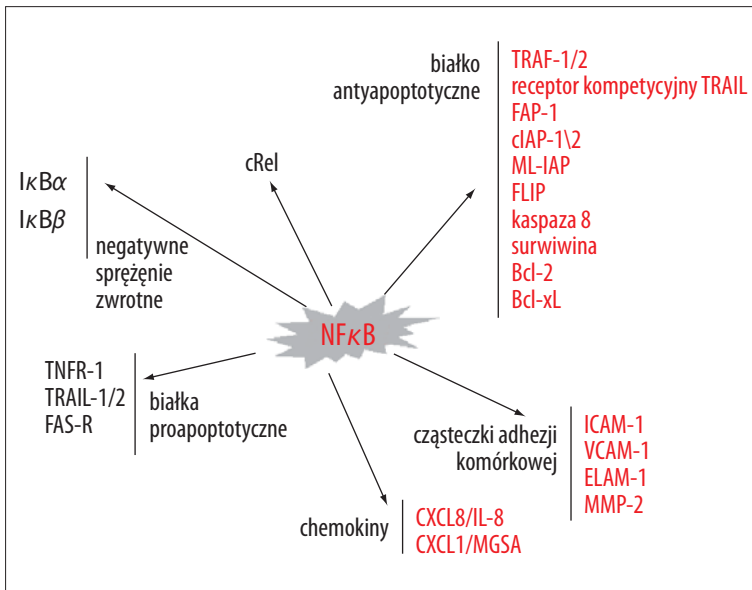
kinaz IKK przez ^{V12}HRAS. Ponadto, po zahamowaniu ekspresji IKK α i IKK β znacznie obniżył się potencjał proliferacyjny badanych komórek [141]. Z kolei w hodowlach melanocytów, w których obecna była mutacja aktywująca kinazę BRAF, czynniki wzrostu powodowały podwyższenie poziomu proliferacji.

Inhibicja szlaku Raf/MEK/Erk prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy. Jednak w badaniach *in vitro* na komórkach czerniaka, w których zablokowano konstytutywnie aktywny szlak Ras/Raf/MEK/Erk i które potraktowano czynnikiem TNF- α , zaobserwowano podwyższoną aktywację dimerów RelA/p50, obniżony poziom apoptozy i wzrost proliferacji komórek. Onkogenne białko BRAF i jego kinazy efektorowe są potencjalnymi celami terapii, zwłaszcza, że mutacje aktywujące ^{V600E}BRAF są obecne w około 70% przypadków czerniaka. Duża aktywność NF- κ B w komórkach czerniaka z mutacją aktywującą BRAF i obecność w podścielisku nowotworu makrofagów, które mogą być głównym źródłem TNF- α , mogą być więc dla pacjenta negatywnymi czynnikami prognostycznymi. Leczenie w takim przypadku wymagać może nie tylko zastosowania inhibitorów białek Raf/MEK/Erk, ale dodatkowo inhibitorów szlaków uruchamianych przez TNF- α (tumor necrosis factor alfa) i/lub NF- κ B [43].

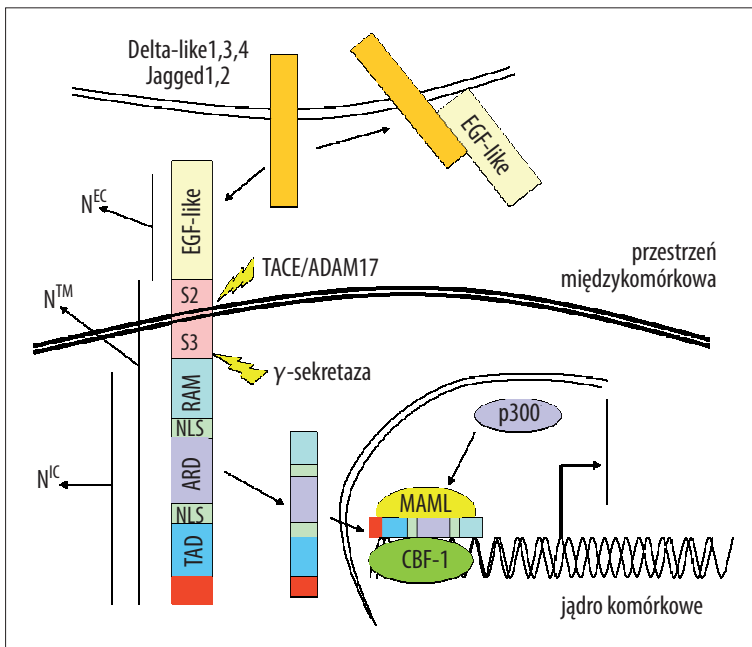
W prawidłowych melanocytach i wczesnych stadiach czerniaka, NF- κ B indukuje ekspresję receptorów, takich jak TNFR-1, TRAILR-1/2 i FAS-R, z którymi wiążą się białka stymulujące apoptozę (ryc. 5). Jednak w czerniaku inwazyjnym NF- κ B staje się czynnikiem antyapoptotycznym inicjując ekspresję białek, m.in. białka adaptorowego TRAF-1/2, receptora kompetycyjnego TRAIL czy fosfatazy FAP-1. NF- κ B aktywuje również geny białek ważnych dla przeżycia komórki, takich jak: inhibitory cIAP, FLIP i ML-IAP, kaspaza 8, surwiwina, Bcl-2 i Bcl-X_L. Podjednostką NF- κ B, która obniża wrażliwość komórek nowotworowych na apoptozę jest RelA. Z kolei rolę podjednostki proapoptotycznej pełni cRel. Anty- lub proapoptotyczna aktywność NF- κ B zależy więc od względnego poziomu aktywnych podjednostek w komórce [2,21,35,50].

W miarę rozwoju czerniaka komórki nowotworowe nabywają zdolności do migracji, intrawazacji i w następstwie do tworzenia przerzutów. NF- κ B w komórkach czerniaka indukuje ekspresję cząsteczek adhezji komórkowej, takich jak: ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 i metaloproteinaz np. MMP-2. Z kolei białka te, pośrednicząc w interakcjach między komórkami czerniaka a fibroblastami czy komórkami śródbłonna oraz ułatwiając komórkom nowotworowym poruszanie się w obrębie podścieliska nowotworu, nadają im właściwości silnie inwazyjne [2,16]. Ponadto, czynnik NF- κ B indukuje ekspresję białek zaangażowanych w procesy neowaskularyzacji guza, m.in. chemokin CXCL8/IL8 i CXCL1/MGSA, metaloproteinazy MMP-2 czy cytokiny VEGF [2,16]. Podwyższona liczba receptorów GPCR na powierzchni komórek czerniaka umożliwia tym białkom autokrynnie uruchamianie szlaków przekazywania sygnału, takich jak: PI(3)K/Akt czy MAPK, których białkiem docelowym jest m.in. NF- κ B [124].

Rozwój i progresja nowotworu jest m.in. wynikiem niekontrolowanej proliferacji komórek, zakłócenia procesów prowadzących do ich programowanej śmierci, nabywania



Ryc. 5. Czynniki transkrypcyjny NF-κB aktywuje ekspresję wielu różnych białek. W komórkach prawidłowych i wczesnych stadiach czerniaka NF-κB indukuje ekspresję własnych podjednostek i inhibitorów, utrzymując stały poziom w komórkach. Wpływając na ekspresję wielu genów, pełni rolę czynnika transkrypcyjnego zachowującego w komórkach równowagę między procesami przeżywalności i apoptozy. W progresji czerniaka wzmocnieniu ulega aktywność NF-κB prowadząca do indukcji ekspresji białek (zaznaczonych czerwoną czcionką), związanych z rozwojem nowotworu



Ryc. 6. Szlak przekazywania sygnału Notch i ekspresja docelowych białek. Aktywacja szlaku następuje po związaniu liganda z receptorem Notch. Połączenie to inicjuje zmiany konformacyjne w strukturze Notch, odsłaniające miejsca wrażliwe na cięcie przez proteazy TACE/ADAM17 i γ-sekretazę. Kontrolowana przez te enzymy proteoliza prowadzi do uwolnienia aktywnego fragmentu N^C, będącego właściwym czynnikiem transkrypcyjnym. W jądrze komórkowym Notch uruchamia ekspresję wielu genów. Nadmierna aktywacja Notch może prowadzić do podwyższenia poziomu białek zaangażowanych w progresję czerniaka m.in. HES, HRT/HEK. Na ryc. zaznaczono dodatkowo motywy strukturalne receptora Notch niezbędne do jego aktywności jako czynnika transkrypcyjnego: domenę transaktywacji transkrypcji (TAD), domenę wiążącą białka CAF-1/RBP-Jκ (RAM) i białka koaktywatorowe (ARD) oraz sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS)

przez nie zdolności do migracji oraz możliwości wpływu na mikrośrodowisko, tak aby zapewnić sobie jak najkorzystniejsze warunki wzrostu. Produkty białkowe genów uruchamianych przez NF-κB aktywnie biorą udział w kontroli tych procesów, stąd rosnąca i konstytutywna aktywność tego czynnika w miarę progresji czerniaka sprzyja jego rozwojowi.

Notch

Szlaki sygnałowe z udziałem czynnika transkrypcyjnego Notch regulują procesy związane z nabywaniem przez komórki określonego fenotypu podczas ich różnicowania i dojrzewania, kontrolują proliferację, przeżywalność i interakcje między komórkami. Zarówno ligandy, u ssaków: Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4, Jagged 1 i Jagged

2, jak i receptory: Notch 1 do 4 są integralnymi białkami błony komórkowej. Na powierzchni komórki receptor funkcjonuje jako heterodimer złożony z podjednostek: zewnątrzkomórkowej (N^{EC}) i transbłonowej (NTM) (ryc. 6). Ligand obecny na powierzchni jednej komórki przyłączając się do fragmentu N^{EC} receptora Notch na powierzchni komórki sąsiedniej, indukuje zmiany konformacyjne w strukturze receptora, odsłaniające wrażliwe na cięcie proteolityczne miejsca w domenie NTM. Enzymami proteolitycznymi są zewnątrzkomórkowa metaloproteinaza TACE/ADAM 17 i wewnątrzkomórkowa γ-sekretaza. Do cytoplazmy uwalniany jest w ten sposób właściwy czynnik transkrypcyjny N^C (intracellular subunit), który wędruje do jądra komórkowego i przyłącza się do białka CBF-1/RBP-Jκ (C promoter binding factor 1/recombination signal sequence-binding protein-Jκ), związanego z sekwencją regulatorową w pro-

motorze genów docelowych. CBF-1/RBP-J κ jest konstytutywnym inhibitorem ekspresji, rekrutującym białka korepresorowe. Po związaniu podjednostki N^{IC}, korepresory są wypierane z tych miejsc i zastępowane przez koaktywatory, np. białko MAML. Białkami, których ekspresja jest kontrolowana przez Notch są m. in. czynniki transkrypcyjne HES i HRT/HEY, uczestniczące w regulacji różnicowania komórek. Notch ma wpływ również na ekspresję NF- κ B, cykliny D1, cykliny A oraz białka SKP2, będące jedną z podjednostek ligazy ubikwitynozależnej SCF (S-phase kinase-associated protein 2) [73,86].

Szlaki przekazywania sygnału z udziałem Notch pełnią podwójną rolę w transformacji nowotworowej. Z jednej strony aktywują procesy związane z przeżyciem komórek i przyspieszają ich proliferację, z drugiej, zatrzymują cykl komórkowy i indukują różnicowanie np. keratynocytów w hodowlach *in vitro*. Translokacja chromosomalna i inne mutacje prowadzące do konstytutywnej aktywacji Notch stwierdzono w T-komórkowej ostrej białaczce limfoblastycznej (T-ALL). Z kolei delecja genu Notch w komórkach mysiego naskórka przyczynia się do powstawania hiperplazji naskórkowej oraz rozwoju nowotworów skóry.

Posługując się metodami immunohistochemicznymi stwierdzono, że białko Jagged 1 będące ligandem Notch, pozostaje na podobnym poziomie w melanocytach prawidłowych i komórkach czerniaka. Białko to jest także obecne na powierzchni keratynocytów, co sugeruje, że może ono aktywować szlak Notch w sąsiednich melanocytach. Analiza znakowanych przeciwciałami preparatów wykonanych ze znamion czerniaka pierwotnego ujawniła obecność aktywnego czynnika Notch 1. Ponadto, badania *in vitro* przeprowadzone w hodowlach linii czerniaka z różnych stadiów progresji nowotworu, wykazały wyższą ekspresję Notch 1 w porównaniu z melanocytami prawidłowymi. Również ekspresja genów docelowych czynnika transkrypcyjnego Notch: *HEY1*, *HEY2* i *HES1*, *HES2* była podwyższona, choć w badanych liniach komórkowych obserwowano różny poziom mRNA tych genów [7]. W komórkach czerniaka pochodzących z przerzutów stwierdzono, że wyższa aktywność czynnika Notch i towarzysząca temu ekspresja *HES1* powoduje zahamowanie ekspresji *MAP-2*, co sprzyja proliferacji i przeżywalności komórek. *MAP-2* (microtubule-associated protein 2) jest białkiem związanym z mikrotubulami, odpowiedzialnym za stabilność cytoszkieletu w komórce. *HES1* jest białkiem represorowym, a elementy regulatorowe przez niego rozpoznawane znajdują się m.in. w promotorze *MAP-2*. U pacjentów z czerniakiem wysoka ekspresja *MAP-2* korelowała z rosnącymi szansami pacjenta na wyzdrowienie w porównaniu z chorymi, u których ekspresja tego białka była niska lub niewykrywalna.

O udziale Notch w regulacji proliferacji komórek nowotworowych świadczą badania *in vitro*, w których komórki czerniaka pochodzące z fazy VGP hodowano w podłożu niezawierającym czynników mitogennych. Komórki te transfekowano plazmidem ekspresyjnym dla fragmentu N^{IC} czynnika Notch i mierzono ich zdolność do proliferacji. Pomimo braku czynników mitogennych komórki wydajnie się dzieliły, a intensywność tych podziałów osiągała poziom podobny do tego, jaki wykazują komórki o właściwościach inwazyjnych. Takiego efektu nie stwierdzono

natomiast w transfekowanych komórkach czerniaka pochodzących z przerzutów oraz prawidłowych melanocytach, co wskazuje na selektywność działania Notch [7,76].

Oprócz wpływu na proliferację i przeżywalność komórek czerniaka, Notch podnosi ich właściwości adhezyjne i zdolność do migracji, co w rezultacie sprzyja powstawaniu przerzutów [76]. Notch 1 wpływa na właściwości adhezyjne komórek, m.in. przez inicjację ekspresji głównych białek zaangażowanych w progresję czerniaka, takich jak: N-ka-dheryna, cząsteczka adhezji komórkowej czerniaka Mel-CAM czy kinaza tyrozynowa FAK, biorąca udział w tworzeniu kompleksu przylegania komórkowego [7,76].

Stwierdzono również, że Notch 1 współpracuje z białkami szlaków sygnałowych Wnt/ β -katenina, MAPK i PI(3)K/Akt. Badając poziom aktywności Notch w melanocytach prawidłowych, komórkach czerniaka pierwotnego oraz w liniach wyprowadzonych z przerzutów, wysoką aktywność β -kateniny zanotowano tylko w komórkach pochodzących z fazy wzrostu RGP i VGP. W czerniaku β -katenina jest białkiem o właściwościach onkogennych. Jako koaktywator wzmacnia ekspresję genów zaangażowanych w proliferację komórek i ich przeżywalność. Ekspresja β -kateniny na poziomie mRNA pozostawała bez zmian w badanych komórkach, a zatem wytłumaczeniem wysokiego poziomu białka mógł być wzrost jego stabilności. Zastosowanie w hodowli komórek czerniaka inhibitora szlaku Notch powodowało obniżenie poziomu białka, co wskazywało na rolę Notch jako czynnika kontrolującego jego stabilność. Wyciszenie ekspresji β -kateniny metodą siRNA znosiło mitogenne właściwości Notch 1 i prowadziło do apoptozy komórek. Podobne zależności zaobserwowano między czynnikiem Notch 1, a szlakami przekazywania sygnału MAPK i PI(3)K/Akt. Aktywność tych szlaków w komórkach czerniaka korelowała z konstytutywną aktywnością Notch, a inhibitory tych szlaków znosiły, indukowaną przez Notch, proliferację i inwazyjność komórek czerniaka [7,76].

AP-2

AP-2 α jest jedną z izoform białek tworzących rodzinę czynników transkrypcyjnych AP-2 (activating enhancer-binding protein 2). Aktywny czynnik transkrypcyjny występuje w postaci homo- lub heterodimerów, a jego aktywność jest regulowana przez interakcje z: inhibitorem APC, czynnikami transkrypcyjnymi c-Myc, PAX6, p53 oraz koaktywatorem p300/CBP. AP-2 rozpoznaje miejsca bogate w pary G/C w regionach regulatorowych genów kodujących białka, takie jak: hTCLV1 (human T-cell Leukemia/lymphotropic virus type 1), huMTIIa (human metallothionein-IIa), proenkefalina, keratyna 14, c-erb-B2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), PAI-1, czy IGFBP 3 (insulin-like growth factor binding protein 3). AP-2 podczas wczesnego rozwoju embrionalnego jest związany z ekspresją białek zaangażowanych w procesy różnicowania komórek i morfogenezę. Jest czynnikiem tkankowoswoistym, którego ekspresja obecna jest w komórkach wywodzących się z grzebienia nerwowego i tkanek pochodzenia ektodermalnego [33,117].

Wiadomo, że zahamowanie ekspresji AP-2 α przyczynia się do przejścia komórek czerniaka z fazy wzrostu RGP do fazy VGP. Ponadto, nie stwierdza się ekspresji tego białka

w komórkach inwazyjnych. Rolę AP-2 w progresji czerniaka jako białka supresorowego potwierdzono w doświadczeniach *in vitro* i *in vivo*. Transfekcja komórek czerniaka z przerzutów plazmidem ekspresyjnym z genem AP-2 α , powodowała zmniejszenie ich właściwości inwazyjnych, natomiast zablokowanie ekspresji AP-2 α w komórkach czerniaka pierwotnego sprzyjało dalszej transformacji nowotworowej *in vivo* [119].

W preparatach wykonanych z materiału pobranego z biopsji czerniaka pierwotnego, pomimo braku białka AP-2, nadal można wykryć obecność jego mRNA co wskazuje na to, że brak czynnika transkrypcyjnego AP-2 w tych komórkach może być wynikiem nieprawidłowo zachodzących mechanizmów posttranskrypcyjnych. Mogą to być błędy w obróbce transkryptu, inhibicja procesów inicjacji translacji, interakcja z białkami inhibitorowymi czy synteza niekompletnego białka o podwyższonej podatności na degradację przez proteazy. W wielu przypadkach czerniaka inwazyjnego poziom mRNA AP-2 maleje, co może tłumaczyć brak produktu białkowego. Należy również brać pod uwagę utratę heterozygotyczności w allelach genu AP-2 α , bądź częste w czerniaku delecje w obrębie ramienia krótszego chromosomu 6, gdzie mapowany jest ten gen [65].

Lokalizacja AP-2 w komórce jest rozpatrywana jako ważny czynnik prognostyczny. AP-2 w preparatach pochodzących z przerzutów czerniaka występuje głównie w cytoplazmie. Takie umiejscowienie subkomórkowe wiąże się z obniżeniem aktywności AP-2, występuje podczas transformacji znamion łagodnych w dysplastyczne i jest jednym z ważniejszych zdarzeń w procesie powstawania i progresji czerniaka. Przypuszcza się, że zmiany w proporcji między frakcją jądrową i cytoplazmatyczną są wynikiem zmian w strukturze białka, zaburzeń w obrębie sekwencji translokacji jądrowej (NLS), modyfikacji białek budujących kompleksy porów błony jądrowej lub aktywności karioferyn. W celu sprawdzenia, czy zmiana w lokalizacji subkomórkowej AP-2 może być czynnikiem prognostycznym u pacjentów z czerniakiem, porównano poziom tego białka w cytoplazmie i w jądrze komórkowym. Nie odnotowano jednak istotnej statystycznie zależności między jądrowym i cytoplazmatycznym poziomem AP-2, a szansą pacjenta na wyzdrowienie. Taką informację dawał dopiero wyznaczony stosunek poziomu białka cytoplazmatycznego do jądrowego, którego wysoka wartość była niekorzystnym czynnikiem prognostycznym dla pacjenta [9,148].

W komórkach czerniaka brak aktywnego AP-2 wpływa m.in. na wzrost ekspresji receptora PAR-1, cząsteczki adhezyjnej MCAM/MUC18, E-kadheryny oraz powoduje obniżenie poziomu receptora c-Kit i inhibitora cyklu komórkowego, białka p21^{WAF1}. Elementy rozpoznawane przez ten czynnik transkrypcyjny odnajdywane są również w promotorach genów innych białek o udowodnionym i decydującym dla progresji czerniaka znaczeniu, m.in. ICAM, c-erb-B2, PAI-1, IGFBP-5, TGF- α , VEGF i HGF. W komórkach czerniaka nieinwazyjnego, wysoki poziom AP-2 korelował z niskim poziomem mRNA receptora PAR-1. W komórkach czerniaka z przerzutów, w których brak było czynnika transkrypcyjnego AP-2, zarówno transkrypt PAR-1 jak i białko pozostawały na wysokim poziomie. Obecność receptora PAR-1 na powierzchni komórek czerniaka i uruchamianie przez niego szlaki przekazywa-

nia sygnału prowadzą w komórce do ekspresji m.in. IL-8, VEGF, bFGF, PDGF, MMP-2, uPA, integryn α II β 3, α V β 3, α V β 5. Białka te biorą udział w procesach angiogenezy, ułatwiają migrację komórek i w efekcie sprzyjają progresji nowotworu [117,119]. Promotor *PAR-1* zawiera sekwencje rozpoznawane przez dwa czynniki transkrypcyjne: AP-2 i Sp1. AP-2 pełni rolę białka represorowego, podczas gdy wiązanie Sp1 inicjuje ekspresję genu. Miejsca wiązania tych białek regulatorowych w promotorze *PAR-1* natchodzą na siebie, więc procesy uruchamiane w komórce zależą od względnego poziomu tych białek. W komórkach czerniaka obecność PAR-1 jest więc wynikiem stopniowego zastępowania w promotorze *PAR-1* czynnika transkrypcyjnego o aktywności represorowej przez czynnik o właściwościach aktywatorowych. Podobny mechanizm regulacji transkrypcji przez AP-2 dotyczy genu cząsteczki adhezyjnej MCAM/MUC18. W komórkach czerniaka z przerzutów hodowanych *in vitro*, indukcja reekspresji AP-2 powodowała zahamowanie ekspresji MCAM/MUC18. Poziom białka MCAM/MUC18 w komórce był odwrotnie proporcjonalny do poziomu aktywnego czynnika transkrypcyjnego. Stwierdzono, że jest to wynik interakcji AP-2 z regionem promotorowym *MCAM/MUC18* bogatym w pary GC [8]. Z kolei, po transfekcji komórek czerniaka c-Kit – negatywnych, wektorem niosącym gen AP-2 odnotowano reekspresję białka c-Kit i towarzyszące temu obniżenie potencjału nowotworowego komórek. Kinaza receptorowa c-Kit jest białkiem niezbędnym do prawidłowego rozwoju i różnicowania melanoblastów oraz dojrzewania melanocytów. Ponadto, c-Kit jest białkiem supresorowym rozwoju czerniaka. Ekspresja tego białka ulega obniżeniu w miarę progresji i jest niewykrywalna w około 70% znanych linii komórkowych. Ponieważ w regionie promotorowym *c-KIT* nie stwierdzono mutacji, które mogłyby tłumaczyć utratę jego ekspresji, być może poziom tego białka w komórce jest regulowany na etapie transkrypcji. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na silnie inwazyjnych komórkach A375SM dowiedziono, że czynnik transkrypcyjny AP-2 aktywuje ekspresję *c-KIT* przez interakcje z jego regionem promotorowym [8].

Zmiany na poziomie genetycznym, choć obecne, wydają się rzadką przyczyną malejącego w miarę progresji czerniaka poziomu AP-2. Istnieją przypuszczenia, że niższy poziom białka może być skutkiem jego degradacji. Malejącemu poziomowi AP-2 w komórkach nowotworowych towarzyszył wzrost aktywnej kaspazy 6, a w zaawansowanych stadiach czerniaka także kaspazy 3. Ostatnie badania wskazują na rolę kaspaz nie tylko w szlakach apoptotycznych. Biorąc pod uwagę, że czerniak jest rodzajem nowotworu szczególnie opornym na działanie czynników proapoptotycznych, obecność w jego komórkach aktywnych białek efektorowych procesu apoptozy może być związana z regulacją przez nie stabilności białek w komórce. Dokładny mechanizm możliwych interakcji wymaga jednak dalszych badań [134].

SNAIL

Do czynników transkrypcyjnych Snail u kręgowców należą białka Snail i Slug. Podczas wczesnych etapów rozwoju embrionalnego czynniki te pełnią istotną rolę w formowaniu mezodermy oraz grzebienia nerwowego. Regulują procesy EMT (epithelial-to-mesenchymal transition), związa-

ne z migracją i adhezją komórek. Snail funkcjonuje jako represor transkrypcji genów związanych z rozwojem ekodermy [93].

W komórkach czerniaka *in vitro* i *in vivo* stwierdzono podwyższoną ekspresję czynnika Snail w porównaniu z obserwowaną w melanocytach prawidłowych. Zablokowanie ekspresji Snail korelowało z istotnym obniżeniem poziomu mRNA metaloproteinazy MMP-2 oraz białek o roli induktorów metaloproteinaz, takich jak: EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) i SPARC, a także tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA), białka RhoA, inhibitora TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase) oraz czynnika transkrypcyjnego Notch 4. Z kolei indukcja reekspresji Snail w tych komórkach powodowała ponowne uruchomienie ekspresji genów wszystkich wymienionych białek. Wskazuje to na rolę Snail jako bezpośredniego ich aktywatora [70]. Ponadto, wykazano inhibitoryczne działanie Snail dla ekspresji E-kadheryny [17,29]. W komórkach czerniaka utrata ekspresji E-kadheryny korelowała bowiem z podwyższoną aktywnością czynnika transkrypcyjnego Snail. W komórkach linii melanocytów prawidłowych (normal human epidermal melanocyte – NHEM), w których nie stwierdzano obecności Snail, E-kadheryna pozostawała głównym białkiem uczestniczącym w adhezji komórkowej [94]. Wprowadzenie do melanocytów plazmidu ekspresyjnego genu kodującego białko Snail, spowodowało istotne obniżenie poziomu E-kadheryny. Ponadto, transfekcja tych samych komórek plazmidem z konstruktem antysensowym Snail, powodowała reekspresję białka adhezyjnego. Wskazuje to na udział czynnika Snail w mechanizmach regulujących poziom ekspresji E-kadheryny na powierzchni tych komórek [70,94]. Dodatkowymi mechanizmami prowadzącymi do wyciszenia ekspresji E-kadheryny są mutacje typu delekcje i insercje oraz hipermetylacja wysp CpG, obecnych w regionie promotorowym genu [123].

Jednym z czynników kontrolujących ekspresję Snail może być aktywność białka macierzy zewnątrzkomórkowej SPARC, którego obecność jest związana z nabywaniem przez komórki nowotworowe właściwości silnie inwazyjnych. Badania *in vitro* prowadzone w hodowli melanocytów prawidłowych oraz komórkach pochodzących z różnych etapów progresji czerniaka, wykazały korelację między wzrostem ekspresji/aktywnością białek SPARC i Snail a spadkiem ekspresji E-kadheryny. Melanocyty prawidłowe, w których indukowano ekspresję i aktywność SPARC nabywały zdolności do migracji, natomiast w komórkach czerniaka obserwowano podwyższenie ich potencjału inwazyjnego. Z kolei zahamowaniu aktywności SPARC towarzyszyło obniżenie poziomu Snail i wzrost E-kadheryny [100].

Ski i SnoN

Czynnik transkrypcyjny Ski został wykryty jako produkt wirusowego onkogenu *v-ski*, natomiast SnoN (ski-related novel oncogene) podczas próby izolacji Ski w komórkach ludzkich. W komórkach, w których zachodzi koekspresja Ski i SnoN *in vivo*, białka te preferencyjnie tworzą heterodimery. Ekspresja Ski jest charakterystyczna dla migrujących podczas rozwoju embrionalnego komórek grzebienia nerwowego, takich jak komórki prekursorowe melanocy-

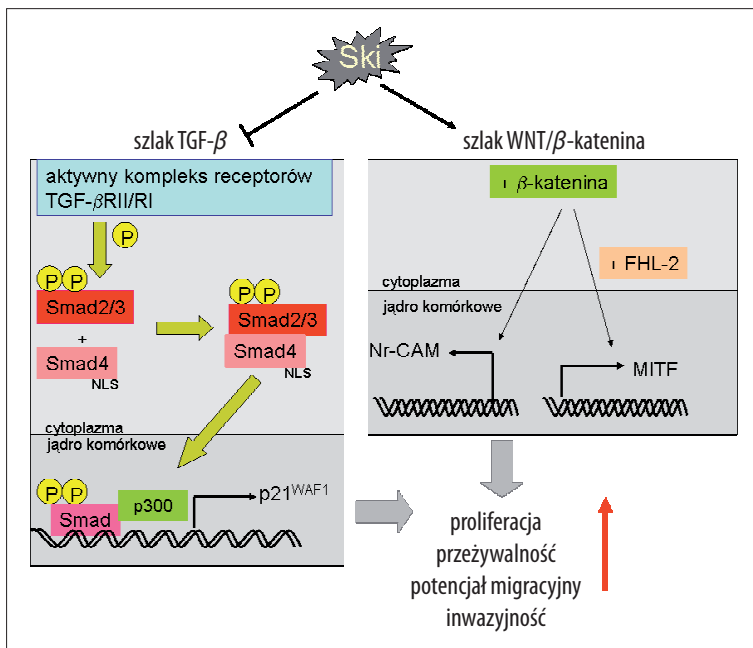
tów [77, 83]. Czynniki Ski i SnoN są regulatorami transkrypcji o właściwościach aktywatorowych bądź represorowych, w zależności od tego z jakimi białkami wchodzi w interakcję. Do białek, które tworzą funkcjonalne kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi Ski i SnoN należą m.in. białka Smad2/3/4, SKIP, N-CoR, FHL-2, HIPK-2 (homeodomain-inetracting protein kinase 2) i MeCP2 (methyl-CpG-binding protein) [96,98].

Wykorzystując metody immunohistochemiczne wykazano obecność białka Ski głównie w jądrze komórkowym, zarówno w melanocytach prawidłowych, jak i komórkach czerniaka nieinwazyjnego. Natomiast w komórkach czerniaka o właściwościach inwazyjnych i w czerniaku pochodzącym z przerzutów, czynnik transkrypcyjny Ski był wykrywany w jądrze komórkowym i cytoplazmie, bądź głównie w cytoplazmie [97,98]. Ponadto, w badaniach *in vitro* stwierdzono podwyższoną ekspresję SnoN na poziomie mRNA i białka w komórkach czerniaka oraz brak czynnika SnoN w melanocytach prawidłowych. Transfekcja komórek nowotworowych plazmidem antysensowym dla *SnoN* przywracała ich wrażliwość na antymitogenne działanie transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) [96]. Główną funkcją białek jądrowych Ski i SnoN jest hamowanie szlaku TGF- β za pośrednictwem ich interakcji z czynnikami Smad (ryc. 7).

W komórkach czerniaka stwierdzono ekspresję TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. Pomimo to, w miarę rozwoju nowotworu komórki czerniaka przestają odpowiadać na sygnały uruchamiane przez te czynniki. Brak mutacji inaktywującej w genie receptora TGF- β RII i obecność fosforylowanego białka efektorowego Smad2 w połączeniu z brakiem odpowiedzi komórek na TGF- β wskazuje na istnienie mechanizmu inhibitorowego na dalszych etapach szlaku. Sekwencja 5'AGAC'3 rozpoznawana przez białka Smad znana jako SBE (Smad binding element) zawiera się w sekwencji 5'GTCTAGAC'3, rozpoznawanej przez białko Ski. Umożliwia to związanie czynnika Ski do kompleksów Smad3/4 i utrzymanie ich w stanie nieaktywnym w regionach promotorowych genów. Wykazano, że czynniki Ski i SnoN wypierają z tych połączeń koaktywatory towarzyszące białkom Smad np. p300/CBP i rekrutują represory, takie jak N-CoR, mSin3 i deacetylaza histonowa HDAC1, blokując w ten sposób ekspresję genów [54,83,98]. Jednym z genów docelowych białek Smad jest gen inhibitora cyklu komórkowego, p21^{WAF1}. Stąd rosnąca aktywność Ski w komórkach czerniaka korelowała ze wzrostem ich proliferacji [83]. Ponadto, białko Ski wchodzi w interakcje z białkami Smad2 i Smad3 również w cytoplazmie. Połączenie to, blokując fosforylację Smad2/3 przez aktywny receptor TGF- β RI, uniemożliwia wiązanie Smad2/3 z białkiem Smad4, co jest niezbędne do ich translokacji jądrowej. Za utrzymanie kompleksów Ski/Smad w cytoplazmie odpowiedzialne jest także białko C184M [54,96,98].

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że czynnik transkrypcyjny Ski aktywuje szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina. Ski tworząc kompleksy z β -kateniną oraz FHL-2 uruchamia ekspresję cząsteczki adhezyjnej Nr-CAM i czynnika transkrypcyjnego MITF [20].

Z powyższych badań wynika, że czynniki transkrypcyjne Ski i SnoN przez blokowanie szlaku TGF- β i aktywację



Ryc. 7. Wpływ podwyższonej ekspresji białka Ski na komórki czerniaka. W komórkach czerniaka białko Ski zatrzymuje aktywność szlaku sygnałowego TGF-β i aktywuje szlak Wnt/β-katenina. Efektem aktywności białka Ski jest podniesienie proliferacji, przeżywalności, potencjału migracyjnego i inwazyjności komórek nowotworowych

szlaku Wnt/β-katenina, uruchamiają kaskadę białek, których aktywność w komórkach czerniaka prowadzi do utraty kontroli nad cyklem komórkowym, wzmożonej proliferacji oraz wzrostu właściwości migracyjnych i inwazyjnych tych komórek [98].

β-KATENINA – LEF/TCF

Szlak sygnałowy Wnt/β-katenina podczas wczesnego rozwoju embrionalnego kontroluje procesy migracji komórek z grzebienia nerwowego, ich proliferacji i różnicowania w kierunku melanoblastów, oraz dojrzewania melanocytów. Czynniki transkrypcyjnymi w tym szlaku są LEF-1, TCF-1 i TCF-4 [93]. Kiedy szlak Wnt jest wyłączony, β-katenina jest związana w cytoplazmie z kompleksem białek APC/aksyna/Gsk3β, utrzymujących ją w stanie nieaktywnym. Uruchomienie szlaku prowadzi do inaktywacji wspomnianego kompleksu, uwolnienia β-kateniny oraz hamuje proces degradacji tego białka, co w konsekwencji powoduje gromadzenie się aktywnej β-kateniny w cytoplazmie i jądrze komórkowym. Interakcja z czynnikami transkrypcyjnymi LEF/TCF w jądrze komórkowym powoduje uruchomienie ekspresji genów docelowych, w wyniku utworzenia kompleksu transkrypcyjnego z udziałem domeny transaktywacji β-kateniny, której to domeny nie mają białka LEF/TCF. W rezultacie uruchamiana jest ekspresja genów kodujących białka istotne również w progresji czerniaka, w tym: Myc, cykliny D1, PPARδ (peroxisome proliferator-activated receptor δ), metaloproteiny oraz podjednostek czynnika transkrypcyjnego AP-1, Jun i Fra-1 [130].

W hodowlach komórkowych czerniaka stwierdzono podwyższony poziom β-kateniny oraz konstytutywną aktywność tworzoną przez nią kompleksów β-katenina/LEF-1. Podejrzewano, iż może to być następstwem mutacji inaktywującej białko APC lub mutacji w obrębie samej β-kateniny, uniemożliwiającej związanie jej przez APC. Wykazano jednak, że takie mutacje występują stosunkowo rzadko, co może wskazywać na istnienie w komórce in-

nego mechanizmu aktywującego β-kateninę [93]. Analiza immunohistochemiczna wykonana w biopsjach pochodzących z różnych faz rozwoju nowotworu nie dostarczyła jednoznacznych rozstrzygnięć na temat udziału szlaku Wnt i poziomu/lokalizacji aktywnej β-kateniny jako czynników prognostycznych [6].

Podwyższony poziom aktywnych transkrypcyjnie kompleksów β-katenina/LEF1 obserwowany *in vitro* w komórkach czerniaka o wysokim potencjale migracyjnym [87] jest również odpowiedzialny za ekspresję białka adhezyjnego Nr-CAM, obecnego głównie na powierzchni komórek układu nerwowego. W badaniach *in vivo* dowiedziono, że komórki z wysokim poziomem β-kateniny i z obecnością białka Nr-CAM na powierzchni, wykazują dużą zdolność do tworzenia przerzutów [25].

W melanocytach prawidłowych poziom czynnika transkrypcyjnego TCF-4 jest zbliżony do poziomu tego białka w komórkach nowotworowych. Czynniki ten rozpoznaje sekwencje w regionie promotorowym genu kodującego białko MIA (melanoma inhibitory activity). Poziom mRNA MIA, niewykrywalny w melanocytach prawidłowych, rośnie w miarę progresji czerniaka, osiągając najwyższą wartość w czerniaku inwazyjnym. Wydzielane z komórek komórkowej i ułatwia komórkom czerniaka migrację w podścielisku guza. Promotor MIA jest silnie aktywowany przez czynnik transkrypcyjny MATF (melanoma-associated transcription factor) oraz zawiera sekwencję, którą rozpoznaje białko CtBP (C-terminal binding protein). Ekspresja białka CtBP *in vitro* i *in vivo* występuje w melanocytach prawidłowych, podczas gdy w komórkach czerniaka brak jest tego białka lub jego poziom jest bardzo niski. Po przyłączeniu do promotora MIA, czynnik TCF-4 wraz z β-kateniną uruchamiają ekspresję genu. Jednak, gdy w komórce obecne jest białko CtBP, wchodzi ono w interakcje z czynnikiem transkrypcyjnym TCF-4 powodując zmianę jego właściwości z aktywatora na represora. Stąd obecność białka

TCF-4 i utrata białka CtBP w kolejnych stadiach rozwoju czerniaka indukuje ekspresję białka MIA, czemu towarzyszy wzmocnienie właściwości migracyjnych komórek nowotworowych [93,95].

Miejsca rozpoznawane przez LEF-1 są obecne w promotorze *MITF*. Aktywne kompleksy β -katenina/LEF/TCF indukują ekspresję *MITF*. Z kolei, zablokowanie w komórkach czerniaka szlaku Wnt i aktywności czynników transkrypcyjnych LEF/TCF prowadzi do zahamowania ekspresji *MITF* [93,132].

Ets-1

Czynnik transkrypcyjny Ets-1 jest białkiem prototypowym rodziny Ets, do której należą aktywatory i represory transkrypcji. Genami docelowymi Ets są geny białek biorących udział w procesach różnicowania, proliferacji, apoptozy, a także angiogenezy i nabywania przez komórki właściwości inwazyjnych [31,102]. Czynniki transkrypcyjne Ets-1 jest obecny w migrujących komórkach grzebienia nerwowego, z których podczas wczesnego rozwoju embrionalnego powstaną melanocyty; mRNA Ets-1 wykrywane jest również w fibroblastach podścieliska nowotworów oraz komórkach budujących kapilary podczas neoangiogenezy czerniaka [102,121]. Ekspresję Ets-1 może indukować hipoksja przez czynnik HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), VEGF i bFGF (w komórkach śródbłónki), a także HGF, PDGF, TNF- α przez szlak Ras/Raf/MEK1/Erk1/2 oraz aktywność metaloproteinaz i urokinazowego aktywatora plazminogenu, uPA [49].

Analiza immunohistochemiczna preparatów czerniaka o różnym stopniu zaawansowania wykazała, że poziom ekspresji Ets-1 zależy od stadium rozwoju nowotworu. Dowiedziono, że stosunkowo wysoka ekspresja Ets-1 w czerniaku pierwotnym koreluje z gorszymi prognoząmi na przeżycie pacjenta [121]. Metodą hybrydyzacji *in situ* wykazano, że poziom Ets-1 jest już podwyższony we wczesnych stadiach powstawania znamion barwnikowych i rośnie w miarę transformacji nowotworowej, osiągając poziom najwyższy w czerniaku o właściwościach silnie inwazyjnych. Nie wykryto natomiast mRNA Ets-1 w melanocytach prawidłowych [66,102].

Ets-1 kontroluje ekspresję wielu genów w komórkach czerniaka. Należą do nich geny kodujące następujące białka: integryna β 3, MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9 i uPA. Zablokowanie ekspresji Ets-1 w komórkach czerniaka z zastosowaniem strategii antysensowych nukleotydów powoduje osłabienie właściwości inwazyjnych komórek czerniaka i obniża ich potencjał do transformacji nowotworowej *in vivo* [102].

Analiza *in vitro* wykazała, że podwyższenie ekspresji Ets-1 może być wynikiem działania histaminy na komórki czerniaka. Ten lokalny hormon obecny w podścielisku guza w zależności od rodzaju receptora na powierzchni komórek śródbłónki pełni rolę pro- lub antyangiogenną. Po przyłączeniu do receptora histaminowego H1 lub H2, hamuje proliferację lub stymuluje podziały komórek śródbłónki. Na powierzchni komórek czerniaka obecny jest receptor H2, przez który histamina indukuje ekspresję Ets-1. Czynniki transkrypcyjne stają się mediatorem w urucha-

mianych przez ten hormon szlakach promujących wzrost i migrację komórek [49].

PAX3

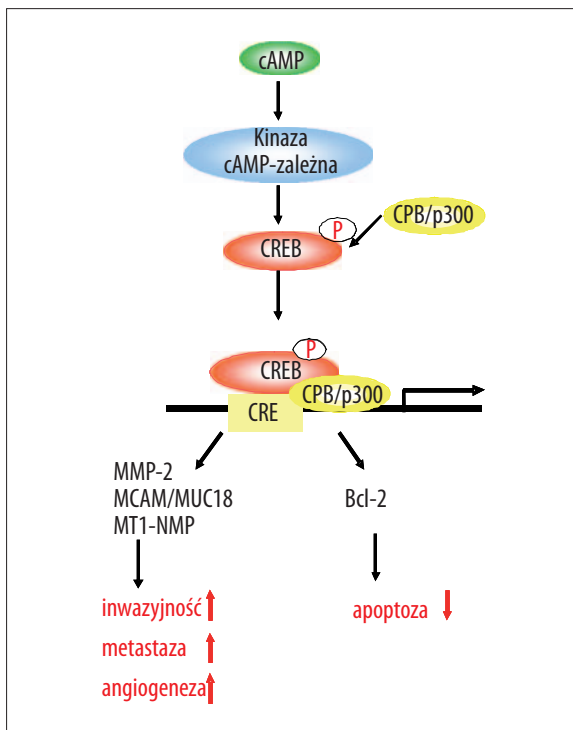
Czynnik transkrypcyjny PAX3 (paired box 3) jest aktywny we wczesnych etapach embriogenezy w komórkach wywodzących się z grzebienia nerwowego. Występuje kilka izoform PAX3 (a-d) o różnej swoistości transkrypcyjnej i aktywności. Czynniki ten reguluje proliferację melanoblastów i ich migrację do skóry właściwej. W trakcie różnicowania melanoblastów do melanocytów ekspresja białka PAX3 ulega istotnemu obniżeniu tak, że w komórkach zróżnicowanych jest niewykrywalna [11,48].

W komórkach czerniaka *in vivo* i w większości linii komórkowych *in vitro* wykazano ekspresję PAX3 na poziomie mRNA i białka [106]. W badaniach tych wykazano obecność dwóch izoform: PAX3c i PAX3d. Natomiast nie stwierdzono ich obecności w melanocytach znamion łagodnych i w komórkach prawidłowych. Ponadto, w komórkach czerniaka ekspresja PAX3 korelowała ze stopniem ich zróżnicowania i intensywnością podziałów. Stosując technikę wyciszenia genów za pomocą siRNA lub antysensowych oligonukleotydów, zaobserwowano podniesienie poziomu apoptozy komórek czerniaka *in vitro* [11,48,88]. Wyniki badań wskazują na możliwą rolę PAX3 w transformacji nowotworowej czerniaka, jednak dokładne mechanizmy jego działania wymagają dalszych badań.

CREB

CREB (cyclic-AMP response element-binding) jest czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny CREB/ATF-1/CREM. Białka z tej rodziny pośredniczą w odpowiedzi na działanie czynników zewnętrznych za pośrednictwem cAMP i jonów wapnia. Wiążą ośmionukleotydową sekwencję (TGANTCA), tzw. CRE (cyclic-AMP response element) w regionach promotorowych genów. Czynniki transkrypcyjne CREB występują jako homodimery lub heterodimery, w powstawaniu których uczestniczą inne czynniki transkrypcyjne z rodziny CREB/ATF/CREM [110]. W białku CREB można wyróżnić kilka domen funkcjonalnych: domenę transaktywacyjną, zawierającą m.in. region bogaty w aminokwasy kwasowe odpowiedzialny za interakcje z DNA, miejsce fosforylacji (seryna w pozycji 133), oraz „suwak leucynowy” na C-końcu pozwalający na dimeryzację [85].

CREB uczestniczy w odpowiedzi na wiele różnorodnych czynników, takich jak np. czynniki wzrostu, hormony peptydowe, czynniki stresu. Kinazy aktywowane przez te czynniki, fosforylując serynę w pozycji 133, umożliwiają przyłączenie koaktywatorów np. białka p300/CBP, TORC, TAFII4 [41,80,147]. CREB bierze udział w regulacji około 5000 genów docelowych w genomie człowieka. Są to m.in. geny uczestniczące w metabolizmie i oddychaniu komórkowym, regulacji cyklu komórkowego, przeżywalności komórek i proliferacji, a także geny kodujące czynniki wzrostu i cytokiny [55,147]. CREB odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji wielu genów, których produkty mogą brać udział w progresji czerniaka, m.in. genów zaangażowanych w proliferację (HER-2, TGF- β), przeżywalność i apoptozę (Bcl-2, TNF- α), inwazję, adhezję i angiogenezę (MCAM/MUC18, MMP-2, t-PA, i IL-8) [118].



Ryc. 8. Szlak aktywacji CREB i jego rola w rozwoju czerniaka. CREB jest aktywowany w odpowiedzi na działanie czynników zewnątrzkomórkowych z udziałem cAMP. Kinazy aktywowane przez cAMP fosforylując CREB, umożliwiają przyłączenie koaktywatorów, np. białka p300/CPB. Aktywny CREB przyłącza się do regionu CRE w obszarze promotorowym genów. CREB wpływa na rozwój czerniaka na dwa sposoby. Podnosi poziom ekspresji białek wpływających na potencjał inwazyjny komórek nowotworowych (MMP-2, MT1-MMP, MCAM/MUC18) oraz obniża zdolność komórek do odpowiedzi na czynniki proapoptotyczne przez zwiększenie ekspresji Bcl-2

Zatem podniesienie poziomu ekspresji lub fosforylacji CREB może sprzyjać progresji, w tym powstawaniu przerzutów czerniaka. Zależność taką zaobserwowano w linii komórkowej czerniaka myszy B16, w której przejście komórek z wczesnej fazy wzrostu guza pierwotnego do fazy późnej, charakteryzującej się zdolnością do tworzenia przerzutów, korelowało ze wzrostem poziomu i fosforylacji CREB [103]. Udział CREB w rozwoju czerniaka można przedstawić jako wpływ na potencjał inwazyjny komórek nowotworowych lub obniżanie zdolności komórki do odpowiedzi na czynniki proapoptotyczne [57].

Potencjał inwazyjny linii komórkowej MeWo (ludzkie komórki czerniaka) ulegał obniżeniu po transfekcji KCREB (wariantem „negatywnym” białka CREB). Ekspresja KCREB w komórkach MeWo obniżała CRE-zależną ekspresję kolagenazy typu IV, metaloproteinazy MMP-2, enzymu ważnego dla inwazyjności czerniaka oraz cząsteczki adhezyjnej MCAM/MUC18, uczestniczącej m.in. w tworzeniu przerzutów i angiogenezie [137]. Ponadto PAF (platelet-activating factor), silny fosfolipidowy mediator stanu zapalnego, obecny w wysokim stężeniu w mikrootoczeniu komórek nowotworowych, przez aktywację p38, MAPK i PKA – prowadzącą do fosforylacji CREB i ATF-1 – wpływał na wzrost poziomu transkrypcji i ekspresji MMP-2,

MT1-MMP oraz MCAM/MUC18, co z kolei mogło stymulować proteolityczną aktywność komórek nowotworowych i powstawanie przerzutów [84]. Kolejną z ról, jakie może pełnić CREB w nabywaniu przez komórki czerniaka zdolności inwazyjnych, jest jego wpływ na ekspresję HPSE-1 (heparanaza, endo-beta-D-glukuronidaza), enzymu degradującego siarczan heparanu w tkankach prawidłowych i nowotworowych. Podniesienie poziomu HPSE-1 jest związane z powstawaniem przerzutów. W hodowlach komórek czerniaka pochodzących z przerzutów do mózgu, transfekowanych KCREB obserwowano spadek poziomu mRNA HPSE-1 i zdolności inwazyjnych komórek. Przywrócenie początkowego poziomu aktywności HPSE-1 powodowało powrót właściwości inwazyjnych [5].

Drugi proponowany mechanizm wyjaśniający rolę CREB w rozwoju czerniaka dotyczy wpływu tego czynnika na przeżywalność komórek w odpowiedzi na czynniki proapoptotyczne (np. promieniowanie jonizujące). Wiadomo, że wysoki poziom ekspresji i fosforylacji CREB powoduje CRE-zależną transkrypcję m.in. genów antyapoptotycznych (np. *Bcl-2*) [133]. Nie obserwowano jednak korelacji między poziomem ekspresji *Bcl-2* lub innych białek z tej rodziny (*Bcl-X_L*, *Bax*, *Bad*) a poziomem CREB, nawet po indukcji apoptozy za pomocą tapsigarginy [58,59]. Szlak aktywacji CREB i jego rolę w rozwoju czerniaka schematycznie przedstawiono na ryc. 8.

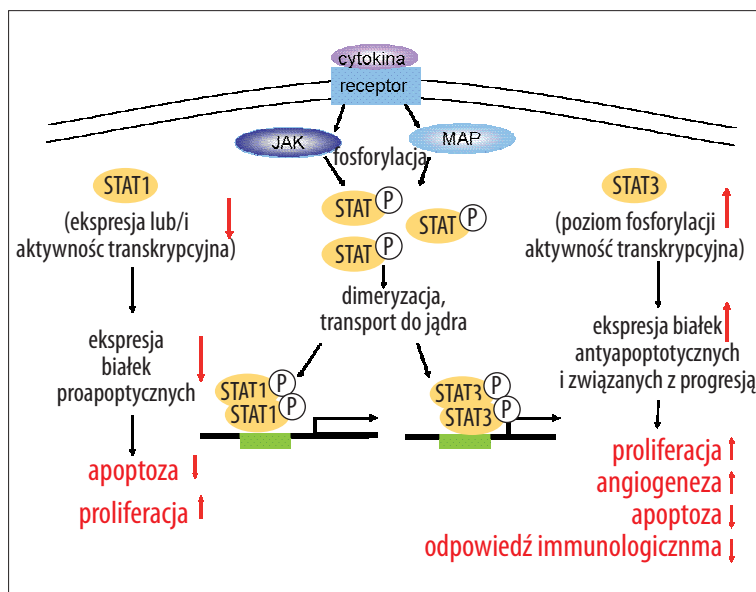
STAT1/STAT3

Białka STAT (signal transducers and activator of transcription) to czynniki transkrypcyjne pośredniczące w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów inicjowanych przez cytokiny i czynniki wzrostu. Aktywacja kinazy Janus, kinaz z rodziny MAP lub mTOR powoduje fosforylację odpowiednich reszt tyrozyny lub seryny w C-końcowej domenie białek STAT. Pozwala to na homodimerizację STAT z udziałem domen SH2 i ich aktywny transport do jądra komórkowego. Tam dimery STAT wiążą się z sekwencjami GAS lub ISG w regionach promotorowych genów i aktywują ich transkrypcję [19]. U ssaków zidentyfikowano siedem białek należących do rodziny STAT. Czynniki STAT są negatywnie regulowane przez dwie grupy białek: SOCS (suppressors of cytokine signalling), których ekspresja jest aktywowana przez te same cytokiny co białka STAT [144] oraz czynniki jądrowe PIAS, które wiążą się z ufosforylowanymi białkami STAT [44].

Wydaje się, że STAT1 i STAT3 pełnią przeciwstawne funkcje w procesach regulacji wzrostu komórek i indukcji odpowiedzi immunologicznej na antygeny nowotworowe. STAT1 jest supresorem nowotworów, hamuje ich wzrost i pośredniczy w przeciwnowotworowym działaniu IFN- α , natomiast STAT3 jest wiązany z angiogenezą i progresją nowotworów [68,74,89].

STAT1

STAT1 jest aktywowany przez interferon α (IFN- α), interferon γ (IFN- γ) oraz interleukinę 6 (IL-6). W wielu badaniach wykazano, że STAT1 może uczestniczyć w indukowaniu apoptozy lub kontroli cyklu komórkowego [56]. Związek STAT1 z rozwojem nowotworów sprowadza się do obniżonej aktywności tego czynnika transkrypcyjnego



Ryc. 9. Szlak aktywacji i udział STAT1 i STAT3 w progresji czerniaka. Sygnał pochodzący od receptora aktywuje kinazy JAK lub MAP, co powoduje fosforylację w C-końcowej domenie białek STAT, umożliwiającą dimeryzację STAT z udziałem domen SH₂ i ich aktywny transport do jądra komórkowego. Tam dimery STAT wiążą się z sekwencjami GAS lub ISG w regionach promotorowych genów i aktywują transkrypcję. Spadek aktywacji lub/i ekspresji STAT1, towarzyszący progresji czerniaka obniża ekspresję białek proapoptycznych oraz biorących udział w regulacji cyklu komórkowego i powoduje zahamowanie apoptozy i nadmierną proliferację komórek. Podwyższona ekspresja bądź aktywacja receptorów oraz wysoka aktywność kinaz powodują wzrost poziomu fosforylacji STAT3, jego ciągłą obecność w jądrze komórkowym i wzrost ekspresji białek antyapoptycznych i związanych z progresją czerniaka. Wzrasta przeżywalność i proliferacja komórek oraz uruchamiane są inne procesy konieczne w powstawaniu przerzutów

go lub nawet zahamowania jego ekspresji. Prowadzi to do zmniejszenia ekspresji genów proapoptycznych oraz biorących udział w regulacji cyklu komórkowego i w konsekwencji do utraty przez komórki kontroli nad proliferacją i apoptozą (ryc. 9) [15,69,104]. Wzmógłony rozrost nowotworu był obserwowany przy niedoborach STAT1, co prawdopodobnie było spowodowane brakiem zależnej od STAT1 odpowiedzi na IFN- γ [64].

STAT1 może wpływać na apoptozę m.in. przez współdziałanie z ATRA (all-trans retinoic acid), który jest silnym induktorem różnicowania komórek i apoptozy. ATRA reguluje ekspresję wielu białek z rodziny MAGE (melanoma-associated antigen) związanych z czerniakiem, m.in. białka jądrowego restyny. Trzy miejsca wiązania STAT1 w regionie promotora restyny wskazują, że ATRA reguluje transkrypcję tego genu za pośrednictwem STAT1. Komórki pozbawione STAT1 α były niewrażliwe na ATRA i obserwowano w nich brak aktywacji promotora restyny, natomiast ekspresja STAT1 α w tych komórkach przywracała wpływ ATRA na transkrypcję restyny [36]. Do uruchomienia proapoptycznej aktywności STAT1 niezbędna jest fosforylacja seryny w pozycji 727, podczas gdy drugie miejsce fosforylacji, tyrozyna 701 nie odgrywa roli w tym procesie [114]. Stwierdzono jednak, że brak fosforylacji tyrozyny w pozycji 701 w STAT1 pozytywnie koreluje z remisją u pacjentów z czerniakiem i może być niezależnym markerem prognostycznym tej choroby [14].

STAT3

W komórkach prawidłowych czynnik transkrypcyjny STAT3 jest aktywowany przez IFN- α . W komórkach nowotworowych STAT3 jest konstytutywnie aktywny. Wysoka aktywność kinaz z rodziny Src i podwyższona ekspresja bądź aktywacja tych kinaz w komórkach czerniaka skutkuje wzrostem poziomu fosforylacji STAT3. Powoduje to ciągłą obecność STAT w jądrze komórkowym i zaburzenia w ekspresji genów. Natomiast, jeżeli szlak sygnałowy Src/STAT3 jest zahamowany, komórki czerniaka ulegają apoptozie [89,145]. Wiele badań wskazuje, że STAT3

uczestniczy w regulacji procesów kluczowych dla rozwoju i progresji nowotworów. Pełni ważną rolę w przeżywalności komórek nowotworowych i ich proliferacji, angiogenezie, metastazie i ochronie komórek nowotworowych przed odpowiedzią immunologiczną organizmu (ryc. 9).

STAT3 jest związany z regulacją ekspresji dwóch ważnych białek antyapoptycznych: Bcl-X_L i Mcl-1. Poziom fosforylacji STAT3 i jego aktywności w komórkach czerniaka jest pozytywnie skorelowany z poziomem ekspresji genów Bcl-X_L i Mcl-1, co zostało odnotowane zarówno na poziomie mRNA jak i białka [89,148]. Ponadto STAT3 bezpośrednio oddziałuje z promotorem genu białka p53, znanego inhibitora proliferacji i induktora apoptozy, obniżając jego transkrypcję [90].

Aktywacja STAT3 pełni także ważną rolę w regulacji ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) [140]. Czynnik STAT3 może wpływać na wzrost ekspresji VEGF przez hamowanie ekspresji p53. STAT3 bierze także bezpośredni udział w regulacji ekspresji metaloproteiny MMP-2 [139], której rola w angiogenezie, inwazji nowotworów i metastazie jest dobrze poznana. Udział STAT3 w regulacji ekspresji VEGF i MMP-2 świadczy o jego ważnej roli w angiogenezie i inwazyjności komórek nowotworowych. Najnowsze badania wykazały bezpośredni związek aktywacji STAT3 w komórkach czerniaka z tworzeniem przerzutów w mózgu [138,140].

W komórkach, w których STAT3 jest konstytutywnie aktywny zaobserwowano spadek syntezy czynników prozapalnych, takich jak cytokiny i chemokiny [128], które aktywują przeciwnowotworową odpowiedź układu immunologicznego. Ponadto, konstytutywnie aktywny szlak sygnałowy MAPK w połączeniu ze szlakiem sygnałowym STAT3 wpływa na syntezę wielu czynników immunosupresyjnych, np. IL-10 i IL-6 w komórkach czerniaka [115].

Wskazuje to na udział STAT3 w procesach, które pozwalają komórkom nowotworowym uniknąć odpowiedzi immunologicznej organizmu.

Do tej pory nie przedstawiono bezpośrednich dowodów łączących STAT3 z regulacją cyklu komórkowego w komórkach czerniaka, ale badania przeprowadzone na innych, prawidłowych i nowotworowych liniach komórkowych wiążą czynnik transkrypcyjny STAT3 z podwyższoną ekspresją cykliny D1 i regulacją ekspresji c-Myc. Z kolei wiadomo, że cyklina D1, c-Myc i kilka innych induktorów przejścia z fazy G₁ do S jest pozytywnie regulowanych w komórkach czerniaka. Nie można zatem wykluczyć, że odbywa się to z udziałem STAT3 [90].

AP-1

AP-1 (activating protein-1) to rodzina czynników transkrypcyjnych, które swoiście regulują transkrypcję genów zawierających sekwencje TRE lub CRE (TGA(C/G)TCA) w regionach promotorowych. Modulacja aktywności AP-1, głównie przez fosforylację, jest jedną z najważniejszych dróg kontroli proliferacji i różnicowania komórek, a także apoptozy. Białka wchodzące w skład tej rodziny: Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, Nrl) i ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) zawierają motywy „suwaka leucynowego” i przez tę domenę mogą tworzyć homo- i heterodimery. Białka te reagują na zmiany warunków środowiskowych i dostosowują profil ekspresji genów w sposób pozwalający na adaptację komórek do zmieniającego się środowiska [22,109].

Geny docelowe czynników transkrypcyjnych AP-1 są regulowane w różny sposób, w zależności od budowy podjednostkowej dimerów. Zmiany w składzie dimerów pod wpływem czynników stresowych mogą być sygnałem decydującym o apoptozie, przeżyciu lub starzeniu się komórek. Czynnik transkrypcyjny AP-1 zawierający podjednostkę c-Jun uważa się za ważny dla różnicowania, apoptozy i odpowiedzi na promieniowanie UV [3]. W jednych z pierwszych badań wykonanych na hodowlach komórkowych subklonów mysiej linii B16, reprezentujących różne fazy rozwoju czerniaka, obserwowano różnice w ekspresji poszczególnych białek z rodziny AP-1. Stwierdzono obecność c-Jun w komórkach o większym potencjale do tworzenia przerzutów, natomiast w komórkach o mniejszym stopniu złośliwości obecna była podjednostka JunD [103]. Udział białka AP-1, zawierającego w swoim składzie podjednostkę c-Jun w rozwoju nowotworu potwierdziły późniejsze badania, w których hamowanie aktywności AP-1 przez obniżenie poziomu fosforylacji c-Jun spowodowane zmianami w aktywności JNK, zapobiegało transformacji komórek [23], a powstawanie nowotworów było hamowane u myszy pozbawionych genu dla c-Jun [146].

W przypadku ludzkich linii komórkowych, pochodzących od pacjentów w różnych stadiach zaawansowania choroby (od RGP, przez VGP aż do komórek z przerzutów) obserwowano inną zależność między stopniem złośliwości a składem dimerów AP-1. W melanocytach prawidłowych, w dimerach AP-1 występowały białka c-Jun, JunD i FosB. Najbardziej wyraźne i jednoznaczne zmiany pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi ob-

serwowano w zawartości c-Jun. W komórkach czerniaka wraz ze wzrostem zaawansowania nowotworu, od RGP (linia w3211), przez VGP (linia w1205) aż do komórek z przerzutów (linie c83-2c, c81-46A i A375), poziom tej podjednostki znacznie się obniżał lub nie stwierdzano jej obecności. Aktywność JunD wykryto prawie we wszystkich badanych liniach nowotworowych, a w komórkach z przerzutów obserwowano wzrost poziomu JunD w porównaniu z melanocytami [143]. Z powyższych badań wynika, że skład dimerów i aktywność AP-1 podczas progresji czerniaka zmieniają się, ale doniesienia na ten temat nadal pozostają sprzeczne.

Zmiany w składzie dimerów AP-1 mogą wpływać na powinowactwo AP-1 do określonych miejsc wiążących, co z kolei może powodować ekspresję innego zestawu genów, i tym samym wpływać na zdolność komórek do różnicowania i przeżywalności [143]. Białka z rodziny AP-1 biorą aktywny udział w progresji czerniaka przez aktywację wielu różnych szlaków sygnałowych zaangażowanych w takie procesy jak proliferacja, powstawanie przerzutów i angiogeneza [61]. Jednym z nich jest szlak aktywacji metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 zależny od tetraspanin [62]. Tetraspaniny biorą udział w procesach takich jak proliferacja i różnicowanie i wiele białek z tej rodziny może działać jako efekторы tworzenia przerzutów. Wykazano, że tetraspanina CD151 wzmacnia ekspresję metaloproteinazy MMP-9 w ludzkich komórkach czerniaka przez zależny od c-Jun szlak sygnałowy. Ponadto, kompleks białka CD151 z integrynami $\alpha 3\beta 1/\alpha 6\beta 1$ podnosi aktywność c-Jun przez aktywację FAK, Src, p38MAPK i JNK [52]. Wysoki poziom innej tetraspaniny, CD9 odpowiada, podobnie jak CD151, za ruchliwość, a ponadto za adhezję, proliferację, różnicowanie i inwazyjność. Stwierdzono, że CD9 w komórkach czerniaka podnosi poziom metaloproteinazy MMP-2 przez p38MAPK- i aktywację AP-1 zależną od JNK [53].

AP-1 bierze także udział w aktywacji syntazy tlenu azotu iNOS (inducible nitric oxide synthase) w mysich komórkach czerniaka linii B16/F10.9. Enzym ten nie jest obecny w prawidłowych melanocytach, natomiast jego aktywność obserwowano w różnych stadiach rozwoju czerniaka, a także stwierdzono, że tlenek azotu generowany przez iNOS sprzyja progresji we wczesnej fazie tego nowotworu, prawdopodobnie przez stymulację neoangiogenezy lub/i zahamowanie odpowiedzi immunologicznej [1]. W wyniku stymulacji IL-6 dochodzi do aktywacji szlaku sygnałowego JNK/p38 MAPK, aktywacji podjednostek AP-1, c-Jun i c-Fos oraz ekspresji genu iNOS [63,79].

Czynniki transkrypcyjne z rodziny AP-1 biorą także udział w ekspresji genów *mda-7* i *mda-9* (melanoma differentiation associated gene 7/9). Produkt białkowy ekspresji genu *mda-7* indukuje różnicowanie w komórkach prekursorowych melanocytów oraz uruchamia apoptozę w komórkach czerniaka, natomiast produkt genu *mda-9/syntenina* jest zaangażowany w progresję nowotworu m.in. przez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [16]. Analiza sekwencyjna promotorów obu genów wykazała miejsca rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne AP-1. W prawidłowych melanocytach ludzkich obserwowano wysoki poziom ekspresji *mda-7*, natomiast w trakcie progresji nowotworu ekspresja ta ulegała wyraźnemu obniżeniu. Ektopowa eks-

presja podjednostki c-Jun w komórkach czerniaka znacząco podnosiła ilość mRNA mda-7 [60,78].

PODSUMOWANIE

Nowotwór jest chorobą genetyczną, ale nie jest to choroba spowodowana jedną mutacją. Zmiany na poziomie genetycznym wywołują efekt plejotropowy, w kształtowaniu którego czynniki transkrypcyjne, jako cząsteczki efektorowe szlaków sygnałowych, pełnią ważną rolę. Czerniak jest

jednym z nowotworów najłatwiej scharakteryzowanych na poziomie molekularnym. Również udział czynników transkrypcyjnych w progresji tego nowotworu wymaga dalszych badań. Z dotychczas opublikowanych doniesień wynika, że zmiany w poziomie i aktywności czynników transkrypcyjnych: MITF, NFκB, AP-1, AP-2α, Notch, CREB, Ets-1, β-kenina/LEF/TCF, PAX3, Ski, Snail oraz STAT pełnią istotną rolę w rozwoju czerniaka. Wymienione czynniki transkrypcyjne zwiększają potencjał proliferacyjny, zdolność komórek do migracji lub tworzenia przerzutów.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahmed B., Van Den Oord J.J.: Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in pigment cell lesions of the skin. *Br. J. Dermatol.*, 2000; 142: 432–440
- [2] Amiri K.I., Richmond A.: Role of nuclear factor-kappaB in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, 2005; 24: 301–313
- [3] Angel P., Szabowski A., Schorpp-Kister M.: Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, 2001; 20: 2413–2423
- [4] Aoki H., Moro O.: Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). *Life Sci.*, 2002; 71: 2171–2179
- [5] Aucoin R., Reiland J., Roy M., Marchetti D.: Dominant-negative CREB inhibits heparanase functionality and melanoma cell invasion. *J. Cell. Biochem.*, 2004; 93: 215–223
- [6] Bachmann I.M., Straume O., Puntervoll H.E., Kalvenes M.B., Akslen L.A.: Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 8606–8614
- [7] Balint K., Xiao M., Pinnix C.C., Soma A., Veres I., Juhasz I., Brown E.J., Capobianco A.J., Herlyn M., Liu Z.J.: Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 3166–3176
- [8] Bar-Eli M.: Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor. *Pigment Cell Res.*, 2001; 14: 78–85
- [9] Berger A.J., Davis D.W., Tellez C., Prieto V.G., Gershenwald J.E., Johnson M.M., Rimm D.L., Bar-Eli M.: Automated quantitative analysis of activator protein-2alpha subcellular expression in melanoma tissue microarrays correlates with survival prediction. *Cancer Res.*, 2005; 65: 11185–11192
- [10] Bertolotto C., Abbe P., Hemesath T.J., Bille K., Fisher D.E., Ortonne J.P., Ballotti R.: Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell. Biol.*, 1998; 142: 827–835
- [11] Blake J.A., Ziman M.R.: Pax3 transcripts in melanoblast development. *Dev. Growth Differ.*, 2005; 47: 627–635
- [12] Bohm M., Moellmann G., Cheng E., Alvarez-Franco M., Wagner S., Sassone-Corsi P., Halaban R.: Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ.*, 1995; 6: 291–302
- [13] Bosserhoff A.K.: Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clin. Chim. Acta*, 2006; 367: 28–35
- [14] Boudny V., Dusek L., Adamkova L., Chumchalova J., Kocak I., Fait V., Lauerova L., Krejci E., Kovarik J.: Lack of STAT1 phosphorylation at TYR 701 by IFNgamma correlates with disease outcome in melanoma patients. *Neoplasma*, 2005; 52: 330–337
- [15] Boudny V., Kocak I., Lauerova L., Kovarik J.: Interferon inducibility of STAT1 activation and its prognostic significance in melanoma patients. *Folia Biol.*, 2003; 49: 142–146
- [16] Boukerche H., Su Z.Z., Emdad L., Sarkar D., Fisher P.B.: mda-9/Syntenin regulates the metastatic phenotype in human melanoma cells by activating nuclear factor-kappaB. *Cancer Res.*, 2007; 67: 1812–1822
- [17] Cano A., Pérez-Moreno M.A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M.J., del Barrio M.G., Portillo F., Nieto M.A.: The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.*, 2000; 2: 76–84
- [18] Carreira S., Goodall J., Denat L., Rodriguez M., Nuciforo P., Hoek K.S., Testori A., Larue L., Goding C.R.: Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.*, 2007; 20: 3426–3439
- [19] Chatterjee-Kishore M., Wright K.L., Ting J.P., Stark G.R.: How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.*, 2000; 19: 4111–4122
- [20] Chen D., Xu W., Bales E., Colmenares C., Conacci-Sorrell M., Ishii S., Stavnezer E., Campisi J., Fisher D.E., Ben-Ze'ev A., Medrano E.E.: SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res.*, 2003; 63: 6626–6634
- [21] Chen X., Kandasamy K., Srivastava R.K.: Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res.*, 2003; 63: 1059–1066
- [22] Chimenov Y., Kerppola T.K.: Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, 2001; 6: 533–542
- [23] Choi B.Y., Choi H.S., Ko K., Cho Y.Y., Zhu F., Kang B.S., Ermakova S.P., Ma W.Y., Bode A.M., Dong Z.: The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005; 12: 699–707
- [24] Cohen C., Zavala-Pompa A., Sequeira J.H., Shoji M., Sexton D.G., Cotsonis G., Cerimele F., Govindarajan B., Macaron N., Arbiser J.L.: Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 3728–3733
- [25] Conacci-Sorrell M.E., Ben-Yedidia T., Shtutman M., Feinstein E., Einat P., Ben-Ze'ev A.: Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev.*, 2002; 16: 2058–2072
- [26] Czyż M.: Specyficzność i selektywność działania czynnika transkrypcyjnego NFκB. *Post. Biochem.*, 2005; 51: 60–68
- [27] Dai D.L., Martinka M., Li G.: Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 1473–1482
- [28] Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002; 417: 949–954
- [29] De Craene B., van Roy F., Berx G.: Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell. Signal.*, 2005; 17: 535–547
- [30] Dhawan P., Richmond A.: A novel NF-κB-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-κB activity in melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 7920–7928
- [31] Dittmer J.: The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol. Cancer*, 2003; 2: 29
- [32] Du J., Miller A.J., Widlund H.R., Horstmann M.A., Ramaswamy S., Fisher D.E.: MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am. J. Pathol.*, 2003; 163: 333–343
- [33] Eckert D., Buhl S., Weber S., Jäger R., Schorle H.: The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.*, 2005; 6: 246

- [34] Escarcega R.O., Fuentes-Alexandro S., Garcia-Carrasco M., Gatica A., Zamora A.: The transcription factor Nuclear Factor-kappa B and cancer. *Clin. Oncol.*, 2007; 19: 154–161
- [35] Franco A.V., Zhang X.D., Van Berkel E., Sanders J.E., Zhang X.Y., Thomas W.D., Nguyen T., Hersey P.: The role of NF-kappaB in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J. Immunol.*, 2001; 166: 5337–5345
- [36] Fu H., Yang G., Lu F., Wang R., Yao L., Lu Z.: Transcriptional up-regulation of retin by all-trans retinoic acid through STAT1 in cancer cell differentiation process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 343: 1009–1016
- [37] Gao K., Dai D.L., Martinka M., Li G.: Prognostic significance of Nuclear Factor-(kappa)B p105/p50 in human melanoma and its role in cell migration. *Cancer Res.*, 2006; 66: 8382–8388
- [38] Garraway L.A., Widlund H.R., Rubin M.A., Getz G., Berger A.J., Ramaswamy S., Beroukhir M., Milner D.A., Granter S.R., Du J., Lee C., Wagner S.N., Li C., Golub T.R., Rimm D.L., Meyerson M.L., Fisher D.E., Sellers W.R.: Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 2005; 436: 117–122
- [39] Goding C.R.: Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.*, 2000; 14: 1712–1728
- [40] Goel V.K., Lazar A.J., Warneke C.L., Redston M.S., Haluska F.G.: Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 2006; 126: 154–160
- [41] Goodman R.H., Smolik S.: CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.*, 2000; 14: 1553–1577
- [42] Gray-Schopfer V.C., da Rocha Dias S., Marais R.: The role of B-RAF in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, 2005; 24: 165–183
- [43] Gray-Schopfer V.C., Karasides M., Hayward R., Marais R.: Tumor necrosis factor-alpha blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. *Cancer Res.*, 2007; 67: 122–129
- [44] Greenhalgh C.J., Hilton D.J.: Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2001; 70: 348–356
- [45] Haass N.K., Smalley K.S., Herlyn M.: The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J. Mol. Histol.*, 2004; 35: 309–318
- [46] Haass N.K., Smalley K.S., Li L., Herlyn M.: Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.*, 2005; 18: 150–159
- [47] Hayden M.S., Ghosh S.: Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.*, 2004; 18: 2195–2224
- [48] He S.J., Stevens G., Braithwaite A.W., Eccles M.R.: Transfection of melanoma cells with antisense PAX3 oligonucleotides additively complements cisplatin-induced cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 996–1003
- [49] Hegyesi H., Horváth B., Pállinger E., Pós Z., Molnár V., Falus A.: Histamine elevates the expression of Ets-1, a protooncogene in human melanoma cell lines through H2 receptor. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 2475–2479
- [50] Heon Seo K., Ko H.M., Kim H.A., Choi J.H., Jun Park S., Kim K.J., Lee H.K., Im S.Y.: Platelet-activating factor induces up-regulation of antiapoptotic factors in melanoma cell line through nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.*, 2006; 66: 4681–4686
- [51] Hoffmann A., Natoli G., Ghosh G.: Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene*, 2006; 25: 6706–6716
- [52] Hong I.K., Jin Y.J., Byun H.J., Jeoung D.I., Kim Y.M., Lee H.: Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 24279–24292
- [53] Hong I.K., Kim Y.M., Jeoung D.I., Kim K.C., Lee H.: Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Exp. Mol. Med.*, 2005; 37: 230–239
- [54] Hussein M.R.: Transforming growth factor-beta and malignant melanoma: molecular mechanisms. *J. Cutan. Pathol.*, 2005; 32: 389–395
- [55] Impey S., McCorkle S.R., Cha-Molstad H., Dwyer J.M., Yochum G.S., Boss J.M., McWeeney S., Dunn J.J., Mandel G., Goodman R.H.: Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, 2004; 119: 1041–1054
- [56] Janjua S., Stephanou A., Latchman D.S.: The C-terminal activation domain of STAT-1 transcription factor is necessary and sufficient for stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2002; 9: 1140–1146
- [57] Jean D., Bar-Eli M.: Regulation of tumor growth and metastasis of human melanoma by the CREB transcription factor family. *Mol. Cell. Biochem.*, 2000; 212: 19–28
- [58] Jean D., Harbison M., McConkey D.J., Ronai Z., Bar-Eli M.: CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 24884–24890
- [59] Jean D., Tellez C., Huang S., Davis D.W., Bruns C.J., McConkey D.J., Hinrichs S.H., Bar-Eli M.: Inhibition of tumor growth and metastasis of human melanoma by intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment. *Oncogene*, 2000; 19: 2721–2730
- [60] Jiang H., Lin J.J., Su Z.Z., Goldstein N.I., Fisher P.B.: Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*, 1995; 11: 2477–2486
- [61] Jochum W., Passegue E., Wagner E.F.: AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*, 2001; 20: 2401–2412
- [62] Johnsen M., Lund L.R., Romer J., Almholt K., Dano K.: Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curry. Opin. Cell Biol.*, 1998; 10: 667–671
- [63] Kang K.W., Wagley Y., Kim H.W., Pokharel Y.R., Chung Y.Y., Chang I.Y., Kim J.J., Moon J.S., Kim Y.K., Nah S.Y., Kang H.S., Oh J.W.: Novel role of IL-6/SIL-6R signaling in the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in murine B16, metastatic melanoma clone F10.9, cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 42: 215–227
- [64] Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D.: Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 7556–7561
- [65] Karjalainen J.M., Kellokoski J.K., Mannermaa A.J., Kujala H.E., Moiso K.I., Mitchell P.J., Eskelinen M.J., Alhava E.M., Kosma V.M.: Failure in post-transcriptional processing is a possible inactivation mechanism of AP-2alpha in cutaneous melanoma. *Br. J. Cancer*, 2000; 82: 2015–2021
- [66] Keehn C.A., Smoller B.R., Morgan M.B.: Expression of ets-1 protooncogene in melanocytic lesions. *Mod. Pathol.*, 2003; 16: 772–777
- [67] Khaled M., Larribere L., Bille K., Aberdam E., Ortonne J.P., Ballotti R., Bertolotto C.: Glycogen synthase kinase β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 33690–33697
- [68] Kortylewski M., Jove R., Yu H.: Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev.*, 2005; 24: 315–327
- [69] Kovarik J., Boudny V., Kocak I., Lauerova L., Fai V., Vagundova M.: Malignant melanoma associates with deficient IFN-induced STAT1 phosphorylation. *Int. J. Mol. Med.*, 2003; 12: 335–340
- [70] Kuphal S., Palm H.G., Poser I., Bosserhoff A.K.: Snail-regulated genes in malignant melanoma. *Melanoma Res.*, 2005; 15: 305–313
- [71] Lamperska K., Przybyla A., Kaczmarek A., Leporowska E., Mackiewicz A.: Podłoże genetyczne czerniaka – badania własne i przegląd piśmiennictwa. *Wsp. Onkologia*, 2006; 10: 297–302
- [72] Larue L., Kumasaka M., Goding C.R.: Beta-catenin in the melanocyte lineage. *Pigment Cell Res.*, 2003; 16: 312–317
- [73] Leong K.G., Karsan A.: Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, 2006; 107: 2223–2233
- [74] Lesinski G.B., Anghelina M., Zimmerman J., Bakalakov T., Badgwell B., Parihar R., Hu Y., Becknell B., Abood G., Chaudhury A.R., Magro C., Durbin J., Carson W.E. III: The antitumor effects of IFN- α are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 170–180
- [75] Levy C., Khaled M., Fisher D.E.: MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.*, 2006; 12: 406–414
- [76] Liu Z.J., Xiao M., Balint K., Smalley K.S., Brafford P., Qiu R., Pinnix C.C., Li X., Herlyn M.: Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res.*, 2006; 66: 4182–4190
- [77] Luo K.: Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2004; 14: 65–70
- [78] Madireddi M.T., Dent P., Fisher P.B.: AP-1 and C/EBP transcription factors contribute to mda-7 gene promoter activity during human melanoma differentiation. *J. Cell Physiol.*, 2000; 185: 36–46
- [79] Massi D., Franchi A., Sardi I., Magnelli L., Paglierani M., Borgognoni L., Maria Reali U., Santucci M.: Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. *J. Pathol.*, 2001; 194: 194–200

- [80] Mayr B., Montminy M.: Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001; 2: 599–609
- [81] McNulty S.E., del Rosario R., Cen D., Meyskens F.L., Yang S.: Comparative expression of NF κ B proteins in melanocytes of normal skin vs benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies. *Pigment Cell Res.*, 2004; 17: 173–180
- [82] McNulty S.E., Tohidian N.B., Meyskens F.L.: RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B. *Pigment Cell Res.*, 2001; 14: 456–465
- [83] Medrano E.E.: Repression of TGF-beta signaling by the oncogenic protein SKI in human melanomas: consequences for proliferation, survival, and metastasis. *Oncogene*, 2003; 22: 3123–3129
- [84] Melnikova V.O., Mourad-Zeidan A.A., Lev D.C., Bar-Eli M.: Platelet-activating factor mediates MMP-2 expression and activation via phosphorylation of cAMP-response element-binding protein and contributes to melanoma metastasis. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 2911–2922
- [85] Meyer T.E., Habener J.F.: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element binding protein (CREB) and related transcription-activating deoxyribonucleic acid-binding proteins. *Endocr. Rev.*, 1993; 14: 269–290
- [86] Miele L.: Notch signaling. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 1074–1079
- [87] Murakami T., Toda S., Fujimoto M., Ohtsuki M., Byers H.R., Etoh T., Nakagawa H.: Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 288: 8–15
- [88] Muratovska A., Zhou C., He S., Goodyer P., Eccles M.R.: Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene*, 2003; 22: 7989–7997
- [89] Niu G., Bowman T., Huang M., Shivers S., Reintgen D., Daud A., Chang A., Kraker A., Jove R., Yu H.: Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene*, 2002; 21: 7001–7010
- [90] Niu G., Wright K.L., Ma Y., Wright G.M., Huang M., Irby R., Briggs J., Karras J., Cress W.D., Pardoll D., Jove R., Chen J., Yu H.: Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol. Cell. Biol.*, 2005; 25: 7432–7440
- [91] Omholt K., Kröckel D., Ringborg U., Hansson J.: Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.*, 2006; 16: 197–200
- [92] Omholt K., Platz A., Ringborg U., Hansson J.: Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma. *Int. J. Cancer*, 2001; 92: 839–842
- [93] Poser I., Bosserhoff A.K.: Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histol. Histopathol.*, 2004; 19: 173–188
- [94] Poser I., Dominguez D., de Herreros A.G., Varnai A., Buettner R., Bosserhoff A.K.: Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 24661–24666
- [95] Poser I., Golob M., Weidner M., Buettner R., Bosserhoff A.K.: Down-regulation of COOH-terminal binding protein expression in malignant melanomas leads to induction of MIA expression. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5962–5966
- [96] Poser I., Rothhammer T., Dooley S., Weiskirchen R., Bosserhoff A.K.: Characterization of Sno expression in malignant melanoma. *Int. J. Oncol.*, 2005; 26: 1411–1417
- [97] Reed J.A., Bales E., Xu W., Okan N.A., Bandyopadhyay D., Medrano E.E.: Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas *in vivo*: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.*, 2001; 61: 8074–8078
- [98] Reed J.A., Lin Q., Chen D., Mian I.S., Medrano E.E.: Ski pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, 2005; 24: 265–272
- [99] Rimm D.L., Caca K., Hu G., Harrison F.B., Fearon E.R.: Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am. J. Pathol.*, 1999; 154: 325–329
- [100] Robert G., Gaggioli C., Baillet O., Chavey C., Abbe P.: SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res.*, 2006; 66: 7516–7523
- [101] Rothhammer T., Bosserhoff A.K.: Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.*, 2007; 20: 92–111
- [102] Rothhammer T., Hahne J.C., Florin A., Poser I., Söncin F., Wernert N., Bosserhoff A.K.: The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004; 61: 118–128
- [103] Rutberg S.E., Goldstein I.M., Yang Y.M., Stackpole C.W., Ronai Z.: Expression and transcriptional activity of AP-1, CRE, and URE binding proteins in B16 mouse melanoma subclones. *Mol. Carcinog.*, 1994; 10: 82–87
- [104] Sahni M., Raz R., Coffin J.D., Levy D., Basilico C.: STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development*, 2001; 28: 2119–2129
- [105] Satyamoorthy K., Li G., Gerrero M.R., Brose M.S., Volpe P., Weber B.L., Van Belle P., Elder D.E., Herlyn M.: Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.*, 2003; 63: 756–759
- [106] Scholl F.A., Kamarashev J., Murmann O.V., Geertsens R., Dummer R., Schäfer B.W.: PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. *Cancer Res.*, 2001; 61: 823–826
- [107] Selzer E., Wacheck V., Lucas T., Heere-Ress E., Wu M., Weillbaecher K.N., Schlegel W., Valent P., Wrba F., Pehamberger H., Fisher D., Jansen B.: The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res.*, 2002; 62: 2098–2103
- [108] Sharma A., Trivedi N.R., Zimmerman M.A., Tuveson D.A., Smith C.D., Robertson G.P.: Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res.*, 2005; 65: 2412–2421
- [109] Shaulian E., Karin M.: AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.*, 2002; 4: E131–E136
- [110] Shaywitz A.J., Greenberg M.E.: CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999; 68: 821–861
- [111] Smalley K.S., Haass N.K., Brafford P.A., Lioni M., Flaherty K.T., Herlyn M.: Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol. Cancer Ther.*, 2006; 5: 1136–1144
- [112] Stahl J.M., Sharma A., Cheung M., Zimmerman M., Cheng J.Q., Bosenberg M.W., Kester M., Sandirasegarane L., Robertson G.P.: Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.*, 2004; 64: 7002–7010
- [113] Steingrimsdóttir E., Copeland N.G., Jenkins N.A.: Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.*, 2004; 38: 365–411
- [114] Stephanou A., Scarabelli T., Brar B.K., Nakanishi Y., Matsumura M., Knight R.A., Latchman D.S.: Induction of apoptosis and Fas/FasL expression by ischaemia/reperfusion in cardiac myocytes requires serine 727 of the STAT1 but not tyrosine 701. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 28340–28347
- [115] Sumimoto H., Imabayashi F., Iwata T., Kawakami Y.: The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 1651–1656
- [116] Takeda K., Yasumoto K., Takada R., Takada S., Watanabe K., Udono T., Saito H., Takahashi K., Shibahara S.: Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 14013–14016
- [117] Tellez C., Bar-Eli M.: Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma. *Oncogene*, 2003; 22: 3130–3137
- [118] Tellez C., Jean D., Bar-Eli M.: Construction and expression of intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment: a modality to inhibit melanoma tumor growth and metastasis. *Methods*, 2004; 34: 233–239
- [119] Tellez C., McCarty M., Ruiz M., Bar-Eli M.: Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 46632–46642
- [120] Thomas N.E.: BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.*, 2006; 16: 97–103
- [121] Torlakovic E.E., Bilalovic N., Nesland J.M., Flørenes V.A.: Ets-1 transcription factor is widely expressed in benign and malignant melanocytes and its expression has no significant association with prognosis. *Mod. Pathol.*, 2004; 17: 1400–1406
- [122] Tsao H., Goel V., Wu H., Yang G., Haluska F.G.: Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 2004; 122: 337–341

- [123] Tsutsumida A., Hamada J., Tada M., Aoyama T., Furuuchi K., Kawai Y., Yamamoto Y., Sugihara T., Moriuchi T.: Epigenetic silencing of E- and P-cadherin gene expression in human melanoma cell lines. *Int. J. Oncol.*, 2004; 25: 1415–1421
- [124] Ueda Y., Richmond A.: NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res.*, 2006; 19: 112–124
- [125] Vance K.W., Goding C.R.: The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res.*, 2004; 17: 318–325
- [126] Verastegui C., Bille K., Ortonne J.P., Ballotti R.: Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 30757–30760
- [127] Verger A., Perdomo J., Crossley M.: Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.*, 2003; 4: 137–142
- [128] Wang T., Niu G., Kortylewski M., Burdelya L., Shain K., Zhang S., Bhattacharya R., Gabrilovich D., Heller R., Coppola D., Dalton W., Jove R., Pardoll D., Yu H.: Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.*, 2004; 10: 48–54
- [129] Watanabe A., Takeda K., Ploplis B., Tachibana M.: Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat. Genet.*, 1998; 18: 283–286
- [130] Weeraratna A.T.: A Wnt-er wonderland – the complexity of Wnt signaling in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, 2005; 24: 237–250
- [131] Wellbrock C., Marais R.: Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J. Cell. Biol.*, 2005; 170: 703–708
- [132] Widlund H.R., Horstmann M.A., Price E.R., Cui J., Lessnick S.L., Wu M., He X., Fisher D.E.: Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J. Cell Biol.*, 2002; 158: 1079–1087
- [133] Wilson B.E., Mochon E., Boxer L.M.: Induction of Bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 1996; 16: 5546–5556
- [134] Woenckhaus C., Giebel J., Failing K., Fenic I., Dittberner T., Poetsch M.: Expression of AP-2alpha, c-kit, and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J. Pathol.*, 2003; 201: 278–287
- [135] Wu H., Goel V., Haluska F.G.: PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*, 2003; 22: 3113–3122
- [136] Wu M., Hemesath T.J., Takemoto C.M., Horstmann M.A., Wells A.G., Price E.R., Fisher D.Z., Fisher D.E.: c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.*, 2000; 14: 301–312
- [137] Xie S., Price J.E., Luca M., Jean D., Ronai Z., Bar-Eli M.: Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene*, 1997; 15: 2069–2075
- [138] Xie T.X., Huang F.J., Aldape K.D., Kang S.H., Liu M., Gershenwald J.E., Xie K., Sawaya R., Huang S.: Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res.*, 2006; 66: 3188–3196
- [139] Xie T.X., Wei D., Liu M., Gao A.C., Ali-Osman F., Sawaya R., Huang S.: Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene*, 2004; 23: 3550–3560
- [140] Xu Q., Briggs J., Park S., Niu G., Kortylewski M., Zhang S., Gritsko T., Turkson J., Kay H., Semenza G.L., Cheng J.Q., Jove R., Yu H.: Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*, 2005; 24: 5552–5560
- [141] Yang J., Pan W.H., Clawson G.A., Richmond A.: Systemic targeting Inhibitor of kappaB kinase inhibits melanoma tumor growth. *Cancer Res.*, 2007; 67: 3127–3134
- [142] Yang J., Richmond A.: Constitutive I kappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4901–4909
- [143] Yang S., McNulty S., Meyskens F.L.Jr.: During human melanoma progression AP-1 binding pairs are altered with loss of c-Jun *in vitro*. *Pigment Cell Res.*, 2004; 17: 74–83
- [144] Yasukawa H., Sasaki A., Yoshimura A.: Negative regulation of cytokine signalling pathways. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000; 18: 143–164
- [145] Yu C.L., Jove R., Burakoff S.J.: Constitutive activation of the Janus kinase-STAT pathway in T lymphoma overexpressing the Lck protein tyrosine kinase. *J. Immunol.*, 1997; 159: 5206–5210
- [146] Zenz R., Scheuch H., Martin P., Frank C., Eferl R., Kenner L., Sibilila M., Wagner E.F.: c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev. Cell*, 2003; 4: 879–889
- [147] Zhang X., Odom D.T., Koo S.H., Conkright M.D., Canetti G., Best J., Chen H., Jenner R., Herbolzheimer E., Jacobsen E., Kadam S., Ecker J.R., Emerson B., Hogenesch J.B., Unterman T., Young R.A., Montminy M.: Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 4459–4464
- [148] Zhuang L., Lee C.S., Scolyer R.A., McCarthy S.W., Zhang X.D., Thompson J.F., Hersey P.: Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod. Pathol.*, 2007; 20: 416–426