

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. lékařská fakulta



DISERTAČNÍ PRÁCE

Praha, 2007

Mgr. Blanka Šestáková

DISERTAČNÍ PRÁCE

Transkripční regulace diferenciacce buněk embryonálního karcinomu a maligního melanomu: Úloha proteinů p21(WAF1) a MITF.

Autor (kandidát): Mgr. Blanka Šestáková

Školitel: Doc. MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc.

Poděkování.

Za podporu během experimentální práce patří poděkování zejména vedoucímu pracoviště, na kterém byla zde presentovaná experimentální práce provedena, Prof. MUDr. Petru Zatloukalovi, CSc. (přednostovi Kliniky pneumologie a hrudní chirurgie III. LF UK) a mému školiteli Doc. MUDr. Jiřímu Vachtenheimovi, CSc. Dík patří za cenné rady a připomínky při práci i Prof. MUDr. Janu Borovanskému, CSc., MUDr. Evženu Křepelovi, CSc. a RNDr. Zdeně Tuháčkové, CSc. Poděkování patří i všem dalším kolegům uvedeným v poděkování v jednotlivých článcích, kteří poskytli různé plasmidy, buňky, reagentie a rovněž tak cenné rady pro experimentální práci. Finanční podpora předkládané práce byla z grantových projektů IGA MZ ČR a výzkumného záměru poskytnutého MZ ČR, jak je uvedeno v publikovaných článcích.

Mgr. Blanka Šestáková

Laboratoř molekulární biologie, KPHCH, 3. LF UK, FN Na Bulovce, Praha 8

Doc. MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc. (školitel)

Laboratoř molekulární biologie, KPHCH, 3. LF UK, FN Na Bulovce, Praha 8

OBSAH

1. Úvod a přehled literatury	str. 7
2. Vymezení cíle práce	str. 19
3. Použité metody	str. 21
4. Výsledky	str. 25
a) Úloha inhibitoru cyklin-dependentních kinas p21(WAF1/Cip1) při diferenciaci buněk myšního embryonálního karcinomu (F9) na parietální endoderm.	
b) p21(WAF1/Cip1) je exprimován v melanomových buňkách a aktivuje promotor pro MITF, klíčový transkripční regulator melanocytů	
c) Adenovirový E1A onkoprotein inhibuje MITF-dependentní transkripci i expresi samotného MITF	
d) Inhibice funkce MITF nezávislá na inaktivaci koaktivátorů p300/CBP - doména CR1 proteinu E1A jako autonomní repressor MITF-řízené transkripce	
e) Dominantně negativní mutanta MITF - identifikace a úloha druhé, slabší transkripčně aktivační domény MITF	
5. Diskuse	str. 40
6. Závěr a zhodnocení	str. 49
7. Souhrn, Summary	str. 51
8. Literatura	str. 57
9. Obrázky	str. 72
10. Přílohy	str. 81

Použité zkratky.

Ad E1A	adenovirus early region 1A
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
bHLH-LZ	basic-helix-loop-helix-leucine zipper
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CBP	CREB-binding protein
CREB	CRE-binding protein (cAMP response element binding protein)
db cAMP	dibutyryl cyklický adenosin monofosfát
DTT	dithiothreitol
EMSA	electromobility shift assay
FCS	fetal calf serum (fetální telecí sérum)
HA	hemaglutinin
HAT	histon acetyltransferasa
HDAC	histon deacetylasa
IVT	in vitro transkripce a translace
LZ	leucinový zip (leucine zipper)
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
PKA	protein kinasa A
RA	kyselina retinová
RAR	retinoic acid receptor
RT-PCR	reverzní transkripce-polymerasová řetězová reakce
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
shRNA	small hairpin RNA
TAD	transkripčně aktivační doména
TNF	tumour necrosis factor
TM	trombomodulin
TPa	tissue plasminogen activator
TRP-1	tyrosinase-related protein 1
TRP-2	tyrosinase-related protein 2
Wt	wild type

1. Úvod a přehled literatury.

a) p21(WAF1/Cip1), inhibitor cdk a buněčného cyklu, je též transkripční regulátor a faktor nutný při diferenciaci některých buněčných typů.

Změny v transkripci genů jsou základní molekulární charakteristikou nádorových buněk a rozdíly v profilu exprese nádorových buněk (na úrovni transkripce) oproti normálním netransformovaným bunkám příslušného buněčného typu patří ke konstantním molekulárním projevům nádorové transformace buňky. Při transformaci normální buňky na buňku nádorovu jsou porušeny buněčné mechanismy působící jako ochranná bariéra nádorové transformace, a to schopnost buňky vstoupit do apoptosy a proces buněčného stárnutí. Ačkoliv některé aktivované onkogeny mohou indukovat předčasnou senescenci, nesouvisející se zkracováním telomer, další genetické změny v buňce, jako je např. mutace a inaktivace tumorsupresorových genů, již indukci tohoto typu senescence eliminují. Ve většině nádorových buněk lze též pozorovat defekty v buněčné diferenciaci různého stupně, od represe jednoho nebo několika diferenciacních markerů až po dediferencovaný fenotyp, kdy původní nenádorový buněčný typ lze po transformaci již jen obližně identifikovat. Takové nádorové buňky bývají biologicky agresivnější ve srovnání s nádorovými buňkami z dediferencovaných tumorů a dediferencované nádory mají obecně horší prognosu. Regulace diferenciacce a exprese genů spojených s diferenciacním buněčným programem má tedy mimořádný význam i při přeměně normální buňky na buňku nádorovou a indukce diferenciacce u některých typů nádorových buněk může vést až ke ztrátě maligního fenotypu.

Protein p21(WAF1, Cip1, Sdi1) (dále jen p21) je prvním popsaným inhibitorem cyklin-dependentních kinas (cdk) a jako univerzální inhibitor je schopen inhibovat aktivitu všech

typů komplexů cyklin-cdk, přičemž nejúčinněji inhibuje protein-kinasovou aktivitu komplexů obsahujících cdk2, cdk3, cdk4 a cdk6 (El-Deiry a spol., 1993; Harper a spol., 1995). p21WAF1 je důležitým negativně regulačním faktorem zejména v G1 fázi buněčného cyklu, neboť inhibuje fosforylaci onkosupresorového proteinu Rb. Protein p21 je znám jako transkripční cíl pro nádový supresorový protein p53, zejména při poškození DNA, kdy p21 zajišťuje blok v G1 fázi (popř. i v G2 fázi) buněčného cyklu po aktivaci p53 proteinu. Aktivace transkripce p21 genu může však nastat i nezávisle na p53, kdy je koaktivátorem např. p300 protein. Pro inhibici aktivity cdk je nejdůležitější a postačující C-terminální oblast molekuly p21 (OBR.1), kde je jedno vazebné místo pro cyklin E a vazebné místo pro cdk 2 (Adams a spol., 1996; Chen a spol., 1996; Dotto, 2000). Druhé vazebné místo pro cyklin, které je v C-terminální oblasti, však není nutné pro inhibici cdk a buněčného cyklu (Wohlschleger a spol., 2001). Vazební místo pro PCNA (proliferating cell nuclear antigen) je rovněž v C-terminální části a není nutné pro inhibici cdk (Dotto, 2000).

V poslední době se ukazuje, že p21 protein má další funkce které jsou nezávislé na jeho schopnosti inhibovat aktivitu cyklin-cdk komplexů (Perkins, 2002; Coqueret, 2003). p21 se váže na několik transkripčních faktorů a inhibuje jejich funkci aktivovat cílové geny. Jde o transkripční faktory E2F1 (Delavaine a La Thangue, 1999), STAT3 (Coqueret a Gascan, 2000) nebo onkoprotein c-myc (Kitaura a spol., 2000). p21 protein inhibuje také transkripci z promoterů genů pro survivin, kdy represe exprese survivinu p53 proteinem je ve skutečnosti zprostředkována p21 proteinem (Lohr a spol., 2003), polo-like kinasu 1 a topoisomerasu II α (Zhu a spol., 2002), receptor pro TNF (Wang a spol., 2005), c-myc a cdc25A fosfatasu (Vigneron a spol., 2006) a Wnt4, kdy p21 je korepresorem transkripčního faktoru Notch1 při represí Wnt4 (Devgan a spol., 2005). V jiných případech funguje p21 protein jako typický transkripční koaktivátor, kdy stimuluje transkripci řízenou estrogenním receptorem (Fritah a spol., 2005; Redeuilh a spol., 2002) nebo faktorem NF κ B (Poole a spol., 2004). Není zcela

jasné, jakým mechanismem může p21 transkripci reprimovat nebo koaktivovat, ale zdá se pravděpodobné, že vstupuje do transkripčně-iniciačních komplexů jejichž složení nebo aktivitu potom pozitivně nebo negativně ovlivňuje, a byly popsány sekvenční motivy v promotorech pro polo-like kinasu a topoisomerasu nutné pro inhibici p21 proteinem (Zhu a spol., 2002). Jeden mechanismus transkripční aktivace proteinem p21 je již znám, ale pravděpodobně nevysvětluje všechny účinky p21 proteinu při transkripci, pouze funguje pro určité promotery. p300 koaktivátor má totiž i transkripčně-represorovou doménu, která je inaktivována p21 proteinem (Snowden a spol., 2000; Gregory a spol., 2002; Garcia-Wilson a Perkins, 2005). Ačkoliv p21 se neváže přímo na tuto doménu, oslabuje mechanismus represe, který souvisí s vazbou proteinů SUMO1-3 a následnou vazbou histon-deacetylasy 6 (HDAC6) (Girdwood a spol., 2003). Chang a spol. zjistili (Chang a spol., 2000), že indukovaná overexprese p21 proteinu v buňkách lidského fibrosarkomu (HT1080) má za následek kromě očekávaného poklesu exprese mnoha genů účastnících se replikace a buněčného cyklu i zvýšení exprese genů hrajících pravděpodobně úlohu v patogenezi nemocí jako je aterosklerosa, amyloidosa a některých degenerativních onemocnění. Tyto výsledky podporují hypotézu, že p21 není pouhým regulátorem buněčného cyklu, ale má aktivní úlohu při transkripci specifických genů.

Transkripce p21 genu je indukována během buněčné diferenciaci mnoha buněčných typů, např. oligodendrocytů (Zezula a spol., 2001), chondrocytů (Negishi a spol., 2001), stimuluje neuronální diferenciaci feochromocytových PC-12 buněk (Erhardt a Pittman, 1998a,b) a buněk promyelocytární leukemie (Casini a Pelicci, 1999). Naprostá většina těchto prodiferenciačních účinků se zdá být nezávislá na funkci p21 inhibovat buněčný cyklus. Protein p21 je také známý svou antiapoptotickou funkcí, která je asociovaná s jeho relokací do cytoplazmy. p21 je účinný inhibitor prokaspazy 3, která se účastní Fas-zprostředkované buněčné smrti. Fosforylovaný p21 vstupuje na mitochondriích do komplexu

s prokaspázou 3 a blokuje místo na jejím NH₂ konci, které by jinak štěpily cytoplasmické serinové proteinasy za vzniku aktivované kaspázy 3 (Suzuki a spol., 1999a, 1999b). Ale rovněž opačně, kaspasa 3 štěpí p21 a tím spouští apoptosu u buněk blokováných v G1 fázi buněčného cyklu (Zhang a spol., 1999). Při diferenciaci monocytů (Asada a spol., 1999) a neuronů (Tanaka a spol., 2002) a při diferenciaci F9 buněk (naše práce-viz níže) rovněž dochází k relokizaci p21 do cytoplasmy. Zdá se tedy, že p21, alespoň u některých buněčných typů, po zablokování buněčného cyklu v G1 fáze při procesu diferenciaci též inhibuje apoptosu diferencovaných buněk. Vyšší hladina p21 v nádorových buňkách by tedy mohla být i nežádoucí z hlediska zvýšeného přežívání nádorových buněk (Blagosklonny, 2002; Weiss, 2003). Paradoxně je tedy p21 protein, ačkoliv je inhibítozem proliferace, asociován s časnými nádorovými změnami např. u intraepiteliálního karcinomu pankreatu (Biankin a spol., 2001) nebo s horší prognózou u karcinomu prsu (Weiss, 2003; Winters a spol., 2003).

V předkládané práci byla studována diferenciaci buněk F9. Tyto buňky myšího embryonálního karcinomu jsou velmi vhodným modelem pro indukci diferenciaci v nádorových buňkách, které po diferenciaci prudce zpomalují proliferaci a ztrácejí rysy nádorových buněk. Nediferencované F9 buňky myšího embryonálního karcinomu se vyznačují vysokou proliferační rychlostí a schopností diferencovat do několika buněčných typů. Klíčovou úlohu v jejich diferenciaci má kyselina retinová (RA), která indukuje buňky k diferenciaci na buňky podobné primitivnímu endodermu. Protrahovaná diferenciaci pomocí RA má za následek konverzi buněk na buňky podobající se viscerálnímu endodermu. Za současného působení kyseliny retinové a stimulace cAMP signální dráhy jsou buňky diferencovány na parietální endoderm (Strickland a spol., 1980). Jejich diferenciaci je doprovázená sníženou proliferační rychlostí, morfologickými změnami a expresí markerů. V embryonálním vývoji se primitivní endoderm vyvíjí velmi časně jako extraembryonální

tkáň při vývoji blastocysty a diferencuje na parietální a viscerální endoderm. Buňky embryonálního karcinomu v mnohém připomínají embryonální kmenové buňky (např. expresí proteinů Oct 4 a nanog (Thompson a Gudas, 2002, Chen a spol., 2006), a při diferenciaci na primitivní endoderm indukované kyselinou retinovou mají pochopitelně klíčovou úlohu její receptory RAR a RXR, a zejména RAR α a RXR α jsou zcela nezbytné pro diferenciaci F9 buněk (Chiba a spol., 1997; Rochette-Egly a spol., 2000; Rochette-Egly a Chambon, 2001; Clifford a spol., 1996; Taneja a spol., 1997). Pro diferenciaci F9 buněk je nutný i koaktivátor transkripce p300 protein (a jeho paralog CBP protein), pravděpodobně proto, že fungují jako kofaktory několika jaderných receptorů včetně RAR (Chakravarti a spol., 1996; Kawasaki a spol., 1998). Pro diferenciaci na primitivní i parietální endoderm je typická exprese specifických diferenciačních markerů. Pro primitivní endoderm to je laminin B1, TPa (tissue plasminogen activator) a kolagen α -IV (Strickland a spol., 1980, Espeseth a spol., 1989). Při diferenciaci na parietální endoderm (PE) současnou stimulací cAMP signální cesty je typickým markerem trombomodulin (TM) (Weiler-Guettler a spol., 1992; Shirayoshi a spol., 1993, Niforas a spol., 1996). Protože při zpomalení proliferace po indukci diferenciace na PE jsme zjistili velmi silné zvýšení exprese proteinu p21, zejména v poslední fázi diferenciace, studovali jsme úlohu proteinu p21 při diferenciaci F9 buněk a výsledky jsou popsány dále.

b) MITF - klíčový transkripční faktor melanocytů a aktivátor exprese mnoha genů.

Transkripční faktor MITF (microphthalmia associated transcription factor) je klíčovým regulátorem embryonálního vývoje melanocytové linie z neurální lišty a aktivuje transkripci genů specifických pro diferenciaci melanocytů (Opdecamp a spol., 1997, Goding, 2000, Steingrimsson a spol., 2004). Gen byl identifikován při náhodném objevení se fenotypových

znaků podobných známým fenotypům myši s porušenou pigmentací, mikroftlamií a poruchami sluchu po inzerci jiného transgenu (Hodginson a spol., 1993; Hughes a spol., 1993). Struktura lidského genu pro MITF byla popsána záhy a MITF byl lokalizován na chromosom 3p (Tachibana a spol., 1994). MITF patří mezi transkripční faktory bHLH-LZ (basic-helix-loop-helix-leucine zipper), a to do podrodiny ve které jsou s tímto faktorem nejvíce homologní transkripční faktory TFE3, TFEB a TFEC (Hemesath a spol., 1994; Rehli a spol., 1999). U myši bylo popsáno mnoho mutantních alel s různými fenotypy (Hodginson a spol., 1993; Steingrimsson a spol., 1994; Moore, 1995; Hallsson a spol., 2000) a u člověka mutace MITF způsobuje Waardenburgův syndrom typu IIA (Tassabehji a spol., 1994). V centrální části molekuly MITF je basická oblast odpovědná za vazbu na DNA, za kterou následuje HLH a LZ (leucinový zip), tedy oblasti důležité pro dimerizaci (schéma molekuly je na Obr.2). MITF se jako typický transkripční aktivátor váže na sekvenci v DNA, tzv. M-box, obsahující E-box sekvenci (AGTCATGTGCT) přítomnou v promoterech genů většinou exprimovaných specificky v melanocytech (např. tyrosinasa, TRP-1 a TRP-2) (Bentley a spol., 1994; Hemesath a spol., 1994; Yasumoto a spol., 1994; Yasumoto a spol., 1997; Bertolotto a spol., 1998b), a to jako homodimer nebo event. heterodimer s příbuznými faktory TFE3 nebo TFEC (Hemesath a spol., 1994).

MITF existuje ve více sestříhových isoformách (ozn. A,B,C,D,E,H,J,M,mc) a každá je exprimována ze svého, tkáňově specifického promoteru a liší se jen prvním exonem, sestříženým ke společnému druhému exonu. Další exony jsou již společné pro všechny isoformy (Fuse a spol., 1996; Amae a spol., 1998; Fuse a spol., 1999; Udono a spol., 2000; Shibahara a spol., 2001; Oboki a spol., 2002; Takemoto a spol., 2002; Takeda a spol., 2002; Hershey a Fisher, 2005). Pro melanocyty je specifická forma MITF-M, kde je pouze prvních 11 aminokyselin specifických, a tento transkript je exprimován v pigmentových buňkách (kůže, oko, vnitřní ucho) a v melanomových buňkách (Fuse a spol., 1996). Není přesně

známo jak tento specifický NH₂-konec MITF isoformem ovlivňuje transkripční funkci proteinu, ale bylo popsáno, že amino-konec nezbytný pro aktivaci promotoru-reportéru pro tyrosinasy a NH₂-konec z isoformy specifické pro žírné buňky (mc) připojený na společné exony inhiboval aktivaci tohoto promotoru (Takemoto a spol., 2002).

Exprese MITF v melanocytech je aktivována několika transkripčními cestami. MITF promoter specifický pro melanocyty je aktivován souhrou minimálně 4 transkripčních faktorů (schéma promotoru pro melanocytární formu MITF je na OBR.3): Pax3, proteinem z rodiny Pax, obsahujícím párovou doménu i homeodoménu (Watanabe a spol., 1998), Sox10 transkripčním faktorem (z rodiny „high mobility group“) (Lee a spol., 2000; Potterf a spol., 2000, Verastegui a spol., 2000), CREB transkripčním faktorem, efektem cAMP-signální cesty (Bertolotto a spol., 1996; 1998a) a LEF-1, transkripční komponentou důležité cesty signální Wnt a β -catenin (Takeda a spol., 2000a; Saito a spol., 2003). Aktivace β -cateninem je fylogeneticky velmi konzervovaná a byla popsána i pro expresi genu *nacre*, homologu MITF u akvarijní ryby (Lister a spol., 1999; Dorsky a spol., 2000). Tyto transkripční faktory mají vazebná místa v těsné blízkosti na MITF promotoru a některé mohou působit synergisticky (např. Pax3 a Sox10). LEF-1 navíc přímo interaguje s MITF proteinem a tím posiluje transkripci i cílových genů pro které je MITF transaktivátorem (Yasumoto a spol., 2002). U lidských buněk posiluje transkripci i specifický vzdálený enhancer (Watanabe a spol., 2002).

MITF není pouze faktorem určujícím diferenciaci specifické tkáně, ale při jeho inaktivaci mutacemi dochází k bloku ve vývoji melanoblastů, které vymizí asi 2 dny po začátku exprese mutovaného neaktivního MITF (Opdecamp a spol., 1997). Recentní data ukazují dále na jeho úlohu pro přežívání melanomových buněk, pravděpodobně udržováním aktivních antiapoptotických a pro-proliferačních signálních cest aktivací exprese genů pro antiapoptotický protein *bcl-2* a cyklin-dependentní kinasu 2 (McGill a spol., 2002; Widlund a

Fisher, 2003; Du a spol., 2004). Toto pozorování bylo poněkud překvapivé, protože současně bylo popsáno, že mnoho typů nádorových buněk nevyžaduje pro proliferaci aktivitu cdk2, ale cdk 4 (Tetsu a McCormick, 2004). Závislost účinků β -cateninu a aktivity této u nádorů často deregulované cesty na expresi MITF byla ukázána v práci, kdy inhibice exprese MITF rušila proliferaci aktivitu exogenního β -catenin u melanomových buněk (Widlund a spol., 2002). MITF byl dokonce nalezen amplifikován v nádorových buněk u menší části případů melanomu (Garraway a spol., 2005), a jeho hladina je zvýšena u nádorových buněčných linií melanomu i ve vzorcích nádorové tkáně (King a spol., 1999), takže je pokládán za faktor nutný k přežívání melanomových buněk (Widlund a Fisher, 2003; Garraway a Sellers, 2006; Levy a spol., 2006), podobně jako je nutný pro přežívání embryonálních melanocytů a vývoj melanocytové buněčné linie v embryogenezi (výše). Bylo též popsáno, že MITF-M isoforma souvisí s větvenitou morfologií lidských melanomových buněk jež rostly v imunodeficitních „nude“ myších (Selzer a spol., 2002). V jiné práci bylo dosaženo pomocí exprese dominantně negativní alely s chybějící jednou aminokyselinou (R) v úseku nutném pro vazbu na DNA snížení exprese bcl-2 a zvýšení frakce apoptotických melanomových buněk expremujících tuto alelu (McGill a spol., 2002). Tyto výsledky si vynucují otázku zdali by měla kompletní inhibice funkce MITF, ať už vyřazením jeho exprese nebo zablokováním transkripce z cílových promoterů, vliv na dlouhodobější přežívání melanomových buněk a v naší práci jsme popsali možnost blokování transkripčně aktivační funkce MITF pomocí části molekuly adenovirového proteinu E1A (viz dále). MITF se tedy zdá být cílem pro genovou terapii a blokování exprese nebo funkce MITF může znamenat poruchu v antiapoptotických (deregulovaných) cestách v melanomových buněk. Nutno poznamenat, že existují MITF-negativní melanomové buněčné linie (i když jsou spíše výjimečné) které neexprimují ani další markery. Reexprese MITF v těchto liniích nevede k rediferenciaci ani k výrazným změnám v

proliferaci a tyto buňky tedy evidentně nepotřebují MITF a adoptovaly si zcela dediferencovaný, na MITF zcela nezávislý fenotyp (Vachtenheim a spol., 2001).

Jak již bylo uvedeno, MITF je exprimován ve zvýšených hladinách v melanomových buňkách, a proto je spolehlivým a velmi specifickým markerem. MITF protein byl imunohistochemicky detegován v naprosté většině vzorků primárních melanomů (King a spol., 1999; Dorvault a spol., 2001; King a spol., 2001; O'Reilly a spol., 2001; Miettinen a spol., 2001). Byla popsána statisticky významná korelace mezi výraznější imunohistochemickou pozitivitou a střední vertikální tloušťkou primárního nádoru (Salti a spol., 2000). Pro melanocyty je specifická isoforma MITF-M a tato isoforma, odlišitelná od ostatních isoform pomocí RT-PCR, je pravděpodobně nejspecifičtější markerem melanin-produkujících buněk (Vachtenheim a Borovanský, 2004 a citace zde). Cirkulující nádorové buňky byly diagnostikovány detekcí MITF, jenž je tedy i sensitivním markerem při detekci metastatické choroby (Samija a spol., 2004). Imunochemická detekce a zejména detekce pomocí RT-PCR s primery specifickými pro MITF-M isoformu se tak zdá být specifičtější než dosud používané markery pro melanom gp100 (protilátka HMB-45), MLANA, nebo tyrosinasa (Busam a spol., 2001).

MITF udržuje v melanocytech diferenciační program a aktivuje promotory mnoha genů (Cílové geny pro MITF jsou schematicky znázorněny na Obr.4), které jsou buď přímo enzymy v biosyntéze pigmentu, jako jsou tyrosinasa, TRP-1 a TRP-2 (tyrosinase-related proteins 1 a 2), nebo jsou specifickými markery melanocytů, tj. MLANA (MART1, Melan-A), gp100(SILV, PMel17), melastatin, dále HIF-1 α a Tbx-2 (Bentley a spol., 1994; Yasumoto a spol., 1994; Aksan a Goding, 1998; Bertolotto a spol., 1996; Tachibana a spol., 1996; Bertolotto a spol., 1998a; Bertolotto a spol., 1998b; Carreira a spol., 2000; Du a spol., 2003; Miller a spol., 2004; Busca a spol., 2005; Goding a Meyskens, 2006). Dalšími cílovými geny jsou již zmíněné bcl-2 a cdk2 (výše), ale též c-met (McGill a spol., 2006), jehož aktivita je

často aberantně aktivována v melanomových buňkách. MITF je paradoxně aktivátorem dvou inhibitorů buněčného cyklu a cdk p16/INK4A (Loercher a spol., 2005) a p21 (Carreira a spol., 2005), a tato regulace má pravděpodobně význam v normálních melanocytech při kontrole G1 fáze buněčného cyklu. Tumor supresorová cesta Rb-cdk4-p16 je však u melanomu téměř vždy deregulována (Maelandsmo a spol., 1996) (a p16 je supresorovým genem inaktivovaným u případů familiárních forem maligního melanomu) a exprese p21 proteinu byla rovněž nalezena vysoká v maligních melanocytech v buněčné kultuře i v histopatologických vzorcích (Vidal a spol., 1995, Trotter a spol., 1997, Poyraz a spol., 2004). Důležité je recentní zjištění ukazující na pozitivní regulaci DIAPH1 genu (kódující protein Dia1 jenž se podílí na reorganizaci cytoskeletu) MITF proteinem (Carreira a spol., 2006). Nízké hladiny MITF mají za následek i sníženou hladinu Dia1 a zvýšenou invazivitu melanomových buněk, současně však i sníženou proliferaci vlivem snížené degradace p27, inhibitoru cdk (Carreira a spol., 2006). MITF tak působí anti-invazivně, ale pro-proliferálně v melanomových buňkách. Transkripční aktivace MITF faktorem byla studována převážně v promotor-reportérových systémech a mechanismus aktivace endogenních genů není přesně znám. Bylo ukázáno, že MITF je skutečně nutný pro aktivaci dvou endogenních genů (tyrosinasa a TRP-1) v melanocytech a myších melanomových buňkách, potvrzující tak důležitost MITF pro transkripci promotorů v chromatinu, avšak MITF nebyl postačujícím faktorem a transkripci těchto genů není možné zvýšit stimulací exogenním MITF (Gaggioli a spol., 2003). Pro indukci exprese tyrosinasy po ozáření UV světlem je místo MITF důležitější transkripční faktor USF1 (rovněž z rodiny bHLH), aktivovaný stress-kinasou p38 (Galibert a spol., 2001).

Velmi málo je známo o kofaktorech, které se účastní transkripce řízené MITF faktorem. Kofaktorem pro transkripčně-aktivační funkci MITF byl zatím popsán pouze protein p300 (a příbuzný CBP), jenž jsou koaktivátory transkripce pro mnoho transkripčních faktorů. MITF

se váže s p300/CBP in vitro a in vivo (Sato a spol., 1997; Price a spol., 1998) a jeho vazba na p300 je v buňkách řízena fosforylací na serinu 73 (Price a spol., 1998; Hemesath a spol., 1998; Wu a spol., 2000). V naší práci jsme však popsali, že inhibovat aktivitu MITF na endogenním cílovém promoteru je možné i bez inhibice funkce p300/CBP (příloha 5). Zcela nedávno bylo popsáno, že β -catenin je nejen aktivátorem transkripce samotného MITF promoteru, ale MITF protein interaguje i přímo s β -cateninem a této vazby využívá k selektivní transaktivaci svých cílových promoterů (Schepsky a spol., 2006). Recentní je též zjištění, že chromatin-remodelující komplex SWI/SNF je nutný pro expresi některých z MITF-dependentních genů (DeLaSerna a spol., 2006). Poznání mechanismu a kofaktoru(ů) jenž se účastní MITF-řízené transkripce je tedy předmětem dalšího studia a objasnění těchto mechanismů může přispět k možnosti cíleně inhibovat funkci MITF a tím blokovat proliferaci a aberantně zesílené antiapoptotické signály v melanomových buňkách.

Molekula MITF je substrátem pro několik kinas (Hemesath a spol., 1998; Wu a spol., 2000; Vance a Goding, 2004) a zejména fosforylace na serinu 73 se zdá být důležitým regulačním mechanismem pro transkripční aktivitu. ERK2-fosforylovaný MITF (na S73) preferenčně asociuje s koaktivátorem p300 (Hemesath a spol., 1998; Price a spol., 1998). Na C-konci molekuly (serin 409) je akceptorové místo pro fosforylaci RSK kinasou. Tato fosforylace, spolu s fosforylací na S73, je důležitá pro stabilitu MITF proteinu, neboť MITF fosforylovaný na obou místech je rychleji degradován (Wu a spol., 2000). Souvisí to s preferenční ubiquitinací (na lysinu 201) a sumoylací (na lysinu 182) těchto fosforylovaných forem a jejich následnou zrychlenou degradací proteasomovým systémem (Xu a spol., 2000, Wu a spol., 2000, Miller a spol., 2005). Další fosforylace (na S298 GSK kinasou) zvyšuje aktivitu MITF, pravděpodobně zesílením vazby na DNA (Takeda a spol., 2000b) a S307 (p38 stres-kinasou) po aktivaci signální cesty aktivující transkripční factor NF κ B (Mansky a spol.,

2002). MITF je i specifickým substrátem pro několik kaspas, kdy se molekula proteinu štěpila na C-konci a menší fragment měl pro-apoptickou aktivitu (Larribere a spol., 2005).

c) Onkoprotein E1A adenoviru – transkripční represor

Adenovirový onkoprotein E1A je multifunkční protein který se váže na Rb protein a další členy Rb rodiny, a rovněž na transkripční koaktivátory p300 a CBP, vykazující histon acetyltransferasovou aktivitu (Vo a Goodman, 2001; Mayr a Montminy, 2001), TBP (TATA-binding protein), a TRRAP, koaktivátor transkripce rovněž s histon acetyltransferasovou aktivitou (McMahon a spol., 1998; Deleu a spol., 2001). E1A je dále schopen přímo vázat i dva p300-vázající proteiny, transkripční koaktivátory a histon-acetyltransferasy PCAF a hGCN5 (Frisch a Mymryk, 2002 a citace zde; Gallimore a Turnell, 2001). Dvě hlavní sestříhové formy E1A proteinu se liší pouze oblastí CR3 (conserved region 3), která je silnou aktivační doménou. Větší protein, tzv. 13S, tuto doménu obsahuje, zatímco menšímu proteinu, 12S protein, tato doména chybí a je silným transkripčním represorem mnoha genů. Pro biochemické a biologické funkce 12S E1A onkoproteinu (protein má 243 aminokyselin), tj. transkripční represe mnoha genů specifických pro diferenciaci, indukce syntézy DNA, imortalizace buňky, dediferenciace a transformace v součinnosti s dalším onkogenem (např. ras), jsou nezbytné 3 oblasti molekuly, a to N-konec (aminokyseliny 2-36), CR1 (conserved region 1, aminokyseliny 40-80) a CR2 (aminokyseliny 120-140) (schéma molekuly E1A je na obr. 2 v příloze 3). CR2 oblast je nutná pro vazbu Rb (a dalších členů skupiny) a její delece nemá žádný vliv na vazbu dalších výše uvedených faktorů - transkripčních koaktivátorů a histon-acetyltransferas. Pro vazbu na p300 a CBP v buňkách je nutná oblast 4-25 (a R v posici 2), a pro vazbu na TRRAP je nutná část 26-35. Transkripční kofaktor TRRAP je nutný při

transformaci buňky c-myc onkogenem a E1A genem (Park a spol., 2001; Frisch a Mymryk, 2002).

Myší melanocyty je možné transformovat nebo imortalizovat několika onkogeny (Dotto a spol., 1989; Halaban a spol., 1996), mezi nimi i adenovirovým onkogenem E1A. Melanocyty exprimující E1A protein jsou dediferencované, neexprimují MITF ani markery melanocytů (Yavuzer a spol., 1995, Halaban a spol., 1996). Protože MITF je kritickým faktorem nutným pro vznik a přežívání embryonálních melanocytů (viz výše) a podle recentních sdělení se zdá, že by mohl mít tuto funkci v melanomových buňkách (Levy a spol., 2006; McGill a spol., 2002; Widlund a Fisher, 2003), E1A-exprimující melanocyty tedy získaly při imortalizaci možnost autonomního růstu i bez exprese MITF, evidentně vlivem celkového reprogramování transkripce spojeného s komplexní změnou fenotypu po expresi E1A. Tyto melanocyty se však fenotypově již pigmentovaným buňkám nepodobají, obdobně jako MITF-negativní melanomové buněčné linie. Mechanismus represe promoteru pro MITF a cílových promoterů které jsou transkripčními cíli pro MITF onkoproteinem E1A není znám. V předkládané práci byl využit E1A onkoprotein jako nástroj pro transkripční represi MITF promoteru i cílových promoterů pro MITF.

2. Vymezení cíle práce

V obecnějším kontextu porozumnění vztahu diferenciaci a nádorové transformaci konkrétních buněčných typů a identifikace molekulárních mechanismů porušené diferenciaci při transformaci může vést k lepšímu pochopení molekulární patogeneze nádorové transformace buňky. V první části předkládané práce je studován model buněk myšího embryonálního karcinomu, ve kterých je možné chemicky indukovat diferenciaci. Tyto F9

buňky, ve kterých indukovaná diferenciaci současně vede k inhibici proliferace a ztrátě tumorigenicity, jsou tedy ideálním případem, kdy tumorigenicita je vázána pouze na nediferencovaný stav buněk. Zajímalo nás tedy, jaké jsou mechanismy zpomalení proliferace při diferenciaci F9 buněk na PE s cílem identifikovat jakými mechanismy je blokována proliferace při indukované diferenciaci na PE, popř. zda inhibitory cyklin-dependentních kinas mají i další význam přímo při diferenciaci F9 buněk na PE. V této části práce byl zjištěn p21 protein jako významný regulátor diferenciaci F9 buněk (jak je podrobně popsáno v kapitole Výsledky) a proto nás dále zajímalo, zda může mít podobnou pro-diferenciační úlohu i v jiných typech buněk. Transformované melanocyty tvoří vhodný model pro studium biochemické diferenciaci, která je u nádorových melanocytů převážně zachována a „dediferenciaci“ je omezena spíše na výrazné morfologické změny. p21 protein je překvapivě exprimován v melanomových buňkách, někdy i v poměrně vysokých hladinách, a přesto proliferace těchto nádorových buněk není inhibována, a proto by se p21 mohl účastnit transkripční regulace genů specifických pro melanocyty. Již bylo dříve známo, že p21 může mít úlohu kofaktoru při transkripční regulaci, a to nezávisle na regulaci buněčného cyklu (viz Úvod). Cílem tedy bylo zjistit, zda p21 by mohl mít podobnou roli i v melanomových buňkách, ve kterých je jeho exprese ve většině případů zachována. Skutečně jsme pak zjistili jeho pozitivní úlohu při transkripci z MITF promoteru.

Dalším cílem bylo objasnit mechanismus transkripční aktivace promoterů, jejichž aktivita je závislá na transkripčním faktoru MITF. Tento transkripční faktor stojí v centru transkripční regulace melanocytů a lepší poznání mechanismu jeho transaktivační funkce na cílových promoterech může přispět k cílenému zásahu inhibicí této aktivity v melanomových buňkách, neboť MITF je nutný pro přežívání transformovaných melanocytů. Jedním z transkripčních cílů pro MITF je rovněž p21, a spektrum genů MITF-řízené exprese v melanocytech se stále rozšiřuje. O koaktivátorech transkripce těchto MITF faktorem aktivovaných genů je známo

velmi málo a dosud se předpokládalo, že koaktivátory jsou p300 a CBP histon-acetyltransferasy. Jako nástroje studia mechanismu transkripční aktivace vybraných cílových promoterů jsme použili mutant E1A proteinu, které se specificky váží a tím inaktivují jen určité koaktivátory. Cílem bylo zjistit, jak probíhá transkripční aktivace cílových promoterů na plasmidovém (transfektovaném promoteru) a transkripce endogenního cílového promoteru a zda p300/CBP jsou skutečně nezbytné kofaktory této transaktivace, a dále jsme chtěli určit zda E1A protein reprimuje i samotný promoter pro MITF gen a jaké mutanty E1A jsou postačující pro tuto represi. Dalším úkolem bylo určit, zda je možné využít E1A proteinu jako transkripčního represoru při transkripci řízené faktorem MITF a zde jsme skutečně zjistili autonomní schopnost CR1 domény reprimovat MITF-indukovanou transkripci. K této části práce patřil i úkol identifikovat další možné transkripčně aktivační domény v MITF molekule a jejich úlohu při aktivaci cílového endogenního promoteru, a rovněž zkonstruovat dominantně negativní mutantu MITF, která bude inhibovat funkci endogenního MITF v melanomových buňkách.

3. Použité metody

Plasmidy, expresní a promoterové konstrukty. Pro přípravu různých plasmidových konstrukcí byly použity běžné metody rekombinantní DNA v plasmidech, většinu delecí a mutací jsme připravili pomocí PCR, některé pomocí QuickChange Mutagenesis kit (Stratagene). Podrobnosti k plasmidovým konstrukcím jsou uvedeny v jednotlivých přílohách. Připravili jsme i různé reportérové plasmidy, např. s tyrosinasovým promoterem (Bentley a spol., 1994), TM promoterem (Niforas a spol., 1993), melastatinovým promoterem (Miller a spol., 2004) nebo MITF promoterem (Fuse a spol., 1996). Konstrukty

byly ověřeny sekvenováním, expresní konstrukty i pomocí IVT (in vitro translaci s 35S-methioninem) a při pokusech na buňkách ověřena exprese W. blottingem. Konstrukty s GAL-DNA vazebnou doménou obsahují tuto doménu kvasinkového GAL4 proteinu (aminokyseliny 1-147), která ve správném čtecím rámci přechází na sekvenci příslušného genu. Pro expresi rekombinantních fúzních proteinů byly použity plasmidy s GST (glutathion S-trasferasa) pGEX-4T1 nebo pGEX-2TK (Amersham Biosciences) a rovněž ve čtecím rámci přecházející v sekvenci příslušného genu (MITF, E1A a další). Příprava chimerických proteinů E1A-MITF je popsána v příloze 5. V těchto fúzních konstrukcích byly do místa ve kterém byla původně N-koncová aktivační doména MITF naklonována (“in frame”) sekvence N-konce E1A nebo CR1 domény E1A proteinu. C-koncová transaktivační doména MITF je v těchto konstruktech odstraněna. Expresní plasmidy pro expresi v lidských buňkách byly klonovány většinou v plasmidu pCDNA3 (InVitrogen), popř. pFLAG-CMV-4 (Sigma) pro expresi FLAG-sekvencí označených proteinů. Některé plasmidy byly získány z jiných laboratoří a jsou zmíněny v oddílech material a metody příslušných příloh. Podrobnější popis těchto plasmidů je též uveden v příslušných přílohách. Ověření plasmidových konstrukcí sekvenováním obou řetězců DNA bylo provedeno na automatickém sekvenátoru (Ústav molekulární genetiky AVČR).

Transfekce a reportérové studie. Buňky byly transfektovány většinou metodou Ca-PO₄ koprecipitace (např. U2-OS, H1299, C33A, 293), některé typy buněk Lipofectaminem 2000 (InVitrogen). Reportérové plasmidy měly jako reportérový gen luciferasu, některé normalizace na účinnost transfekce byly provedeny kotransfekcí genu pro β-galaktosidasu s následným měřením její aktivity v buněčném extraktu, některé pro R-luciferasu a pak měřeny jako hodnoty dual-luciferase (dle instrukcí Promega). Aktivita luciferasy byla měřena na luminometru Turner Designs TD-20/20.

RT-PCR a kvantitativní RT-PCR, Southern blotting. Jako citlivé metody pro detekci transkriptu tyrosinasy a thrombomodulinu jsme použili kvantitativní RT-PCR. Po reverzní transkripci pomocí enzymu Superscript II (InVitrogen) byly PCR produkty v exponenciální fázi rozděleny elektroforesou a kvantifikovány po hybridizaci s příslušnou sondou radioaktivně označenou pomocí α -³²P-dCTP (přílohy 1, 5 a 6), popř. byl PCR produkt přímo detegován barvením agarosového gelu. PCR byla provedena minimálně dvěma nezávislými primerovými páry a produkt hybridizován se značenou sondou odpovídající úseku uvnitř PCR produktu. Metody byly optimizovány na počet PCR cyklů a srovnány s titracemi pozitivních kontrol. Byla ověřena lineární závislost síly signálu s množstvím RNA použité pro reverzní transkripci.

Western blotting. Proteiny byly rozděleny vertikální elektroforesou polyakrylamidovém gelu (většinou 10%) podle standardní metodiky a proveden "mokrý" blotting v transferovém pufru obsahujícím 10% metanol na membránu Immobilon P (Millipore). Byly použity běžné postupy detekce proteinů na Western blotech, k vizualizaci blotů byl použit ECL system (Amersham Biosciences) nebo druhá protilátka značená biotinem s následnou detekcí streptavidin-peroxidasovým konjugátem (Roche). Použité protilátky byly většinou od firem Santa Cruz Biotechnology nebo Pharmingen a jsou popsány v příslušných přílohách.

Imunofluorescence. Byla použita pro detekci p21 proteinu, MITF proteinu endogenního i transfektovaného, exprese E1A mutant, atd. Po fixaci 3% formaldehydem a permeabilizaci byly buňky barveny příslušnou protilátkou a druhou FITC-značenou protilátkou. Obrázky byly snímány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX. Pomocí imunofluorescence byla určována subcelulární lokalizace MITF a jeho mutant, E1A-MITF chimerických konstruktů a p21 proteinů. Jádra byla barvena DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) obsaženém v montovacím médiu.

Kultivace buněk. Většina linií byla kultivována v médiu DMEM s 10% fetálním telecím sérem (FCS) (např. F9 buňky, U2OS, 293 a H1299), melanomové linie lidských buněk v E-MEM s 10% FCS, a 501mel melanomové buňky v médiu RPMI1640 s 10% FCS. Média obsahovala antibiotika a příslušné suplementy. Buňky F9, U2OS, 293 a H1299 a několik melanomových linií (SK-MEL-5, SK-MEL-2, RPMI7951, MeWo, a myší melanomová linie B16-F1) byly zakoupeny od ATCC (American Type Culture Collection), další linie byly z jiných laboratoří (501mel melanomová linie od Dr. R. Halaban, Yale University, Hbl a B16-F10 od Prof. G. Ghanema, Universite Libre Brusel).

siRNA “knock-down”. siRNA duplexy proti myšimu p21 (cílové sekvence v příloze 1) byly zakoupeny od firmy Dharmacon. Konstrukty pro stabilní expresi shRNA proti lidskému p21 byly zkonstruovány v plasmidech pSUPER.puro, event. pSUPERretro.puro podle instrukcí dodavatelské firmy (Oligoengine). Cílové sekvence RNA, obsažené v oligonukleotidech navržených pro shRNA jsou uvedeny v příloze 2. Kontrolní plasmid exprimoval shRNA se “scrambled” sekvencí, která se nenachází v žádné lidské mRNA. Antisense konstrukt pro myší p21 obsahoval cDNA sekvenci v plasmidu pCDNA3 v opačné orientaci.

Interakce protein-protein in vitro a in vivo. In vitro vazba protein-protein byla testována metodou “pull-down” s GST-fusion proteiny, připravenými v bakteriálním kmenu E. Coli BL21Star(DE3)LysS (InVitrogen). Příprava bakteriálních extraktů a “pull-down” jsou podrobně popsány v příloze č 5. Tam je popsáno i provedení “pull-down” vazebné reakce. Tato reakce detegující in vitro interakci protein-protein byla provedena v pufru obsahujícím 20 mM TRIS pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 10% glycerol, 1 mM DTT, and 1 mM 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF). Proteiny značené ³⁵S-methioninem byly připraveny pomocí in vitro transkripce/translace (IVT) kitem firmy Promega.

EMSA (electromobility shift assay, gel-shift). Vazba IVT proteinů na DNA vazebný motiv pro MITF (E-box z oblasti iniciátoru promoteru lidského tyrosinasového genu) a elektroforesa v nativním gelu byly provedeny jak popsáno v příloze č. 6. Pufír pro vazebnou reakci ³²P-značené próby (sekvence +1 až +21 z lidského tyrosinasového promoteru obsahující E-box u iniciátorové sekvence, popř. mutovanou sekvenci) neobsahoval jako nespecifickou DNA poly(dI-dC), ale sonikovanou lososí DNA.

Kinasová aktivita cdk. V imunoprecipitátech získaných po imunoprecipitaci protilátkami proti cdk2, p21 a cyklinu E byla detegována protein kinasová aktivita s histonem H1 jako substrátem (příloha 1). Byl použit gamma-³²P-ATP. Výsledné fosforylované proteiny byly rozděleny elektroforesou a detegovány autoradiografií.

Průtoková cytometrie. Buňky byly trypsinizovány, 2x promyty PBS a fixovány v etanolu a ponechány 2-7 dnů při +4°C. Barvení propidium iodidem bylo provedeno po promytí buněk PBS a inkubaci s RNAsou A. Analýza profilu buněčného cyklu byla provedena na průtokovém cytometru FACScalibur (Beckton Dickinson) softwarem CellQuest a data analyzována v programu ModFit.

4. Výsledky

a) Úloha inhibitoru cyklin-dependentních kinas p21(WAF1/Cip1) při diferenciaci buněk myšího embryonálního karcinomu (F9) na parietální endoderm.

Sledovali jsme expresi proteinů spojených s buněčným cyklem a diferenciací F9 buněk, které diferencovaly pomocí RA+dbcAMP na buňky podobné parietálnímu endodermu (PE). Expresi jsme sledovali 6 dnů. Po této době jsou již buňky diferencovány na PE. Při sledování

diferenciace F9 buněk jsme zjistili, že z proteinů, které se účastní regulace buněčného cyklu, vykazuje nejvýraznější změnu cyklin dependentní kinázový inhibitor p21 (Obr. 1 v příloze 1). Hladina tohoto cdk inhibitoru je velmi nízká v nediferencovaných F9 buňkách a stoupá postupně během diferenciace indukované kyselinou retinovou (RA) a stabilním analogem cAMP (dibutyryl-cAMP). Na konci diferenciace (5. - 6. den) je již hladina mnohonásobně zvýšena, a aktivita cdk2 je snížena, ale mnohem méně výrazně (Obr. 1 v příloze 1). K poklesu aktivity cdk2 pravděpodobně přispívá kromě p21 i mírněji zvýšená hladina cdk inhibitoru p27 (Obr. 1 v příloze 1). Očekávaně nastává i akumulace obou proteinů, p21 i p27, v anti-cyklin E a anti-cdk2 imunoprecipitátech. K akumulaci p21 proteinu v diferencovaných buňkách přispívá zvýšení hladiny jeho mRNA i snížená degradace proteasomovým mechanismem (Obr. 2 v příloze 1). Sledovali jsme, zda by p21 mohl mít ještě jinou funkci (kromě inhibice buněčného cyklu) během diferenciace.

K určení významu vysoké hladiny proteinu při diferenciaci byly získány klony F9 buněk ektopicky exprimující vysokou hladinu p21 už v nediferencovaném stavu (Obr. 2 v příloze 1). U nich však nebyly detekovány markery typické pro diferencované buňky (Obr. 3 v příloze 1), takže sám protein diferenciaci nenavozuje ani neurychluje. Ačkoli je hladina p21 proteinu i jeho mRNA u těchto p21-exprimujících klonů vysoká již v nediferencovaných F9 buňkách, průběh diferenciace na PE a kinetika exprese markerů lamininu B1 a kolagenu α -IV je podobná jako u nativních F9 buněk (Obr. 3 v příloze 1). Profil buněčného cyklu z průtokové cytometrie těchto nediferencovaných klonů se od kontrolních F9 buněk liší jen lehce zvýšeným počtem buněk v G2 fázi. Byl také získán klon s ektopicky exprimovanou antisense p21 cDNA, který měl v diferencovaném stavu sníženou hladinu endogenního proteinu. Jeho profil buněčného cyklu se liší od kontrolních F9 buněk tím, že největší frakce buněk se nachází ve fázi G2/M a objevila se i větší sub-G1 fáze indukující větší frakci apoptotických buněk na konci diferenciace (OBR. 5 a též Obr. 2 v příloze 4).

V souvislosti s rostoucí hladinou p21 během diferenciaci byla sledována také jeho buněčná lokalizace. Zatímco v nediferencovaných buňkách, které se vyznačují vysokou proliferací, byl p21 lokalizován jen v jádře, u diferencovaných buněk dochází k částečné relokaci do cytoplazmy, jak je ukázáno na OBR.6 (a též Obr. 4 v příloze 1). S tímto kompartmentem je asociovaná jeho známá antiapoptotická funkce (Suzuki a spol., 1999a,b).

Pro diferenciaci F9 buněk na parietální endoderm je charakteristická exprese trombomodulinu (Weiler-Guettler a spol., 1992). Proto byl v reporterových studiích sledován vliv p21 na expresi tohoto specifického markeru. Transfekce exogenního p21 aktivovala trombomodulinový promotor-reportér v nediferencovaných i diferencovaných F9 buňkách a p21 Δ , obsahující delecí N-koncového cyklin-vázacího motivu, rovněž aktivoval promotor (OBR. 7 a Obr. 5 v příloze 1). Naopak, pokud došlo k potlačení exprese endogenního p21 transfekcí p21-antisense konstruktů nebo p21-siRNA duplexy v diferencujících se F9 buňkách, snížila se i aktivita trombomodulinového promoteru-reportéru. Účinnější byl v tomto případě antisense-p21 konstrukt a k represí došlo i bez přítomnosti db cAMP (Obr. 5 v příloze 1).

Zjistili jsme i vliv p21 na zvýšení exprese endogenního trombomodulinu. Klon s vysokou exogenní expresí p21 byl diferencován nejprve pouze v přítomnosti RA (4 dny) a poté indukován přidáním db cAMP k diferenciaci na PE. Pomocí RT-PCR byla zjištěna vysoká hladina exprese endogenního trombomodulinu v porovnání s kontrolními F9 buňkami (OBR. 7). Klon overexprimující p21 vykazoval v posledních dvou dnech diferenciaci výrazně vyšší hladinu endogenního trombomodulinu než kontrolní klon, přičemž celková hladina p21 proteinu byla zvýšena mírněji (Obr. 5 v příloze 1). To ukazuje na závislost exprese trombomodulinu na hladině p21 proteinu při diferenciaci F9 buněk na PE. Dále jsme zjistili, že transfekce p21 také zvyšovala aktivitu konstruktů GAL-p300(1-1303), který byl testován jako aktivátor trombomodulinového promoteru s vazebnými GAL místy (Obr. 6 v příloze 1).

To naznačuje, že p21 může působit na transkripci přes derepresi p300 N-terminální represorové domény a zvyšovat tak funkci p300 koaktivátoru (Snowden a spol., 2000; Girdwood a spol., 2003), jak byla tato možnost transkripční koaktivace popsána v úvodu a je schematicky ukázáno na Obr.8. V kontrolní transfekci GAL-p21 neměl vlastní aktivitu, a tedy p21 neaktivuje nespécificky transkripci, je-li “připoután” arteficielně k promoteru (Obr. 6 v příloze 1).

V této části práce jsme tedy zjistili úlohu p21 proteinu při diferenciaci F9 buněk na PE. Tato úloha kromě inhibice buněčného cyklu v diferencovaných buňkách může spočívat v pozitivní regulaci exprese markerů PE, jak jsme zjistili v případě trombomodulinu. Protože tato aktivace je specifická pro diferenciaci na PE, která závisí na hladině cAMP nebo jeho analogů, p21 může mít i obecný pozitivně regulační účinek při zesílení cAMP signální cestou indukované transkripce (viz Diskuse). Výsledky této části práce byly presentovány též na kongresu (příloha 7).

b) p21(WAF1/Cip1) je exprimován v melanomových buňkách a aktivuje promoter pro MITF, klíčový transkripční regulátor melanocytů

Inhibitor buněčného cyklu p21 protein je exprimován ve vysokých hladinách u velkého procenta melanomových linií (Obr. 1 příloze 2), dokonce i v rychle proliferujících buňkách, což je v kontrastu s funkcí p21 jako inhibitoru buněčného cyklu (viz výše a citace v příloze 2). Ukázali jsme, že p21 protein je exprimován i v normálních lidských melanocytech v buněčné kultuře, a jeho exprese byla překvapivě vyšší v melanocytech málo pigmentovaných, které proliferují asi 2-3x rychleji než silně pigmentované melanocyty (Obr. 1 v příloze 2). Protože p21 protein má transkripční účinky nezávislé na jeho úloze při regulaci buněčného cyklu (viz

Úvod), testovali jsme, zda transfekce expresního plasmidu pro p21 má vliv na transkripci melanocytově specifických promoterů v promoter-reportérovém systému. Zjistili jsme, že v melanomových buňkách dvou linií (MeWo a SK-MEL-28) p21 pozitivně reguluje transkripci, a to tím, že stimuluje jednak MITF promoter, jednak 3 cílové promotery pro MITF, a to promoteru pro tyrosinasový gen, melastatin a TRP-1 (Obr. 2 v příloze 2). Zjistili jsme i oblasti molekuly p21 zodpovědné za tyto účinky. C-koncová oblast, vážící PCNA je zcela postradatelná (stačí aminokyseliny 1-133) (Obr. 3 v příloze 2), a proto pozorovaná transkripčně-regulační funkce je odlišná od aktivace (dereprese) koaktivátoru p300, pro kterou je nutná právě C-koncová oblast p21 (Gregory, 2002; Garcia-Wilson a spol., 2005). To je dále podpořeno pozorováním, že histon deacetylase HDAC6, která při overexpressi reprimuje p21-stimovanou transkripci GAL-p300 proteinem (Girdwood a spol., 2003), nereprimuje p21-stimulovanou aktivitu MITF promoteru (Obr. 4 v příloze 2). Zjistili jsme dále, že vazebné místo pro cyklin E na N-konci p21 je nutné pro aktivaci, zatímco vazebné místo pro cdk2 je postradatelné (Obr. 3 v příloze 2). Rovněž jsme zjistili, že v melanomových liniích je až na výjimky nízká aktivita cdk2 kinasy (v komplexu cyklin E-cdk2) a p21-negativní linie je stále možné zablokovat v G1 fázi buněčného cyklu pomocí transferu p21 nebo fúzního proteinu GFP-p21 (není zde ukázáno), a zachovaly si tedy citlivost k p21 podobně jako většina nádorových buněk a všechny nenádorové buňky. Abychom vyloučili nespecifický aktivační vliv p21 proteinu, je-li arteficiálně „připoután“ na promotor pomocí DNA vazebné domény z GAL4 proteinu, exprimovali jsme GAL-p21 fúzní protein při kotransfekci umělého promoteru-reportéru, obsahujícího GAL4-vazebná místa a TATA box. Tento promoter byl mírně inhibován p21 proteinem, tedy účinek byl opačný než u MITF promoteru (Obr. 5 v příloze 2). Navíc p21 silně inhiboval survivinový promoter, což bylo popsáno dříve (Lohr a spol., 2003), a v souvislosti s našimi experimenty to opět ukázalo, že transkripční účinky p21 jsou přísně specifické, kdy overexprese p21 způsobuje buď aktivaci

(MITF promoter) nebo inhibici (survivinový promoter). Dále jsme stabilně transfektovali konstrukty exprimující specifickou shRNA proti p21 proteinu do melanomových buněk SK-MEL-5 a selektovali klony. Několik klonů se silně sníženou hladinou p21 proteinu jsme pak analyzovali. Tyto klony měly překvapivě zpomalenou proliferační křivku (Obr. 6 v příloze 2), ukazující podobně jako v normálních melanocytech na pozitivní korelaci hladiny p21 proteinu a rychlosti proliferace. Mírně snížena byla i hladina MITF proteinu v klonech se sníženou hladinou p21 (není ukázáno). Zdá se tedy, že endogenní p21 skutečně nemá funkci inhibovat buněčný cyklus v buňkách melanocytové linie, ale může zde mít důležitější úlohu pozitivně regulovat expresi MITF a tím i dalších diferencičně-specifických genů a posilovat anti-apoptotický potenciál melanomových buněk. K této části práce ještě dokončujeme CHIP experimenty (chromatin imunoprecipitace), které ukazují, že p21 je rekrutován na promotor MITF a analýzu exprese endogenního MITF po virovém přenosu p21(1-133NLS), tedy p21 s deletovaným C-koncem a s přidáním jaderným lokalizačním signálem. Positivní asociaci p21 s MITF promotérem pomocí CHIP jsme již zjistili, což podporuje hypotézu o koaktivační funkci p21 při transkripci MITF a ukazuje na pozitivní zpětnovazebné zesílení exprese p21-MITF, neboť nedávno bylo popsáno, že p21 je dalším transkripčním cílem pro MITF (Carreira a spol., 2006). Tato práce bude dokončena a odeslána k publikaci v nejbližší době. Tyto výsledky jsou dalším příkladem funkce p21 jako regulátoru transkripce nezávisle na inhibici cdk aktivity, a jsou navíc nezávislé na funkci p21 jako blokátoru represorové domény p300/CBP transkripčních koaktivátorů. Některé výsledky této části práce byly presentovány na kongresu CSHL o eukaryotické transkripci (příloha 8).

c) Adenovirový E1A onkoprotein inhibuje MITF-dependentní transkripci i expresi samotného MITF

Represe funkce nebo exprese MITF v melanomových buňkách může znamenat nový přístup ke genové terapii melanomu, neboť MITF je klíčový transkripční factor nutný pro přežívání nejen embryonálních melanoblastů, ale i melanomových buněk, a je tedy považován za onkogen transformovaných melanocytů (Widlund a Fisher, 2003; Garraway a Sellers, 2006; Levy a spol., 2006). Protože MITF je reprimován po expresi adenovirového onkoproteinu E1A v melanocytech, zajímal nás přímý účinek E1A proteinu na melanocytově-specifický MITF promoter. Melanocyty exprimující E1A jsou zcela dediferencované a přežívají pravděpodobně díky imortalizujícímu účinku E1A (viz Úvod). Použili jsme lidský MITF promotor s luciferasou jako reportérovým genem a sledovali jsme účinek kotransfekce E1A a různých E1A mutantů na aktivitu promotoru. Tyto mutanty se různě váží na několik koaktivátorů transkripce a inhibují jejich funkci, a lze je proto použít jako diagnostického nástroje při studiu mechanismu transkripční aktivace. Ověřili jsme nejprve pomocí zkrácených konstrukcí MITF promotoru a promotoru s mutovaným místem CRE (pro transkripční faktor CREB), že exprese řízená tímto promotorem v melanomových buňkách z velké části závisí na cAMP signální cestě a CRE motivu zprostředkující transkripční odpověď na tuto signální cestu (Obr. 1 v příloze 3). V myších melanomových buňkách B16 a zejména v lidských melanomových buňkách MeWo jsme pozorovali silnou inhibici promoterové aktivity wt E1A proteinem (Obr. 2 v příloze 3). Deleční mutanty E1A (schéma molekuly E1A je na Obr. 9) kterým chyběl N-konec nebo CR1 nebyly schopné reprimovat promotor a bodová mutace R2G (silně oslabující vazbu na p300/CBP) jen mírně oslabila represorovou funkci. Oblast CR2 nutná pro vazbu na Rb byla zcela postradatelná, stejně jako oblast aminokyselin 26-35, nutná pro vazbu na TRRAP protein (transkripční koaktivátor). Je tedy patrné, že N-konec a CR1 jsou nutné pro represorovou funkci E1A k MITF promotoru. Podobná závislost dediferenciační funkce E1A na CR1 oblasti byla popsána již dříve na

myších melanocytech imortalizovaných retrovirovým přenosem E1A (Yavuzer a spol., 1995). Protože MITF promoter je aktivován několika transkripčními faktory (viz úvod), z nichž jeden je CREB, testovali jsme dále MITF promoter s mutovaným motivem CRE, vazebným místem pro CREB (schéma MITF promotoru s vyznačením vazebných míst pro jednotlivé transkripční faktory je znázorněno na Obr. 3). U myších melanomových buněk B16 se mutací CRE místa zcela zrušila možnost inhibovat promoter pomocí E1A, což ukazuje, že jde o represi transkripce zprostředkované faktorem CREB (kofaktorem je p300 nebo CBP, oba vázající se na E1A a jím inaktivovatelné) (Obr. 3 v příloze 3). Odlišné byly výsledky u několika linií lidských melanomů. Zde se linie lišily stupněm, kterým mutace promotoru porušila jeho aktivitu (pokles aktivity o 30-90%), ukazující na možnost odlišného přispění camp/PKA/CREB signální cesty na aktivitu promotoru v jednotlivých melanomových buněčných liniích. Zbytková aktivita však byla vždy inhibovatelná E1A proteinem, tedy v kontrastu s myšími buňkami. Tyto výsledky ukazují na možnou rozdílnost v regulaci exprese MITF mezi lidskými a myšími melanomovými buňkami. Dále je zřejmé, že mutanty neinaktivující proteiny Rb rodiny a protein TRRAP jsou schopny plně inhibovat MITF promoter. Protože tyto mutanty netransformují buňky (vzhledem k neschopnosti vázat uvedené proteiny), naskýtá se možnost použít podobné mutanty (s kombinovanou mutací) při represi transkripce endogenního MITF, která by mohla vést ke sníženému přežívání melanomových buněk (funkce MITF jako “survival” faktoru). E1A onkoprotein má, paradoxně, protinádorový účinek na lidské nádorové buňky včetně melanomových, což souvisí s jeho transkripčně represorovou funkcí inhibovat expresi některých genů spojených s nádorovou transformací (Frisch a Mymryk, 2002, a diskutováno v příloze 3). Není však zatím jasné, zda k této funkci přispívá u melanomových buněk i represorový účinek na expresi MITF. Tyto otázky jsou předmětem naší další práce, neboť represe MITF by mohla být možností pro genovou terapii u melanomu (viz též dále a příloha 5). Protože důležitým

antiapoptotickým proteinem je survivin, jehož exprese na úrovni transkripce je aberantně zvýšena u mnoha typů nádorových buněk, sledovali jsme i vliv výše uvedených mutantních forem E1A na aktivitu survivinového promoteru v reportérovém systému. V tomto pokusu jsme chtěli rovněž ověřit, zda jiný silně aktivní promoter v melanomových buňkách (promoter pro survivin) je reprimován E1A proteinem. E1A však překvapivě aktivoval tento promoter a oblast CR2 opět byla postradatelná pro tuto aktivitu. Tyto výsledky mají potenciální význam pro zesílení účinků genové terapie přenosem genu aktivovaného survivinovým promoterem, který je využíván jako promoter vysoce specifický pro expresi exogenních genů v nádorových buňkách, protože aktivita tohoto promoteru je v nemaligních buňkách téměř nulová. Tyto výsledky byly presentovány na kongresu (příloha 9).

Mechanismus aktivace cílového genu pro transkripční faktor MITF byl studován nejen v reportérovém systému, ale též v buňkách, které velmi specificky reagují na ektopicky dodaný MITF spuštěním transkripce jednoho z cílových genů pro MITF (tyrosinasy), a jsou tedy vhodným systémem pro studium transkripční aktivace endogenních genů v prostředí jaderného chromatinu (U2-OS buňky, osteosarkom). Objasnit přesný mechanismus aktivace je mimořádně důležité z hlediska zablokování této funkce jako možného budoucího genového zásahu při terapii melanomu. Zjistili jsme, že mechanismy koaktivace transfektovaného promoteru-reportéru a endogenního MITF-dependenčního promoteru jsou odlišné. Inhibice těchto promoterů několika mutantami adenovirového onkoproteinu E1A (jako nástroje který specificky váže a inaktivuje několik klíčových buněčných proteinů a transkripčním kofaktorů - Rb, p300/CBP, TRRAP, PCAF, hGCN5) byla odlišná, zejména E1A mutanta s deletovanou oblastí CR1 byla neúčinná při inhibici transfektovaného, nikoli však endogenního promoteru (Obr. 2 v příloze 4). Rovněž odlišná byla dereprese po aplikaci inhibitoru histon deacetylasy trichostatinu A (TSA). Při použití wt E1A byla inhibice zrušena přidáním TSA u transfektovaného promoteru, avšak represe přetrvávala u endogenního promoteru. Bodová

mutace R2G - tato mutanta téměř neváže koaktivátory p300/CBP (Wang a spol., 1993; Fuchs a spol., 2001; Voigtlander a spol., 2002) - zcela eliminovala vliv TSA na transfektovaný promóter, avšak represe touto mutantou přetrvávala v přítomnosti TSA u endogenního promóteru. Mutace R2G v E1A tedy propůjčila rezistenci vůči TSA v případě transfektovaného promóteru (Obr. 2 v příloze 4). Nedávno bylo popsáno, že nukleosom-remodelující komplex SWI/SNF je nutný pro transkripci některých cílových genů pro MITF (DeLaSerna a spol., 2006). Testovali jsme tedy indukci tyrosinasy i v liniích s nekompletním SWI/SNF komplexem a zjistili jsme, že linie H1299, která je deficitní pro faktor Brg1 (složka SWI/SNF chromatin remodelujícího komplexu a ATPasa nutná pro aktivitu komplexu), po kotransfekci vektorů pro MITF i Brg1 (nikoli však samotného MITF) rovněž aktivuje transkripci endogenní tyrosinasy (Obr. 1 v příloze 4). Integrita SWI/SNF komplexu je tedy důležitá pro MITF-zprostředkovanou transkripci, avšak není postačující, neboť další testované buněčné linie s neporušenou expresí tohoto komplexu neexprimovaly tyrosinasu po transfekci MITF. Další výsledky a diskuse jsou uvedeny v příloze 4. Promóter pro tyrosinasu, zcela závislý na transkripčním faktoru MITF, je často používán jako melanocytově-specifický promóter v modelech genové terapie melanomu. Tato specifická je dána přítomností transkripčního faktoru MITF. Při kotransfekci expresního plasmidu pro MITF a tyrosinasového promóteru (nebo jiných MITF-dependentních promóterů) dochází k aktivaci i v dalších typech buněk, které nejsou melanocyty (Obr. 1 v příloze 4). Jak jsme však ukázali, transkripce transfektovaného promóteru je koaktivována jiným mechanismem než endogenní promóter. Endogenní promóter pro tyrosinasu v U2-OS buňkách je pravděpodobně aktivován zcela podobně jako v melanocytech, do U2-OS buněk je však nutné dodat exogenní MITF. Protože jsme získali též předběžné výsledky ukazující, že stabilně transfektovaný a po selekci integrovaný tyrosinasový promóter není v U2-OS buňkách aktivován MITF faktorem jako endogenní promóter (výsledky zde nejsou ukázány), je možné usuzovat na specifickou

konfiguraci chromatinu, např. posici nukleosomů, která je odpovědná za melanocytově-specifickou transkripci faktorem MITF.

d) Inhibice funkce MITF nezávislá na inaktivaci koaktivátorů p300/CBP - doména CR1 proteinu E1A jako autonomní repressor MITF-řízené transkripce

Není známo jak MITF aktivuje autentické geny v prostředí chromatinu a také většina funkčních analýz byla prováděna s promoter-reportérovými konstrukty a kotransfekcí MITF expresního vektoru. Dosud neexistoval vhodný systém pro testování mechanismu transkripce endogenních cílových genů faktorem MITF v melanocytech, protože inhibice této transkripce může způsobit i inhibici exprese samotného endogenního MITF. Pro důkladnější analýzu mechanismu transkripce endogenního cílového genu pro MITF a způsob inhibice jeho aktivity E1A proteinem jsme použili stejně jako v předchozí práci U2-OS buňky, kde je možné přenosem exogenního MITF dosáhnout prudké aktivace jinak transkripčně „spícího“ genu pro tyrosinazu (ne však pro další cílové geny) (Vachtenheim a spol., 2001, přílohy 5 a 6). Adenovirový protein E1A způsobuje dediferenciaci melanocytů a represi endogenního MITF (Yavuzer a spol., 1995, Halaban a spol., 1996), ale není známo, jak je ovlivněna MITF-řízená transkripce. Studovali jsme proto MITF-dependentní transkripci po inhibici mutantami E1A onkoproteinu při kotransfekci vektoru pro MITF (příloha 5). Analýza ukázala, že pro transkripční represi endogenního cílového genu pro MITF (tyrosinasa) v U2-OS buňkách je nutná delece celé oblasti aa. 2-65, tedy N-konec a CR1 doména. N-konec E1A váže několik kofaktorů a histon deacetylas, ale překvapivě, delece samotného N-konce nestačila k uvolnění represe. Protože CR2 oblast nebyla k represi nutná, studovali jsme dále jen účinek delecí v oblasti aa. 1-82 E1A, tedy na zkráceném E1A proteinu. Tento úsek jsme studovali jako

GAL-fúzní proteiny (GAL poskytuje tag i jaderný lokalizační signál). Při testování dalších konstruktů (např. FLAG-tagged E1A s SV40 jaderným lokalizačním signálem a dalších) jsme zjistili, že GAL-E1A proteiny jsou nejlépe exprimovány, lokalizovány výhradně v jádře, i snadno detegovány (pomocí anti-GAL protilátky), a proto jsme je použili dále. Analyzovali jsme tedy dále jen delece N-konce nebo CR1 v kontextu aminokyselin 1-82 E1A, které jsou postačující pro represi. Delece v této oblasti překvapivě ukázaly, že N-konec je pro represi endogenního genu postradatelný a represe zcela závisí na doméně CR1. Menší delece a substituce uvnitř CR1 ukázaly, že nejvíce je represe porušena při odstranění aminokyselin 73-82 a jen mírně se sníží, je-li úsek EDPNEE změněn na NAAIRS (takto změněná sekvence ponechává největší proteinovou flexibilitu po mutaci s možností obou typů proteinové konformace). Oblast EDPNEE byla dříve zjištěna jako místo důležité pro vazbu na histon acetyltransferasu PCAF (p300/CBP-associated factor, Yang a spol., 1996; Reid a spol., 1998) a inhibici svalově specifických enhancerů (Sandmoller a spol., 1996). V kontextu E1A 1-82 je tedy CR1 nezbytná pro represi transkripční aktivity MITF a proto byl proveden pokus, zda stálá exprese této oblasti (i celé oblasti aa.1-82 nebo pouze N-konce) v lidských melanomových buňkách ovlivňuje jejich přežívání. Skutečně, tvorba klonů MITF-positivních melanomových buněk v selekčním mediu (selekční marker byl kotransfektován) prudce klesla (Obr. 4 v příloze 5) v případě CR1, stejně jako celé oblasti E1A 1-82. Samotný N-konec byl nyní v kontextu aa. 1-82 neúčinný při represi i při inhibici proliferace melanomových buněk. Inhibice funkce MITF tedy koreluje s inhibicí dlouhodobého přežívání lidských melanomových buněk a ukazuje na důležitost MITF pro přežívání tohoto typu buněk.

I když není zatím znám žádný koaktivátor který by se vázal výhradně na CR1 oblast a nepotřeboval současně alespoň subdoménu z N-konce E1A proteinu, výsledky naznačují existenci takového koaktivátoru pro MITF, který je inaktivován overexpresí pouze CR1. Vytvořili jsme proto chimerické proteiny, kde MITF-část je zbavena dvou transkripčních

domén, takže je vlastně transkripčně inertní, a působí naopak jako dominantně-negativní mutanta pro wt MITF (viz dále a příloha 6), E1A-část chiméry je pak tvořena buď N-koncem nebo CR1 oblastí E1A. Schematicky jsou tyto fúzní proteiny ukázány v na Obr. 3 v příloze 5). Testovali jsme, zda tyto fúzní proteiny aktivují transkripci endogenního cílového genu pro MITF, kde DNA-vazebná a dimerizační oblast zůstaly zachovány. Příslušná oblast E1A může totiž inhibovat sekvestrací zatím neidentifikovaného koaktivátoru mimo promoter, avšak je-li vazba k promoteru zajištěna tím, že je součástí MITF-E1A chiméry, a to vazbou na DNA-vazebná místa pro MITF, může naopak aktivovat navázáním tohoto neznámého koaktivátoru. CR1 oblast, nikoli však N-konec, je-li takto integrován do MITF molekuly skutečně propůjčil aktivační funkci a endogenní gen byl aktivován. Nestalo se tak s N-koncem E1A. Jako pozitivní kontrola sloužila chiméra Vp16-MITF. Všechny fúzní proteiny byly správně lokalizovány v jádře. Výsledky tedy skutečně podporují existenci koaktivátoru MITF, který by mohl být sekvestrován doménou CR1 E1A a tím reprimována aktivační funkce MITF a naopak, mohl by být rekrutován k promoteru CR1 E1A-MITF chimerickým proteinem. Dosud byly považovány za aktivátory MITF-dependentní transkripce p300/CBP, avšak tyto nejsou schopny vázat samotnou CR1 oblast E1A bez N-konce. Dalším důkazem, že MITF funguje v savcích buňkách i bez p300/CBP, je výsledek pokusu, kdy jsme testovali mutanty MITF o kterých je známo, že neváží p300/CBP v buňkách. Tyto mutanty byly stále schopné aktivovat transkripci (Obr. 3 v příloze 5). Souhrnně jsme tedy ukázali, že pravděpodobně existuje koaktivátor transkripčně aktivační funkce MITF, který je možné inaktivovat autonomní CR1 E1A doménou, inhibovat tak funkci MITF v melanomových MITF-positivních buňkách a tím i inhibovat proliferaci těchto buněk. Tento koaktivátor je odlišný od dosud předpokládaných p300/CBP proteinů. Výsledky této části práce byly presentovány též na kongresu (příloha 10).

e) Dominantně negativní mutanta MITF - identifikace a úloha druhé, slabší transkripčně aktivační domény MITF

MITF aktivuje transkripci pomocí transkripčně-aktivační domény (TAD), která je umístěna blíže N-konci molekuly, a tento fragment též interaguje s koaktivátorem transkripce p300 proteinem (Sato a spol., 1997). Byla též zjištěna přítomnost druhé aktivační domény na C-konci (Takeda a spol., 2000b), avšak tato doména je pravděpodobně slabší a v celkové aktivaci transkripce se pravděpodobně uplatňuje méně. Nebylo dosud známo, jaký vliv má tento úsek na celkovou míru transaktivace. Domény byly dříve lokalizovány pomocí klasických reportérových studií a fúzních proteinů - fragmentů MITF faktoru s GAL DNA-vázající doménou. Nebylo dále známo, jak se jednotlivé transaktivační oblasti uplatňují při transkripci endogenních cílových genů. Byly popsány dva myší fenotypy, z nichž u jednoho byla detegována delece exonů 2-4 MITF a u druhého exonu 4 (Steingrimsson a spol., 1994; Hallsson a spol., 2000). Delece exonu 4 má přitom za následek delecí N-koncové transaktivační domény a celý protein by měl být nefunkční. U těchto semidominantních alel byl sice výsledný fenotyp typický pro poruchu funkce MITF (defekt pigmentace, poruchy sluchu, osteopetróza), ale byl méně výrazný ve srovnání s homozygoty nesoucími jiné defektní alely (mutace v basické oblasti proteinu znemožňující vazbu na DNA), z čehož lze usuzovat na přítomnost další oblasti, která by, alespoň zčásti, funkčně nahradila N-koncovou oblast.

V naší práci jsme tedy zkonstruovali expresní plasmidy pro nemutovaný (wt) MITF a deleční mutanty s delecí buď N-koncové (delece aminokyselin 324-369) nebo C-koncové (delece aminokyselin 324-369) transkripčně aktivační oblasti. Připravili jsme i kombinovanou delecí obou domén a chimerický protein, který měl deletované obě domény (Δ NC-MITF), ale

v místě N-koncové oblasti byla vsazena silná transaktivační doména z herpesvirového proteinu Vp16 (MITF-Vp16). Všechny konstrukce měly též HA-epitop umístěný na konci čtecího rámce před stop kodonem pro kontrolu jejich exprese (Obr. 1 v příloze 6). Studovali jsme, jak silně transaktivují tyto různé deleční konstrukty jeden z cílových promotorů v promotor-reportérovém systému (promotor pro tyrosinazu) po přechodné transfekci. Ukázalo se, že N-koncová TAD skutečně zprostředkuje většinu transkripční aktivity MITF, a dále že transfekce MITF s delecí obou domén má za následek nejen prostou eliminaci transkripční aktivity, ale dokonce inhibici bazální aktivity bez přítomnosti wt MITF, jež je zprostředkována jinými, endogenními transkripčními faktory typu bHLH aktivujícími promotor-reportér (Obr. 1 v příloze 6). Tato skutečnost mohla znamenat že Δ NC-MITF působí jako dominantně negativní inhibitor funkce MITF blokováním E-boxů v DNA vazbou transkripčně neaktivních dimerů. Kotransfekce Δ NC-MITF a wt MITF skutečně měla za následek inhibici transkripce a hyperaktivní chimerická molekula MITF-Vp16 byla rovněž silně inhibována. Inhibice byla přímo závislá na množství transfektovaného plasmidu Δ NC-MITF (Obr. 2 v příloze 6). Protože oblast bHLH-LZ nutná pro dimerizaci a vazbu na DNA je v delečních mutantách MITF nedotčena, Δ NC-MITF tedy pravděpodobně inhibuje funkci wt MITF tvorbou neaktivních dimerů, které blokují vazebná místa v DNA. Pomocí gel-shift metody s MITF IVT proteiny syntetizovanými in vitro bylo potvrzeno, že všechny konstrukty, včetně MITF-Vp16 se váží na DNA (E-box z oblasti iniciátoru promotoru tyrosinase genu byl použit jako značená próba, (Obr. 3 v příloze 6). Pro určení zda je dominantně negativní inhibitor Δ NC-MITF schopen inhibovat i endogenní cílový promotor jsme opět využili U2-OS buněk (osteosarkom), které, ač samy neexprimují MITF ani její cílové geny, jsou schopny exprimovat tyrosinazu po transfekci MITF expresním vektorem (viz výše). I v tomto modelovém systému se ukázalo, že konstrukt Δ NC-MITF je zcela inaktivní v indukcii tyrosinasy a konstrukt s deletovanou N-koncovou doménou má pouze malou aktivitu. Tyto

výsledky jsou tedy podobné reportérovým pokusům a potvrzují, že N-koncová TAD je stěžejní i pro transkripci z chromatin-integrovaného promotoru. Δ NC-MITF se při kotransfekci opět ukázal jako silný dominantně-negativní inhibitor transkripční funkce wt MITF i MITF-Vp16 (Obr. 4 v příloze 6). Dále jsme též ověřili, že všechny konstrukty MITF byly exprimovány ve srovnatelných hladinách a lokalizovány v jádře. Funkci Δ NC-MITF jsme dále testovali na lidských melanomových buňkách v reportérových pokusech a zjistili jsme, že Δ NC-MITF je účinnější než pouze N-deletovaný MITF při inhibici transkripce zprostředkované pomocí wt MITF (Obr. 5 v příloze 6). N-deletovaný mutant tedy, ač ztrácí téměř celou transkripční aktivitu, není schopen působit jako dominantně-negativní represor funkce wt MITF v melanomových buňkách a pro dominantně-negativní funkci je tedy nutné odstranění C-koncové TAD, i když tato má v intaktní molekule MITF jen malý vliv na celkovou sílu transaktivace.

Souhrnně jsme tedy v této práci ukázali, že odstraněním dvou transkripčních domén z molekuly MITF lze vytvořit silný dominantně-negativní inhibitor, kterým by bylo možné funkčně inaktivovat endogenní MITF v melanomových buňkách. Vzhledem ke kritické úloze faktoru MITF v přežívání melanomových buněk by takového způsobu bylo možné rovněž potenciálně využít v protinádorové terapii. V této práci jsme též diskutovali úlohu jednotlivých domén MITF při transkripční aktivitě a podobnost s transkripčním faktorem TFE3 (z MITF podrodiny transkripčních faktorů). Výsledky této části práce byly prezentovány též na kongresu (příloha 11).

5. Diskuse

Naše výsledky ukázaly, že protein p21, inhibitor cyklin dependentních kinas a buněčného

cyklu, se akumuluje ve vysoké hladině během posledních fází diferenciaci F9 buněk na PE a zvyšuje se i jeho zastoupení v komplexech cyklin-cdk. Tím přispívá k inhibici kinázové aktivity těchto komplexů. Vysoká hladina proteinu p21 sama o sobě diferenciaci nenavozuje, ani neurychluje. Rozhodující je stále vliv diferenciacních induktorů RA a db cAMP. p21 však ovlivňuje expresi trombomodulinu, diferenciacního markeru, jak bylo ukázáno v naší práci. Po stimulaci cAMP signální cesty v buňkách, které byly diferencovány pouze v RA a měly vysokou hladinu p21, došlo k masivní transkripci trombomodulinu. Tyto výsledky navozují obecnější otázku, zda p21 pozitivně reguluje i jiné transkripční cíle cAMP-zprostředkované signální cesty. Tuto možnost podporuje i zjištění, že p21 aktivuje i forskolinem stimulovanou aktivitu umělého minimálního promoteru obsahujícího pouze TATA box a 5 vazebných míst pro CREB transkripční faktor (transkripční aktivátor cAMP/PKA/CREB/CBP signální cesty) (Obr. 5 v příloze 1). Tato možná nová funkce p21 je podpořena i dalším naším pozorováním, že p21 protein aktivuje forskolinem-aktivovanou transkripci MITF-dependentního promoteru melastatinu (není ukázáno), a dalším zjištěním jiných autorů, popisující aktivaci cAMP-CREB signalizace p21 proteinem v Rat-1 buňkách (Kawata a spol., 2003). Způsob, jakým p21 ovlivňuje transkripci diferenciacního markeru trombomodulinu v F9 buňkách pravděpodobně souvisí se schopností p21 aktivovat transkripční koaktivátor p300/CBP derepresí jeho represorové domény CRD1 (Snowden a spol., 2000). Testování konstruktů trombomodulinového promoteru-reportéru s exogenním p300 a p21 potvrdilo schopnost p21 ovlivňovat aktivitu reportérového konstruktů tímto mechanismem v F9 buňkách. S postupující diferenciací F9 buněk na parietální endoderm je p21 částečně relokalizován do cytoplazmy a tato lokalizace proteinu souvisí s jeho antiapoptotickou funkcí.

Transkripční koaktivátory p300 a CBP byly dříve popsány jako důležité proteiny při diferenciaci F9 buněk (Kawasaki a spol., 1998). Snížení hladin p300 a CBP specifickými ribozymy mělo pro diferenciaci odlišné důsledky: pouze buňky se sníženou hladinou p300 nemohly diferencovat po přidání RA, a současně tyto buňky neakumulovaly p21 protein. p300 se tedy účastní i exprese samotného p21 a nízká hladina p21 mohla být (mimo jiné) příčinou neschopnosti F9 buněk diferencovat. Naopak snížení hladiny CBP mělo za následek sníženou akumulaci druhého inhibitoru cdk, p27 proteinu (nikoli však p21), a snížení hladin p300 i CBP inhibovalo apoptosu za přítomnosti RA. Výsledky těchto autorů (Kawasaki a spol., 1998) jsou tedy v souladu i s našimi zde popsanými výsledky získanými později a podpořily důležitost p21 proteinu při diferenciaci F9 buněk.

Zjištěné výsledky tedy souhrnně ukazují, že protein p21 hraje zásadní roli v diferenciaci F9 buněk na parietální endoderm. V souladu s funkcí inhibitoru cdk se podílí na blokování buněčného cyklu a snížení proliferační rychlosti diferencovaných buněk, účastní se regulace cAMP-zprostředkované transkripce a pravděpodobně brání spuštění apoptózy. Tyto výsledky podporují dřívější zjištění jiných autorů na jiných typech buněk, že p21 má kromě funkce v regulaci buněčného cyklu úlohu při transkripční koregulaci genů spojených s diferenciačním programem.

Dalším našim zjištěním bylo rozeznání nové úlohy proteinu p21 v melanomových buňkách. I když tato práce není ještě zcela ukončena a teprve bude odeslána do tisku, výsledky ukázaly, že p21 protein je pozitivním regulátorem transkripce z melanocytově-specifického promoteru pro MITF, klíčového transkripčního faktoru melanocytů. MITF i p21 jsou přítomny ve vysokých hladinách ve většině melanomových buněčných linií i v nádorových vzorcích, ale - jak jsme zjistili - vysoká hladina p21 je tolerována, nekoreluje s proliferační aktivitou (ani s profilem podílu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu) a má úlohu při transkripci – p21 aktivuje promoter pro MITF a působí tedy jako pozitivní

zpětná vazba - vzájemná aktivace transkripce, protože, jak již bylo uvedeno výše, p21 je současně jedním z transkripčních cílových genů pro MITF (Carreira a spol., 2005). Efekt p21 na MITF promoter je zcela specifický protože např. survivinový promoter je p21 proteinem silně inhibován v podobném testovacím systému i ve stejných buňkách. Transkripční účinky p21 proteinu nezávislé na regulaci buněčného cyklu jsou známy, ale není znám jejich mechanismus. Námi zjištěná aktivace MITF promoteru je nezávislá na derepresi tzv. CRD1 represorové domény p300 kofaktoru, neboť jsou k ní potřeba jiné oblasti molekuly (pro aktivaci MITF promoteru je nutný cyklin-vázající úsek na amino-konci) a není inhibována koexpresí HDAC6. Jde tedy o odlišný způsob koaktivace než v případě trombomodulinového promoteru v F9 buňkách (výše). Efekt p21 je skutečně nezávislý na regulaci buněčného cyklu, protože prostá inhibice cdk2 a cdk1 roscovitinem spíše mírně inhibovala MITF promoter, v žádném případě však neaktivovala. Stejně tak delší kultivace melanomových buněk v médiu s nízkou koncentrací séra sice zvýšila podíl buněk v G1 fázi buněčného cyklu, avšak nezměnila hladinu MITF (výsledky nejsou ukázány). Připravili a analyzovali jsme i buněčné klony jedné melanomové linie (SK-MEL-5), kde je hladina p21 proteinu silně snížena pomocí stabilní exprese shRNA, a tyto klony proliferovaly dokonce pomaleji ve srovnání s kontrolními buňkami, což potvrzuje účinek p21 nezávislý na buněčném cyklu. Uvedené výsledky (příloha 2) budou odeslány k publikaci, protože ještě dokončujeme pokusy ukazující na regulaci endogenního MITF p21 proteinem. Chromatin-imunoprecipitace (CHIP) již naznačila, že endogenní p21 protein je asociován s MITF promoterem v buňkách a akutní snížení hladiny p21 proteinu v jedné melanomové linii mělo za následek mírné snížení hladiny MITF (výsledky zde nejsou ukázány). MITF má více transkripčních cílů (OBR. 4) a účast p21 proteinu na expresi MITF by tedy měla mít za následek i zvýšenou expresi cílových genů. Protože vysoké hladiny MITF chrání melanomové buňky před apoptosou, a jedním z mechanismů (i když pravděpodobně ne jediným) může být aktivace exprese bcl-2 MITF

faktorem, hladiny p21 mohou přispívat k antiapoptotickému potenciálu nádorových buněk, a to nikoli svou cytoplasmatickou lokalizací (viz výše), ale specifickou funkcí při transkripci (p21 je lokalizován v melanomových liniích v jádře - výsledky zde nejsou ukázány). Zdá se tedy, že endogenní p21 skutečně nemá funkci inhibovat buněčný cyklus v buňkách melanocytové linie, ale může zde mít důležitější úlohu pozitivně regulovat expresi MITF a tím i dalších diferenciacně-specifických genů a posilovat anti-apoptotický potenciál melanomových buněk.

V poslední době se ukazuje, že je transkripční faktor MITF je nezbytný pro přežívání melanomových buněk, podobně jako embryonálních melanoblastů, a to pravděpodobně udržováním exprese některých antiapoptotických a pro-proliferačních genů. Gén pro MITF je amplifikován asi v 10% případů melanomu (Garraway a spol., 2005) a MITF je považován za faktor nutný k přežívání melanomových buněk. Z těchto důvodů tedy může MITF sloužit jako cíl možného genového zásahu při terapii a znalost jakým způsobem je regulována transkripční aktivita MITF, popř. jak je regulována exprese samotného MITF v melanocytech, je vzhledem k tomuto zásahu klíčová.

Jednou z možností blokovat expresi MITF nebo jeho cílových genů je exprese onkoproteinu E1A, který je silným transkripčním represorem. Zjistili jsme, že MITF promoter je silně inhibován tímto adenovirovým proteinem. K represí není potřeba oblast vázající Rb protein ani oblast vázající koaktivátor TRRAP, dva důležité interaktory E1A proteinu, jehož vazba na tyto buněčné proteiny je nutná pro transformační funkci. Potenciálně tedy by bylo možné využít tento mutantní E1A k inhibici exprese MITF v melanomových buňkách při vyloučení transformačních účinků samotného E1A onkoproteinu. Zjistili jsme též, že melanomové linie se liší v rozsahu, v jakém je aktivita MITF promoteru závislá na signální cestě cAMP/PKA/CREB/CBP. U některých linií se snížila aktivita jen minimálně, zatímco jiné zcela ztratily aktivitu promoteru (Obr. 3 v příloze 3). I když jde o transfektovaný

promoter, u endogenního promoteru může být situace podobná. Expresi MITF je zajišťována v melanomových buňkách několika cestami (OBR. 3) a relativní příspěvek každé z nich se může lišit u různých melanomových linií a možná i u melanomových buněk nádoru in vivo, což nebylo zatím studováno. Např. β -cateninová signální cesta je často deregulována v melanomových buňkách a má za následek zvýšenou hladinu MITF. I proto se zdá být neschůdné blokovat expresi MITF a lepší cestou by mohlo být blokování transaktivační funkce MITF na cílových promoterech. V tomto případě je k dispozici ještě méně poznatků a ani není jasné, zda se na všech cílových promoterech podílejí stejné koaktivátory, nakolik je důležitá lokální konfigurace chromatinu atd. Tato naše práce je příspěvkem k této poslední otázce. Jeden z hlavních a nejvíce studovaných cílových promoterů pro MITF, tyrosinasový promoter, je exprimován specificky pouze v melanocytové linii, avšak promoter pro tyrosinazu, je-li studován v transfekčním reportérovém systému, je aktivní při kotransfekci vektoru pro MITF nespecificky ve všech typech buněk. Zjistili jsme, že endogenní promoter a transfektovaný promoter mají jiné mechanismy koaktivace. Pomocí adenovirového proteinu E1A jako nástroje pro silnou represi jak endogenního, tak transfektovaného promoteru jsme zjistili, že různé mutanty E1A mají odlišnou aktivitu blokovat transkripci zprostředkovaným faktorem MITF u obou typů promoteru. V modelovém systému U2-OS buněk, ve kterých MITF aktivuje jinak zcela neexprimovaný tyrosinasový gen a tím modeluje situaci v melanocytech, kde je exprese tyrosinasy a dalších markerů zcela MITF-dependentní, způsobovaly represi i mutanty E1A s deletovanou doménou CR1 nebo s deletovaným N-koncem. Rovněž účinek TSA, inhibitoru histon-deacetylasy, na represi E1A mutantami byl odlišný u obou promoterů: sensitivita k TSA (tedy dereprese) byla pozorována při represi pomocí wt E1A pouze u transfektovaného promoteru a byla zrušena mutací R2G (která ruší vazbu na p300/CBP koaktivátory transkripce). U endogenního promoteru TSA nedereprimoval blok transkripce vyvolaný wt E1A ani R2G mutantou. Souhrnně jsou tyto

výsledky opět důležité z pohledu transkripční regulace cílových genů pro MITF, jenž je považován za potenciální cíl genové terapie vzhledem k jeho 100% přítomnosti v melanomových buňkách, téměř vždy zvýšené hladině, někdy mnohonásobně, v těchto buňkách oproti netransformovaným melanocytům, a jeho klíčové úloze pro přežívání transformovaných melanocytů.

Možnost inhibice exprese cílových genů pro MITF, které jsou v přirozeném chromatinovém prostředí jsme studovali dále. Doména CR1 adenovirového proteinu E1A překvapivě postačovala k úplné inhibici transkripce jednoho z cílových genů pro MITF (tyrosinasy) v modelovém systému v U2-OS buňkách, které normálně neexprimují MITF ani cílové geny, ale po expresi exogenní MITF je spuštěna transkripce endogenní tyrosinasy. Inhibice aktivity MITF pomocí úseku E1A je podle nás dosud nejúčinnějším způsobem blokády cílových genů pro MITF. Důležité zjištění bylo, že po transferu E1A (CR1) do melanomových buněk a selekci došlo k prudké inhibici přežívání těchto buněk. Tento způsob inhibice endogenního genu pomocí E1A CR1 tedy představuje nový mechanismus transkripční represe E1A proteinem. V této části práce jsme též shledali, že inhibice aktivity MITF je možná i bez inaktivace p300/CBP koaktivátorů, protože CR1 oblast E1A sama neváže tyto koaktivátory (vždy je nutný N-konec). Tuto možnost jsme dále podpořili pozorováním, že mutanty MITF, které neváží p300 protein v buňkách (mutace serinu 73 nebo delece celého N-konce) stále aktivují cílový promoter, a to transfektovaný promoter i endogenní promoter pro tyrosinasu. Úloha CR1 domény byla podpořena detekcí transkripční aktivity chimerického proteinu MITF-CR1, kdy tento protein aktivoval endogenní cílový promoter. Chimerický konstrukt obsahující N-konec E1A však nebyl aktivní, což podporuje výsledky získané s mutantami E1A a jeho doménami jako represory transkripce. I když nelze zcela vyloučit koaktivační funkci p300 nebo CBP při MITF-řízené transkripci, existuje pravděpodobně koaktivátor, který je inaktivován overexpresí CR1 E1A

oblasti, pravděpodobně sekvestrací CR1 doménou mimo promoter. Pak by bylo logické, že chimerická molekula MITF-CR1, která se váže na DNA-vazebná místa stejně jako MITF a ve které jsou původní transkripční oblasti MITF odstraněny, bude aktivovat transkripci podobně jako wt MITF. To se také v našich pokusech stalo, i když aktivace tohoto fúzního proteinu byla podstatně slabší než pomocí wt MITF. V těchto našich pokusech jsme tedy identifikovali CR1 jako autonomní represorovou doménu, jejíž funkce se zdá být nezávislá na EDPNEE motivu (jenž je sice vazebným místem pro koaktivátor PCAF, ale k vazbě PCAF je současně nutný i N-koncový E1A proteinu), a tedy mechanismus je odlišný od dříve popsané represe svalového enhanceru (Sandmoller a spol., 1996). Nutnost N-koncového E1A pro vazbu na PCAF byla spolehlivě prokázána (Lang a Hearing, 2003; Shuen a spol., 2002).

E1A protein se chová paradoxně i jako tumor-supresorový gen, a to proto, že inhibuje i expresi některých genů, které jsou onkogenní nebo spojeny s metastasováním, např. HER2/neu onkogen u karcinomu prsu (shrnutí ve Frisch a Mymryk, 2002) a dále proto, že E1A může indukovat apoptosu. Pozorovali jsme inhibici proliferace melanomových buněk (pouze MITF- pozitivních) po expresi CR1 E1A. Tento efekt E1A pozorovaný v naší práci je nezávislý na těchto funkcích E1A, protože CR1 oblast sama nemá žádnou z těchto aktivit. Inhibice proliferace (nebo přežívání indukci apoptosy) tedy koreluje s inhibicí transkripční funkce MITF a je specifická pouze pro MITF-pozitivní buňky. Souhrnně tedy výsledky ukazují na možnost inhibovat aktivační funkci MITF jako způsob cíleného genového zásahu do melanomových buněk.

Zkonstruovali jsme též novou dominantně-negativně působící mutantu MITF. Zjistili jsme, že C-terminální oblast v kontextu MITF molekuly může aktivovat transkripci z endogenního promoteru, i když ve srovnání se silnější N-oblastí mnohem slaběji. Nicméně odstranění této C-domény bylo velmi důležité, neboť její reziduální aktivita znemožňuje použití MITF s deletovanou pouze N-terminální oblastí jako silného dominantně-negativního

inhibitoru pro inhibici funkce normálního MITF. Pro silnou dominantně-negativní funkci inhibovat wt MITF je tedy nutné odstranit obě transkripční domény v molekule MITF. C-koncová doména byla pravděpodobně postačující k udržení nízké aktivity MITF, pravděpodobně udržující určitou expresi cílových genů a tedy zniřující jinak jasný fenotyp *mitf*^{-/-} myši. Hyperaktivní chimerická molekula MITF-Vp16 byla v našich pokusech též velmi silně inhibována zkonstruovanou dominantně-negativní mutantou MITF, která tedy představuje účinný inhibitor funkce wt MITF. Takového způsobu inhibice funkce MITF by bylo možné rovněž potenciálně využít v protinádorové terapii.

Možnosti inhibice funkce MITF pomocí doposud zkonstruovaných dominantně-negativních mutant jinými autory byly menší, neboť bylo použito buď jen N-deletované molekuly (podobné zde popsané Δ N-MITF), nebo byly použity mutanty v basickém úseku (popř. je celý tento úsek uměle přeměněn na úsek s kyselými aminokyselinami) které se neváží na DNA. V tomto případě však zůstává DNA motiv volný pro event. podobné faktory příbuzné MITF (např. TFE3 a TFEC), o kterých je zatím málo známo zda mohou aktivovat podobné cílové geny v melanomových buňkách, a není to tedy vyloučeno. Pravděpodobně z těchto důvodů byly dosud použité MITF dominantně negativní mutanty jen částečně účinné (citace v příloze 6), zatímco námi testovaný Δ NC-MITF zcela inhiboval funkci MITF a dokonce i MITF-Vp16 v testovacím systému na endogenním promoteru. C-oblast MITF s uvedenou reziduální transkripční funkcí též vysvětluje nekompletní fenotyp u myši, kdy dvě přirozené heterozygotně mutované alely MITF mají podobnou delecí terminální oblasti jako výše popsaný Δ N-MITF, tedy předpokládaně působí *in vivo* jako dominantně negativní inhibitory, avšak nekompletní fenotyp nekoresponduje s kompletní ale jen s částečnou ztrátou funkce MITF (úplný fenotyp je manifestován ztrátou pigmentovaných buněk v kůži, oku, vnitřním uchu a osteoklastech, u myši jako porucha pigmentace, hluchota, mikroftalmie - vlivem nevyvinutých retinálních pigmentových buněk - a osteopetróza; u lidí odpovídá

Waardenburgovu syndromu typu 2). Tato naše práce tedy rovněž může vysvětlit, proč mutovaný MITF ve kterém nastala delece silné N-terminální aktivační oblasti se presentoval jen mírnějším fenotypem na myších (Steingrimsson a spol., 1994; Hallsson a spol., 2000).

6. Závěr a zhodnocení

Výsledky uvedené v této práci přináší nové poznatky o úloze inhibitoru cyklin-dependentních kinas, p21(WAF1/Cip1) proteinu, v transkripční regulaci při indukované diferenciaci F9 buněk embryonálního karcinomu a buněk maligního melanomu. Výsledky podporují funkci p21 proteinu, která je nezávislá na jeho úloze inhibovat buněčný cyklus, a to ovlivnění transkripce některých genů, u dvou buněčných typů. V další části práce byly získány nové poznatky o mechanismu transkripční regulace transkripčním faktorem MITF (microphthalmia-associated transcription factor) v transformovaných melanocytech.

V práci byly získány zejména následující původní výsledky:

- Protein p21 během diferenciaci F9 buněk na parietální endoderm má kromě funkce inhibovat proliferaci i transkripční úlohu pozitivně regulovat expresi min. jednoho markeru, a to trombomodulinu, který je specifickým markerem diferenciaci na parietální endoderm. Tato regulace probíhá derepresí represorové domény transkripčního koaktivátoru p300 proteinu. Kromě toho může p21 protein mít úlohu inhibovat apoptosu v diferencujících F9 buňkách.
- V melanomových buňkách p21 pozitivně reguluje transkripci z promotoru pro MITF a posiluje tak zpětnovazebně hladinu MITF v těchto buňkách. Vyšší hladiny p21 jsou dlouhodobě tolerovány těmito nádorovými buňkami a p21 nezpůsobuje jejich pomalejší proliferaci. Hladina p21 koreluje spíše s rychlejší proliferací u normálních i maligních melanocytů v buněčné kultuře. Byl zjištěn nový mechanismus aktivace MITF promotoru p21

proteinem, který je nezávislý na C-konci, ale potřebuje intaktní cyklin-vazebný motiv na N-konci molekuly. Ačkoliv tyto oblasti p21 jsou nutné i pro inhibici cdk, transkripční regulace je nezávislá na inhibici buněčného cyklu. Výsledky mohou vysvětlit relativně vysoké hladiny p21 proteinu specificky v melanomových buňkách a jejich toleranci k p21 proteinu při progresi nádoru.

- Melanocytově-specifický promoter MITF genu je silně inhibován adenovirovým E1A onkoproteinem a mutace E1A, které ruší jeho vazbu na Rb protein a na TRRAP protein (a tedy inaktivují transformační aktivitu E1A při kooperaci s dalším onkogenem) nemají vliv na tuto represi, což naznačuje možnost použití takto mutovaného E1A proteinu při represi exprese MITF v melanomových buňkách.

- E1A onkoprotein rovněž reprimuje cílové MITF-aktivované promotery a mechanismus represe se liší pro transfektovaný promoter-reportér a pro endogenní promoter. Z výsledků je patrné, že endogenní, v chromatinu organizovaný promoter, má jiný způsob koaktivace než exogenní promoter. Rovněž bylo zjištěno, že jednotlivé melanomové buněčné linie se mohou lišit mírou závislosti exprese MITF na cAMP/CREB signální cestě, a implikují možnost heterogeneity nádorových buněk in vivo vzhledem k závislosti exprese MITF na aktivaci transkripčního faktoru CREB nebo na dalších transkripčních cestách (β -catenin/LEF1, Pax3, Sox10).

- Transkripci cílového promoteru bylo možné inhibovat i bez vyřazení aktivity koaktivátorů transkripce p300 a CBP. Autonomně působící doména E1A proteinu, CR1 oblast, byla schopna po expresi reprimovat MITF-aktivovanou transkripci cílového endogenního genu, a byl tedy naznačen mechanismus represe nezávislý na dosud známých E1A proteinem inaktivovaných kofaktorech. CR1 doména též inhibovala proliferaci melanomových buněk a byla-li integrována do MITF molekuly zbavené vlastní transkripční oblasti, propůjčila tomuto chimerickému proteinu transkripční aktivitu.

- Zkonstruovali jsme dominantně-negativní mutantu MITF, ve které jsou deletovány obě transkripčně-aktivační oblasti. Pouze tato mutanta (s odstraněnou i druhou, slabší, na C-konci lokalizovanou aktivační doménou) působí jako účinný inhibitor funkce wt MITF a umělého hyperaktivního chimerického Vp16-MITF proteinu. Nutnost odstranění druhé aktivační domény pro úplné zrušení transaktivační funkce MITF na cílovém endogenním promoteru vysvětluje dřívější pozorování nekompletního fenotypu myši s mutovaným MITF, ve kterém byla porušena funkce pouze silné N-koncové domény.

Transkripční faktor MITF stojí v centru transkripční regulace v melanocytech a jeho hladina v buňce pozitivně nebo negativně reguluje několik klíčových buněčných procesů (diferenciaci, proliferaci, ochrana proti apoptose, a invazivitu), a MITF je klíčový protein pro přežívání embryonálních i maligních melanocytů. Inhibice transkripčně aktivační funkce MITF může znamenat kritický zásah nutný pro porušení viability melanomových buněk. Předkládaná práce pomáhá objasnit některé regulační mechanismy účastnící se exprese cílových genů pro tento transkripční faktor. Součástí práce (v přílohách) je 5 článků publikovaných v časopisech s impakt faktorem a jedna práce připravená k odeslání do tisku.

6. Souhrn

V buňkách F9 (embryonální karcinom) lze indukovat pomocí kyseliny retinové a db-cAMP diferenciaci na buňky podobné parietálnímu endodermu (PE). V naší práci jsme ukázali, že hladina inhibitoru cyklin-dependentních kinas, p21 proteinu, prudce stoupá na konci této diferenciace. Klony F9 buněk stabilně exprimující exogenní p21 měly při diferenciaci zvýšenou hladinu trombomodulinu, specifického markeru PE diferenciace. Transfektovaný p21 aktivoval trombomodulinový promoter-reportér a vazebné místo pro

cyklin E v molekule p21 bylo postradatelné pro tuto aktivitu. Promoterová aktivita byla inhibována kotransfekcí antisense p21 cDNA nebo p21-specifickými siRNA komplexy. p21 protein tedy pozitivně reguluje transkripci trombomodulinu, a to mechanismem dereprese represorové domény transkripčního koaktivátoru p300. V části buněčné populace se p21 protein během diferenciaci akumuloval kromě jádra i v cytoplasmě. Tato lokalizace p21 je asociována s jeho antiapoptotickou funkcí. Souhrnně jsme tedy zjistili, že p21 protein má kromě účinků na regulaci buněčného cyklu i transkripčně aktivační a pravděpodobně antiapoptotickou úlohu při diferenciaci F9 buněk na PE.

Dále jsme studovali expresi a transkripční úlohu p21 proteinu v melanomových buňkách. p21 protein byl exprimován ve většině buněčných linií v relativně vysoké hladině a byl exprimován i v prolifерujících normálních melanocytech. Klony melanomových buněk se sníženou hladinou p21 proteinu dokonce prolifерovaly pomaleji než kontroly. Promotery několika genů byly aktivovány transfekcí p21 expresního plasmidu. Zejména byl aktivován promoter pro transkripční faktor MITF (microphthalmia-associated transcription factor). Tento transkripční faktor je klíčovým regulátorem transkripce mnoha genů v melanocytech a aktivuje i transkripci několika genů specifických pro diferenciaci melanocytů. Pro aktivaci MITF promoteru byla C-terminální oblast p21 postradatelná a byl naopak nutný krátký úsek na N-konci vázající cyklin E. Aktivace promoteru tedy probíhá mechanismem odlišným od dereprese represorové domény v p300 proteinu, což je podpořeno i zjištěním, že aktivace MITF promoteru nešlo reprimovat koexpresí HDAC6. Výsledky ukazují na vzájemnou pozitivní regulaci transkripce MITF a p21 (MITF je transkripčním aktivátorem p21 genu) a mohou vysvětlit přítomnost hladiny p21 proteinu specificky v melanomových buňkách a jejich toleranci k tomuto proteinu.

Recentní data ukazují na úlohu MITF proteinu jako “survival” faktoru pro melanomové buňky. Testovali jsme tedy, zda MITF promoter je možné inhibovat adenovirovým

onkoproteinem E1A, známým transkripčním represorem. Mutanty neinaktivující proteiny Rb rodiny a protein TRRAP byly schopny plně inhibovat MITF promoter. Protože tyto mutanty netransformují buňky (vzhledem k neschopnosti vázat uvedené proteiny), naskýtá se možnost použít podobné mutanty (s kombinovanou mutací) při represi transkripce endogenního MITF, která by mohla vést ke sníženému přežívání melanomových buněk. E1A a jeho mutant jsme využili jako nástroje i při dalších pokusech, kdy jsme sledovali jeho účinek na cílový promoter pro MITF, a to transfektovaný i endogenní (v modelovém systému U2-OS buněk, ve kterých MITF aktivuje jinak neexprimovaný tyrosinasový gen a tím modeluje situaci v melanocytech). Represi endogenního, nikoli však transfektovaného, promoteru způsobovaly i mutanty E1A s deletovanou doménou CR1 nebo s deletovaným N-koncem. Rovněž účinek TSA, inhibitoru histon-deacetylas, na represi E1A mutantami byl odlišný u obou promoterů. Tyto výsledky ukazují na odlišný způsob koaktivace endogenního a transfektovaného cílového promoteru pro MITF.

Ačkoli bylo identifikováno více genů jejichž exprese je řízena transkripčním faktorem MITF, mechanismus aktivace transkripce cílových promoterů je téměř neznámý. Ukázali jsme dále, že inhibovat transkripční aktivitu MITF je možné i bez inaktivace p300 a CBP proteinů, které byly dosud považovány za koaktivátory MITF-řízené transkripce. CR1 oblast proteinu E1A, která sama neváže p300 ani CBP, postačovala k represi cílového endogenního promoteru, a tato doména rovněž byla schopna po expresi v MITF-positivních melanomových buňkách inhibovat jejich přežívání. CR1 doména, po vsazení do kontextu MITF molekuly, rovněž propůjčila transkripční aktivitu MITF, ze kterého byly vyštěpeny původní 2 aktivační domény. Výsledky tedy ukazují na existenci zatím neznámého koaktivátoru, který je sensitivní k expresi CR1 E1A a je odlišný od dosud identifikovaných kofaktorů vázaných a inaktivovaných E1A proteinem.

Připravili jsme dominantně-negativní mutantu MITF, která je schopna silně inhibovat funkci endogenního MITF i chimerického hyperaktivního proteinu Vp-MITF. Tato mutanta má deletované obě transkripčně-aktivační domény a inhibovala i endogenní MITF-dependentní promotor. Odstranění N-koncové hlavní transaktivační domény nepostačuje a pro silnou dominantně-negativní funkci inhibovat wt MITF je nutné odstranit obě transaktivační domény. Tohoto způsobu inhibice funkce MITF by bylo možné rovněž potenciálně využít v protinádorové terapii. Souhrnně jsou tyto výsledky opět důležité z pohledu transkripční regulace cílových genů pro MITF, jenž je považován za potenciální cíl genové terapie vzhledem k jeho 100% přítomnosti v melanomových buňkách, jeho zvýšené hladině v těchto buňkách oproti netransformovaným melanocytům, a jeho klíčové úloze pro přežívání transformovaných melanocytů.

Summary.

F9 cells (embryonal carcinoma) can be induced to differentiate with retinoic acid and dibutyryl-cAMP into cells with a phenotype resembling parietal endoderm. We show that the levels of cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/Cip1 (p21) protein and mRNA are dramatically elevated at the end of this differentiation. Clones of F9 cells stably expressing ectopic p21 revealed, upon differentiation, upregulated levels of mRNA for thrombomodulin, a parietal endoderm-specific marker. Furthermore, p21 activated the thrombomodulin promoter in transient reporter assays and the p21 mutant defective in binding to cyclin E was equally efficient in activation. The promoter activity in differentiated cells was reduced by cotransfection of p21-specific siRNA or antisense cDNA. Coexpression of p21 increased the activity of the GAL-p300(1–1303) fusion protein on the GAL sites-containing TM promoter,

implying that p21 might act through a derepression of the p300 N-terminal-residing repression domain, thereby enhancing the p300 coactivator function. Whereas p21 was strictly nuclear in undifferentiated cells, a large proportion of differentiated cells had p21 localized also in the cytoplasm, a site associated with the antiapoptotic function of p21. As differentiation of F9 cells into parietal endoderm-like cells requires the cAMP signaling, the results together suggest that the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 may promote specifically this pathway in F9 cells and may have an antiapoptotic role in these cells.

Further study investigated the expression and transcriptional activity of p21/WAF1/Cip1 in human melanoma cells in culture. p21 was abundantly expressed in melanoma cells and was expressed also in proliferating epidermal melanocytes. Clones of melanoma cells with p21 knocked-down by siRNA had even decreased growth rates. We further found that promoters of several genes related to differentiation were stimulated by p21 overexpression, including the MITF promoter. The N-terminal portion and intact cyclin-binding site was essential for these transcriptional activities, suggesting that mechanisms other than cell cycle inhibition, PCNA binding, and derepression of p300/CBP repression domain CRD1 underlie the transcriptional effects. Since activation of the p21 gene expression by MITF was described previously, the reciprocal stimulation suggested here might represent a positive-feedback loop reinforcing the presumed prosurvival activity of MITF in melanoma cells.

Since recent data implicate MITF as a survival factor for melanoma cells, we further tested whether the melanocyte-specific MITF promoter activity can be inhibited directly by an adenoviral protein E1A and its mutants. We found strong repression by the wild type E1A protein. The two motifs which mediate E1A binding to the retinoblastoma protein or to the transcriptional co-activator TRRAP, and are important for transformation by E1A in cooperation with other oncogenes, were dispensable for repression. Thus, this transformation-defective E1A mutant might constitute a good targeting agent for antimelanoma therapy. We

further used the E1A oncoprotein and its mutants as repressors of both the transiently transfected and endogenous tyrosinase promoter. We have shown that the requirement of the E1A N-terminus for repression of the MITF-activated tyrosinase promoter and the sensitivity to derepression by the histone deacetylase inhibitor trichostatin are distinct when the activity of the transiently transfected or the endogenous promoter is analysed in U2-OS cells. Thus, for transiently transfected versus chromatin-embedded promoter, the activity of obligatory MITF seems to be executed through different mechanisms of transcriptional coactivation.

Although numerous MITF-dependent downstream genes have been identified, the mechanisms by which the MITF activity is coregulated remain elusive. We show that the adenoviral E1A protein represses the MITF-driven transcription in U2-OS cells. The E1A CR1 domain (which alone is insufficient to bind p300) was sufficient for repression, while the N-terminus, through which E1A binds the p300/CBP proteins and other coactivators, was unable to repress. Correspondingly, CR1 inhibited colony formation of MITF-positive, but not MITF-negative, melanoma cells. The repression by CR1 was largely independent of the PCAF-binding motif, previously recognized to be necessary for suppression of muscle-specific enhancer. Interestingly, CR1 conferred transcriptional competence to the MITF-CR1 chimera in which the MITF portion was rendered transcription-deficient. Moreover, MITF mutants defective in binding to p300/CBP *in vivo* still activated transcription, further supporting a p300/CBP-independent coactivation of MITF targets. Our results suggest that understanding how CR1 represses *Mitf* activity may reveal a route to melanoma therapy.

Also, a dominant negative mutant of the melanocyte-specific isoform of MITF is described carrying deletions of both N- and C-terminal transactivation domains. Cotransfection of this mutant resulted in a complete inhibition of the wild type MITF function as tested on both the reporter-linked tyrosinase promoter and an endogenous, ectopic MITF-triggered tyrosinase gene in U2-OS cells. The dominant negative construct also strongly

repressed the activity of a hyperactive MITF-Vp16 chimera. Importantly, deletion of both activation domains was necessary to eliminate the residual transcription activity observed when only the N-terminal domain was removed and to achieve the repressive effect in human melanoma cells. If the activity of MITF plays a role in the long-term survival of malignant melanocytes, overexpression of a strong dominant negative MITF mutant might be a useful strategy to suppress its transactivation function.

Literatura.

- Adams, P. D., Sellers, W. R., Sharma, S. K., Wu, A. D., Nalin, C. M., and Kaelin, W. G., Jr. Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol.Cell Biol.*, *16*: 6623-6633, 1996.
- Aksan, I. and Goding, C. R. Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol.Cell Biol.*, *18*: 6930-6938, 1998.
- Amae, S., Fuse, N., Yasumoto, K., Sato, S., Yajima, I., Yamamoto, H., Uono, T., Durlu, Y. K., Tamai, M., Takahashi, K., and Shibahara, S. Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *247*: 710-715, 1998.
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K., and Mizutani, S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J.*, *18*: 1223-1234, 1999.
- Bentley, N. J., Eisen, T., and Goding, C. R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol.Cell Biol.*, *14*: 7996-8006, 1994.
- Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J.Cell Biol.*, *134*: 747-755, 1996.
- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bille, K., Fisher, D. E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J.Cell Biol.*, *142*: 827-835, 1998.

- Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol.Cell Biol.*, *18*: 694-702, 1998.
- Biankin, A. V., Kench, J. G., Morey, A. L., Lee, C. S., Biankin, S. A., Head, D. R., Hugh, T. B., Henshall, S. M., and Sutherland, R. L. Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.*, *61*: 8830-8837, 2001.
- Blagosklonny, M. V. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle*, *1*: 391-393, 2002.
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D. E., Lemort, N., Sock, E., Caignec, C. L., Wegner, M., and Goossens, M. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum.Mol.Genet.*, *9*: 1907-1917, 2000.
- Busam, K. J., Iversen, K., Coplan, K. C., and Jungbluth, A. A. Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissues and tumors, and comparison of its expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *Am.J.Surg.Pathol.*, *25*: 197-204, 2001.
- Busca, R., Berra, E., Gaggioli, C., Khaled, M., Bille, K., Marchetti, B., Thyss, R., Fitsialos, G., Larribere, L., Bertolotto, C., Virolle, T., Barbry, P., Pouyssegur, J., Ponzio, G., and Ballotti, R. Hypoxia-inducible factor 1 α is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J.Cell Biol.*, *170*: 49-59, 2005.
- Carreira, S., Liu, B., and Goding, C. R. The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J.Biol.Chem.*, *275*: 21920-21927, 2000.
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S. A., Galibert, M. D., Denat, L., Larue, L., and Goding, C. R. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*, *433*: 764-769, 2005.
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C. R. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.*, *20*: 3426-3439, 2006.
- Casini, T. and Pelicci, P. G. A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest. *Oncogene*, *18*: 3235-3243, 1999.
- Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R. M. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, *383*: 99-103, 1996.

- Chang, B. D., Watanabe, K., Broude, E. V., Fang, J., Poole, J. C., Kalinichenko, T. V., and Roninson, I. B. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *97*: 4291-4296, 2000.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B. D., and Dutta, A. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol.Cell Biol.*, *16*: 4673-4682, 1996.
- Chen, Y., Du, Z., and Yao, Z. Roles of the Nanog protein in murine F9 embryonal carcinoma cells and their endoderm-differentiated counterparts. *Cell Res.*, *16*: 641-650, 2006.
- Chiba, H., Clifford, J., Metzger, D., and Chambon, P. Specific and redundant functions of retinoid X Receptor/Retinoic acid receptor heterodimers in differentiation, proliferation, and apoptosis of F9 embryonal carcinoma cells. *J.Cell Biol.*, *139*: 735-747, 1997.
- Clifford, J., Chiba, H., Sobieszczuk, D., Metzger, D., and Chambon, P. RXRalpha-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. *EMBO J.*, *15*: 4142-4155, 1996.
- Coqueret, O. and Gascan, H. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J.Biol.Chem.*, *275*: 18794-18800, 2000.
- Coqueret, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.*, *13*: 65-70, 2003.
- De, la. Serna., I., Ohkawa, Y., Higashi, C., Dutta, C., Osias, J., Kommajosyula, N., Tachibana, T., and Imbalzano, A. N. The microphthalmia-associated transcription factor (MITF) requires SWI/SNF enzymes to activate melanocyte specific genes. *J.Biol.Chem.*, 2006.
- Delavaine, L. and La Thangue, N. B. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*, *18*: 5381-5392, 1999.
- Deleu, L., Shellard, S., Alevizopoulos, K., Amati, B., and Land, H. Recruitment of TRRAP required for oncogenic transformation by E1A. *Oncogene*, *20*: 8270-8275, 2001.
- Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Brisken, C., and Dotto, G. P. p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev.*, *19*: 1485-1495, 2005.
- Devgan, V., Nguyen, B. C., Oh, H., and Dotto, G. P. p21WAF1/Cip1 suppresses keratinocyte differentiation independently of the cell cycle through transcriptional up-regulation of the IGF-I gene. *J.Biol.Chem.*, *281*: 30463-30470, 2006.
- Dorsky, R. I., Raible, D. W., and Moon, R. T. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes Dev.*, *14*: 158-162, 2000.

- Dorvault, C. C., Weilbaecher, K. N., Yee, H., Fisher, D. E., Chiriboga, L. A., Xu, Y., and Chhieng, D. C. Microphthalmia transcription factor: a sensitive and specific marker for malignant melanoma in cytologic specimens. *Cancer*, *93*: 337-343, 2001.
- Dotto, G. P., Moellmann, G., Ghosh, S., Edwards, M., and Halaban, R. Transformation of murine melanocytes by basic fibroblast growth factor cDNA and oncogenes and selective suppression of the transformed phenotype in a reconstituted cutaneous environment. *J.Cell Biol.*, *109*: 3115-3128, 1989.
- Dotto, G. P. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim.Biophys.Acta*, *1471*: M43-M56, 2000.
- Du, J., Miller, A. J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., and Fisher, D. E. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am.J.Pathol.*, *163*: 333-343, 2003.
- Du, J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W. E., Nishimura, E. K., Golub, T. R., and Fisher, D. E. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell*, *6*: 565-576, 2004.
- el Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, *75*: 817-825, 1993.
- Erhardt, J. A. and Pittman, R. N. Ectopic p21(WAF1) expression induces differentiation-specific cell cycle changes in PC12 cells characteristic of nerve growth factor treatment. *J.Biol.Chem.*, *273*: 23517-23523, 1998.
- Erhardt, J. A. and Pittman, R. N. p21WAF1 induces permanent growth arrest and enhances differentiation, but does not alter apoptosis in PC12 cells. *Oncogene*, *16*: 443-451, 1998.
- Espeseth, A. S., Murphy, S. P., and Linney, E. Retinoic acid receptor expression vector inhibits differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev.*, *3*: 1647-1656, 1989.
- Frisch, S. M. and Mymryk, J. S. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, *3*: 441-452, 2002.
- Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G., and Sabbah, M. p21WAF1/CIP1 selectively controls the transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol.Cell Biol.*, *25*: 2419-2430, 2005.
- Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W. S., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell*, *106*: 297-307, 2001.

- Fuse, N., Yasumoto, K., Suzuki, H., Takahashi, K., and Shibahara, S. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *219*: 702-707, 1996.
- Fuse, N., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Yoshizawa, M., Udono, T., Takahashi, K., Tamai, M., Tomita, Y., Tachibana, M., and Shibahara, S. Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J.Biochem.(Tokyo)*, *126*: 1043-1051, 1999.
- Gaggioli, C., Busca, R., Abbe, P., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res.*, *16*: 374-382, 2003.
- Galibert, M. D., Carreira, S., and Goding, C. R. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress- responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J.*, *20*: 5022-5031, 2001.
- Gallimore, P. H. and Turnell, A. S. Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene*, *20*: 7824-7835, 2001.
- Garcia-Wilson, E. and Perkins, N. D. p21WAF1/CIP1 regulates the p300 sumoylation motif CRD1 through a C-terminal domain independently of cyclin/CDK binding. *Cell Cycle*, *4*: 1113-1119, 2005.
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., 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., and Sellers, W. R. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, *436*: 117-122, 2005.
- Garraway, L. A. and Sellers, W. R. Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat.Rev.Cancer*, *6*: 593-602, 2006.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol.Cell*, *11*: 1043-1054, 2003.
- Goding, C. and Meyskens, F. L., Jr. Microphthalmic-associated transcription factor integrates melanocyte biology and melanoma progression. *Clin.Cancer Res.*, *12*: 1069-1073, 2006.
- Goding, C. R. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.*, *14*: 1712-1728, 2000.
- Gregory, D. J., Garcia-Wilson, E., Poole, J. C., Snowden, A. W., Roninson, I. B., and Perkins, N. D. Induction of transcription through the p300 CRD1 motif by p21WAF1/CIP1 is core promoter specific and cyclin dependent kinase independent. *Cell Cycle*, *1*: 343-350, 2002.

- Halaban, R., Bohm, M., Dotto, P., Moellmann, G., Cheng, E., and Zhang, Y. Growth regulatory proteins that repress differentiation markers in melanocytes also downregulate the transcription factor microphthalmia. *J. Invest Dermatol.*, *106*: 1266-1272, 1996.
- Hallsson, J. H., Favor, J., Hodgkinson, C., Glaser, T., Lamoreux, M. L., Magnusdottir, R., Gunnarsson, G. J., Sweet, H. O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Steingrimsson, E. Genomic, transcriptional and mutational analysis of the mouse microphthalmia locus. *Genetics*, *155*: 291-300, 2000.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., and . Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell*, *6*: 387-400, 1995.
- Hemesath, T. J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M. J., Vaught, J., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Fisher, D. E. microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.*, *8*: 2770-2780, 1994.
- Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D. E. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, *391*: 298-301, 1998.
- Hershey, C. L. and Fisher, D. E. Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. *Gene*, *347*: 73-82, 2005.
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Arnheiter, H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, *74*: 395-404, 1993.
- Hughes, M. J., Lingrel, J. B., Krakowsky, J. M., and Anderson, K. P. A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *J. Biol. Chem.*, *268*: 20687-20690, 1993.
- Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T. P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M., and Yokoyama, K. K. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid- induced F9-cell differentiation. *Nature*, *393*: 284-289, 1998.
- Kawata, S., Ariumi, Y., and Shimotohno, K. p21(Waf1/Cip1/Sdi1) prevents apoptosis as well as stimulates growth in cells transformed or immortalized by human T-cell leukemia virus type 1-encoded tax. *J. Virol.*, *77*: 7291-7299, 2003.
- King, R., Weilbaecher, K. N., McGill, G., Cooley, E., Mihm, M., and Fisher, D. E. Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for MelanomaDiagnosis. *Am. J. Pathol.*, *155*: 731-738, 1999.

- King, R., Googe, P. B., Weilbaecher, K. N., Mihm, M. C., Jr., and Fisher, D. E. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. *Am.J.Surg.Pathol.*, 25: 51-57, 2001.
- Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Arigo, S. M., and Ariga, H. Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J.Biol.Chem.*, 275: 10477-10483, 2000.
- Lang, S. E. and Hearing, P. The adenovirus E1A oncoprotein recruits the cellular TRRAP/GCN5 histone acetyltransferase complex. *Oncogene*, 22: 2836-2841, 2003.
- Larribere, L., Hilmi, C., Khaled, M., Gaggioli, C., Bille, K., Auburger, P., Ortonne, J. P., Ballotti, R., and Bertolotto, C. The cleavage of microphthalmia-associated transcription factor, MITF, by caspases plays an essential role in melanocyte and melanoma cell apoptosis. *Genes Dev.*, 19: 1980-1985, 2005.
- Lee, M., Goodall, J., Verastegui, C., Ballotti, R., and Goding, C. R. Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *J.Biol.Chem.*, 275: 37978-37983, 2000.
- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D. E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol.Med.*, 12: 406-414, 2006.
- Lister, J. A., Robertson, C. P., Lepage, T., Johnson, S. L., and Raible, D. W. nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate. *Development*, 126 : 3757-3767, 1999.
- Loercher, A. E., Tank, E. M., Delston, R. B., and Harbour, J. W. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J.Cell Biol.*, 168: 35-40, 2005.
- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A., and Dobbelstein, M. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J.Biol.Chem.*, 278: 32507-32516, 2003.
- Maelandsmo, G. M., Florenes, V. A., Hovig, E., Oyjord, T., Engebraaten, O., Holm, R., Borresen, A. L., and Fodstad, O. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *Br.J.Cancer*, 73: 909-916, 1996.
- Mansky, K. C., Marfatia, K., Purdom, G. H., Luchin, A., Hume, D. A., and Ostrowski, M. C. The microphthalmia transcription factor (MITF) contains two N-terminal domains required for transactivation of osteoclast target promoters and rescue of mi mutant osteoclasts. *J.Leukoc.Biol.*, 71: 295-303, 2002.
- Mayr, B. and Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2: 599-609, 2001.

- McGill, G. G., Horstmann, M., Widlund, H. R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E. K., Lin, Y. L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H. F., Jordan, S. A., Jackson, I. J., Korsmeyer, S. J., Golub, T. R., and Fisher, D. E. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, *109*: 707-718, 2002.
- McGill, G. G., Haq, R., Nishimura, E. K., and Fisher, D. E. c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. *J.Biol.Chem.*, *281*: 10365-10373, 2006.
- McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*, *94*: 363-374, 1998.
- Miettinen, M., Fernandez, M., Franssila, K., Gatalica, Z., Lasota, J., and Sarlomo-Rikala, M. Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. *Am.J.Surg.Pathol.*, *25*: 205-211, 2001.
- Miller, A. J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C. L., Widlund, H. R., and Fisher, D. E. Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res.*, *64*: 509-516, 2004.
- Miller, A. J., Levy, C., Davis, I. J., Razin, E., and Fisher, D. E. Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFE4. *J.Biol.Chem.*, *280*: 146-155, 2005.
- Moore, K. J. Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet.*, *11*: 442-448, 1995.
- Negishi, Y., Ui, N., Nakajima, M., Kawashima, K., Maruyama, K., Takizawa, T., and Endo, H. p21Cip-1/SDI-1/WAF-1 gene is involved in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells in vitro. *J.Biol.Chem.*, *276*: 33249-33256, 2001.
- Niforas, P., Sanderson, G. M., Bird, C. H., and Bird, P. Characterization of the mouse thrombomodulin gene and functional analysis of the 5' flanking region in F9 teratocarcinoma cells. *Biochim.Biophys.Acta*, *1173*: 179-187, 1993.
- Niforas, P., Chu, M. D., and Bird, P. A retinoic acid/cAMP-responsive enhancer containing a cAMP responsive element is required for the activation of the mouse thrombomodulin-encoding gene in differentiating F9 cells. *Gene*, *176*: 139-147, 1996.
- O'Reilly, F. M., Brat, D. J., McAlpine, B. E., Grossniklaus, H. E., Folpe, A. L., and Arbisser, J. L. Microphthalmia transcription factor immunohistochemistry: a useful diagnostic marker in the diagnosis and detection of cutaneous melanoma, sentinel lymph node metastases, and extracutaneous melanocytic neoplasms. *J.Am.Acad.Dermatol.*, *45*: 414-419, 2001.
- Oboki, K., Morii, E., Kataoka, T. R., Jippo, T., and Kitamura, Y. Isoforms of mi transcription factor preferentially expressed in cultured mast cells of mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *290*: 1250-1254, 2002.

- Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M. T., Hodgkinson, C. A., Pavan, W. J., and Arnheiter, H. Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development*, *124*: 2377-2386, 1997.
- Park, J., Kunjibettu, S., McMahon, S. B., and Cole, M. D. The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev.*, *15*: 1619-1624, 2001.
- Perkins, N. D. Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle*, *1*: 39-41, 2002.
- Poole, J. C., Thain, A., Perkins, N. D., and Roninson, I. B. Induction of transcription by p21Waf1/Cip1/Sdi1: role of NFkappaB and effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Cell Cycle*, *3*: 931-940, 2004.
- Potterf, S. B., Furumura, M., Dunn, K. J., Arnheiter, H., and Pavan, W. J. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum.Genet.*, *107*: 1-6, 2000.
- Poyraz, A., Akyurek, N., Gonul, I. I., and Erdem, O. P21 and Bax expression in cutaneous malignant melanomas: correlation with histologic prognostic parameters. *J.Exp.Clin.Cancer Res.*, *23*: 625-631, 2004.
- Price, E. R., Ding, H. F., Badalian, T., Bhattacharya, S., Takemoto, C., Yao, T. P., Hemesath, T. J., and Fisher, D. E. Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J.Biol.Chem.*, *273*: 17983-17986, 1998.
- Redeuilh, G., Attia, A., Mester, J., and Sabbah, M. Transcriptional activation by the oestrogen receptor alpha is modulated through inhibition of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, *21*: 5773-5782, 2002.
- Rehli, M., Den Elzen, N., Cassady, A. I., Ostrowski, M. C., and Hume, D. A. Cloning and characterization of the murine genes for bHLH-ZIP transcription factors TFEC and TFEB reveal a common gene organization for all MiT subfamily members. *Genomics*, *56*: 111-120, 1999.
- Reid, J. L., Bannister, A. J., Zegerman, P., Martinez-Balbas, M. A., and Kouzarides, T. E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase. *EMBO J.*, *17*: 4469-4477, 1998.
- Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Taneja, R., and Chambon, P. The AF-1 and AF-2 activating domains of retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and their phosphorylation are differentially involved in parietal endodermal differentiation of F9 cells and retinoid-induced expression of target genes. *Mol.Endocrinol.*, *14*: 1398-1410, 2000.

- Rochette-Egly, C. and Chambon, P. F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. *Histol.Histopathol.*, *16*: 909-922, 2001.
- Saito, H., Yasumoto, K., Takeda, K., Takahashi, K., Yamamoto, H., and Shibahara, S. Microphthalmia-associated transcription factor in the wnt signaling pathway. *Pigment Cell Res.*, *16*: 261-265, 2003.
- Salti, G. I., Manougian, T., Farolan, M., Shilkaitis, A., Majumdar, D., and Das Gupta, T. K. Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res.*, *60*: 5012-5016, 2000.
- Samija, I., Lukac, J., Maric-Brozic, J., and Kusic, Z. Microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase as markers of melanoma cells in blood of patients with melanoma. *Croat.Med.J.*, *45*: 142-148, 2004.
- Sandmoller, A., Meents, H., and Arnold, H. H. A novel E1A domain mediates skeletal-muscle-specific enhancer repression independently of pRB and p300 binding. *Mol.Cell Biol.*, *16*: 5846-5856, 1996.
- Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T., and Goding, C. R. CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene*, *14*: 3083-3092, 1997.
- Schepsky, A., Bruser, K., Gunnarsson, G. J., Goodall, J., Hallsson, J. H., Goding, C. R., Steingrimsdottir, E., and Hecht, A. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. *Mol.Cell Biol.*, *26*: 8914-8927, 2006.
- Selzer, E., Wacheck, V., Lucas, T., Heere-Ress, E., Wu, M., Weilbaecher, K. N., Schlegel, W., Valent, P., Wrba, F., Pehamberger, H., Fisher, D., and Jansen, B. The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res.*, *62*: 2098-2103, 2002.
- Shibahara, S., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H., and Takahashi, K. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.*, *6*: 99-104, 2001.
- Shirayoshi, Y., Imada, S., Katayanagi, S., Uyeno, M., and Imada, M. Cyclic AMP-mediated augmentation of thrombomodulin gene expression: cell type-dependent usage of control regions. *Exp.Cell Res.*, *208*: 75-83, 1993.
- Shuen, M., Avvakumov, N., Walfish, P. G., Brandl, C. J., and Mymryk, J. S. The adenovirus E1A protein targets the SAGA but not the ADA transcriptional regulatory complex through multiple independent domains. *J.Biol.Chem.*, *277*: 30844-30851, 2002.

- Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol.Cell Biol.*, *20*: 2676-2686, 2000.
- Steingrimsson, E., Moore, K. J., Lamoreux, M. L., Ferre-D'Amare, A. R., Burley, S. K., Zimring, D. C., Skow, L. C., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., and . Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat.Genet.*, *8*: 256-263, 1994.
- Steingrimsson, E., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu.Rev.Genet.*, *38*: 365-411, 2004.
- Strickland, S., Smith, K. K., and Marotti, K. R. Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell*, *21*: 347-355, 1980.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Yamamoto, N., Shibutani, T., and Akahane, K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol.Cell Biol.*, *19*: 3842-3847, 1999.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Miura, M., and Akahane, K. Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene*, *18*: 1239-1244, 1999.
- Tachibana, M., Perez-Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., and Arnheiter, H. Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Hum.Mol.Genet.*, *3*: 553-557, 1994.
- Tachibana, M., Takeda, K., Nobukuni, Y., Urabe, K., Long, J. E., Meyers, K. A., Aaronson, S. A., and Miki, T. Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat.Genet.*, *14*: 50-54, 1996.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Takada, R., Takada, S., Watanabe, K., Udono, T., Saito, H., Takahashi, K., and Shibahara, S. Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J.Biol.Chem.*, *275*: 14013-14016, 2000.
- Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D. E., and Tachibana, M. Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum.Mol.Genet.*, *9*: 125-132, 2000.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Kawaguchi, N., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H., Takahashi, K., Noda, M., and Shibahara, S. Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations. *Biochim.Biophys.Acta*, *1574*: 15-23, 2002.

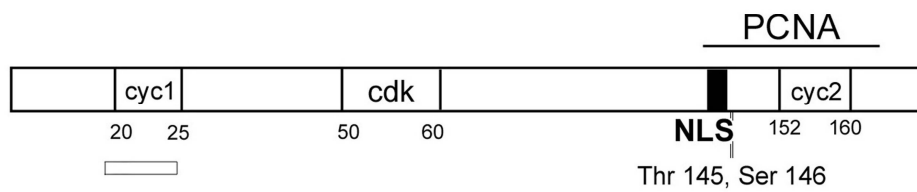
- Takemoto, C. M., Yoon, Y. J., and Fisher, D. E. The identification and functional characterization of a novel mast cell isoform of the microphthalmia-associated transcription factor. *J.Biol.Chem.*, 277: 30244-30252, 2002.
- Tanaka, H., Yamashita, T., Asada, M., Mizutani, S., Yoshikawa, H., and Tohyama, M. Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J.Cell Biol.*, 158: 321-329, 2002.
- Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Penna, L., Gaub, M. P., and Chambon, P. Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *EMBO J.*, 16: 6452-6465, 1997.
- Tassabehji, M., Newton, V. E., and Read, A. P. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat.Genet.*, 8: 251-255, 1994.
- Tetsu, O. and McCormick, F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell*, 3: 233-245, 2003.
- Thompson, J. R. and Gudas, L. J. Retinoic acid induces parietal endoderm but not primitive endoderm and visceral endoderm differentiation in F9 teratocarcinoma stem cells with a targeted deletion of the Rex-1 (Zfp-42) gene. *Mol.Cell Endocrinol.*, 195: 119-133, 2002.
- Trotter, M. J., Tang, L., and Tron, V. A. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J.Cutan.Pathol.*, 24: 265-271, 1997.
- Udono, T., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Watanabe, K., Saito, H., Fuse, N., Tachibana, M., Takahashi, K., Tamai, M., and Shibahara, S. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim.Biophys.Acta*, 1491: 205-219, 2000.
- Vachtenheim, J., Novotna, H., and Ghanem, G. Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *J.Invest Dermatol.*, 117: 1505-1511, 2001.
- Vachtenheim, J. and Borovansky, J. Microphthalmia transcription factor: a specific marker for malignant melanoma. *Prague.Med.Rep.*, 105: 318-324, 2004.
- Vance, K. W. and Goding, C. R. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res.*, 17: 318-325, 2004.
- Verastegui, C., Bille, K., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *J.Biol.Chem.*, 275: 30757-30760, 2000.

- Vidal, M. J., Loganzo, F., Jr., de Oliveira, A. R., Hayward, N. K., and Albino, A. P. Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour-suppressor gene in malignant melanomas. *Melanoma Res.*, 5: 243-250, 1995.
- Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J.Biol.Chem.*, 281: 34742-34750, 2006.
- Vo, N. and Goodman, R. H. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J.Biol.Chem.*, 276: 13505-13508, 2001.
- Voigtlander, C., Rand, A., Liu, S. L., Wilson, T. J., Pittelkow, M. R., Getz, M. J., and Kelm, R. J., Jr. Suppression of tissue factor expression, cofactor activity, and metastatic potential of murine melanoma cells by the N-terminal domain of adenovirus E1A 12S protein. *J.Cell Biochem.*, 85: 54-71, 2002.
- Wang, H. G., Rikitake, Y., Carter, M. C., Yaciuk, P., Abraham, S. E., Zerler, B., and Moran, E. Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *J.Virol.*, 67: 476-488, 1993.
- Wang, J., Devgan, V., Corrado, M., Prabhu, N. S., el Deiry, W. S., Riccardi, C., Pandolfi, P. P., Missero, C., and Dotto, G. P. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor is a p21Cip1/WAF1 transcriptional target conferring resistance of keratinocytes to UV light-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.*, 280: 37725-37731, 2005.
- Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B., and Tachibana, M. Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat.Genet.*, 18: 283-286, 1998.
- Watanabe, K., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Saito, H., Ikeda, K., Takasaka, T., Takahashi, K., Kobayashi, T., Tachibana, M., and Shibahara, S. Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene. *Pigment Cell Res.*, 15: 201-211, 2002.
- Weiler-Guettler, H., Yu, K., Soff, G., Gudas, L. J., and Rosenberg, R. D. Thrombomodulin gene regulation by cAMP and retinoic acid in F9 embryonal carcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89: 2155-2159, 1992.
- Weiss, R. H. p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell*, 4: 425-429, 2003.
- Wellbrock, C. and Marais, R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J.Cell Biol.*, 170: 703-708, 2005.
- Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Price, E. R., Cui, J., Lessnick, S. L., Wu, M., He, X., and Fisher, D. E. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J.Cell Biol.*, 158: 1079-1087, 2002.

- Widlund, H. R. and Fisher, D. E. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*, 22: 3035-3041, 2003.
- Winters, Z. E., Leek, R. D., Bradburn, M. J., Norbury, C. J., and Harris, A. L. Cytoplasmic p21WAF1/CIP1 expression is correlated with HER-2/ neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis. *Breast Cancer Res.*, 5: R242-R249, 2003.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Takeda, D. Y., and Dutta, A. Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell Biol.*, 21: 4868-4874, 2001.
- Wu, d. Y. and Yao, Z. Isolation and characterization of the murine Nanog gene promoter. *Cell Res.*, 15: 317-324, 2005.
- Wu, M., Hemesath, T. J., Takemoto, C. M., Horstmann, M. A., Wells, A. G., Price, E. R., Fisher, D. Z., and Fisher, D. E. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.*, 14: 301-312, 2000.
- Xu, W., Gong, L., Haddad, M. M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E. T., and Medrano, E. E. Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp. Cell Res.*, 255: 135-143, 2000.
- Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H., and Nakatani, Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382: 319-324, 1996.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol. Cell Biol.*, 14: 8058-8070, 1994.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J. Biol. Chem.*, 272: 503-509, 1997.
- Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K., and Shibahara, S. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J.*, 21: 2703-2714, 2002.
- Yavuzer, U., Keenan, E., Lowings, P., Vachtenheim, J., Currie, G., and Goding, C. R. The Microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein in vitro and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription. *Oncogene*, 10: 123-134, 1995.

- Zezula, J., Casaccia-Bonnel, P., Ezhevsky, S. A., Osterhout, D. J., Levine, J. M., Dowdy, S. F., Chao, M. V., and Koff, A. p21cip1 is required for the differentiation of oligodendrocytes independently of cell cycle withdrawal. *EMBO Rep.*, 2: 27-34, 2001.
- Zhang, Y., Fujita, N., and Tsuruo, T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene*, 18: 1131-1138, 1999.
- Zhu, H., Chang, B. D., Uchiumi, T., and Roninson, I. B. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle*, 1: 59-66, 2002.

Schéma molekuly lidského p21 proteinu

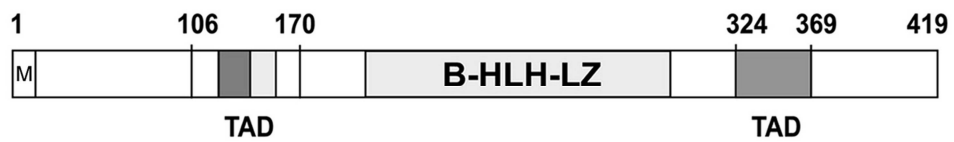


p21 Δ = del. cyc1

(neváže cyklin E, nezpomaluje
b. cyklus c G1 fázi)

OBR. 1

Schéma molekuly MITF



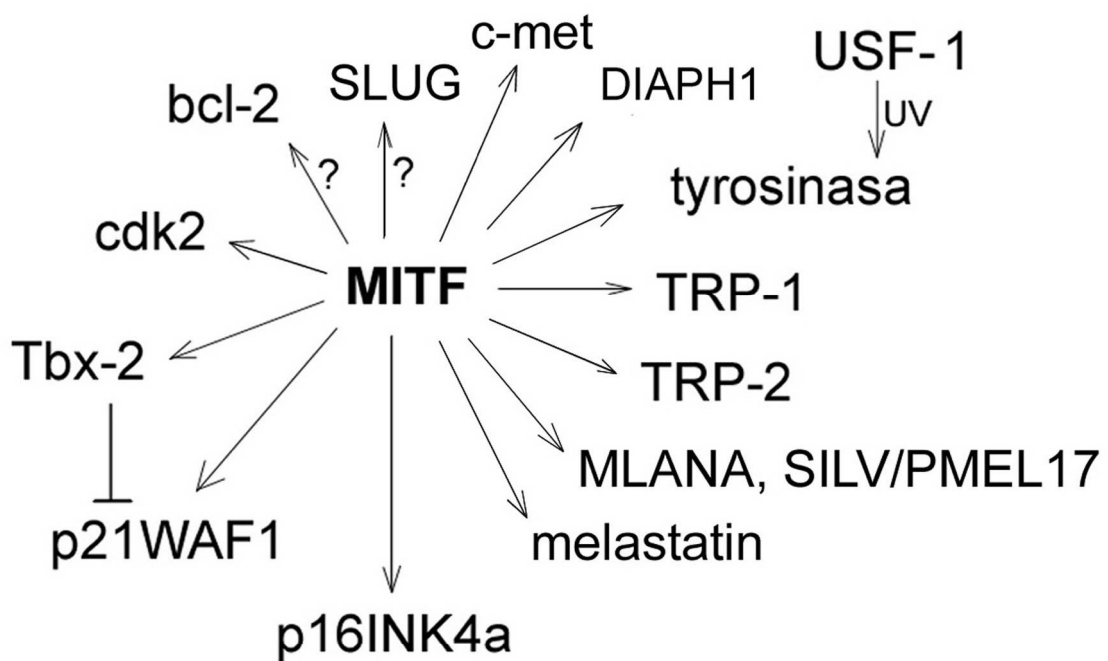
M...krátký N-terminální úsek (exon 1) specifický pro melanocytovou formu MITF

TAD...transkripčně-aktivační domény

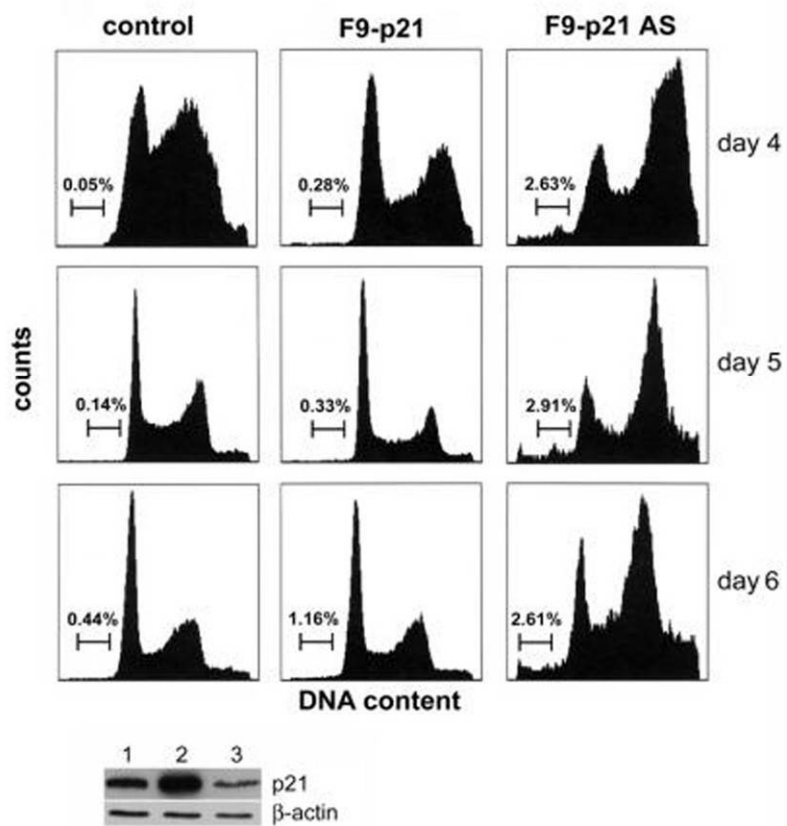
B-HLH-LZ...basic-helix-loop-helix-leucine zipper (DNA-vazebná a dimerizační oblast)

OBR. 2

PROMOTERY AKTIVOVANÉ MITF V MELANOCYTECH



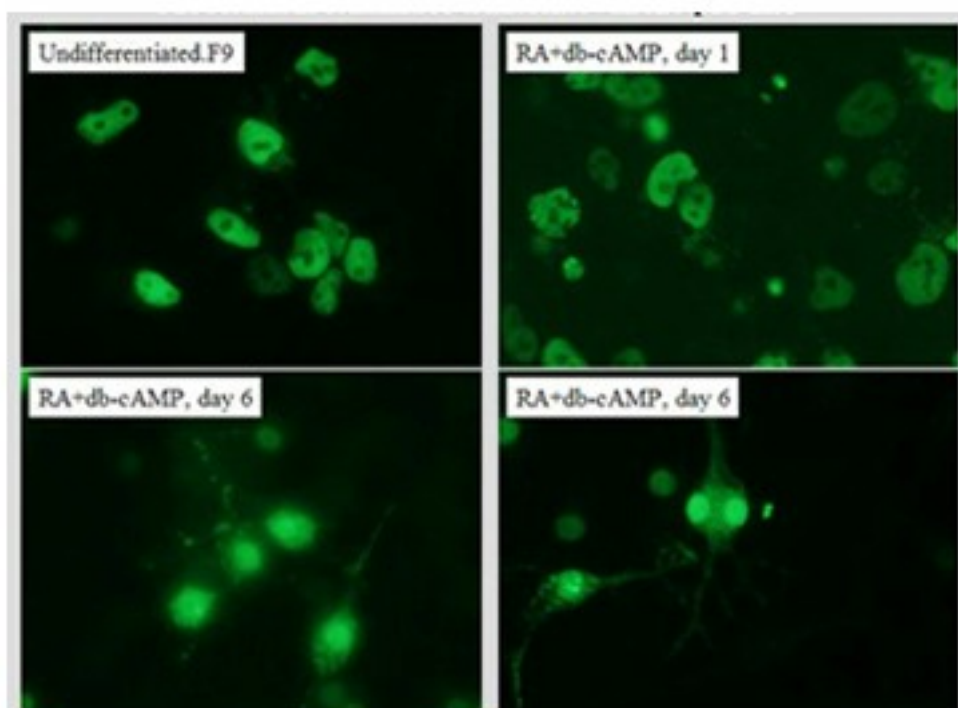
OBR. 4



Profily fází buněčného cyklu diferencovaných F9 buněk overexprimujících p21 nebo antisense-p21 mRNA

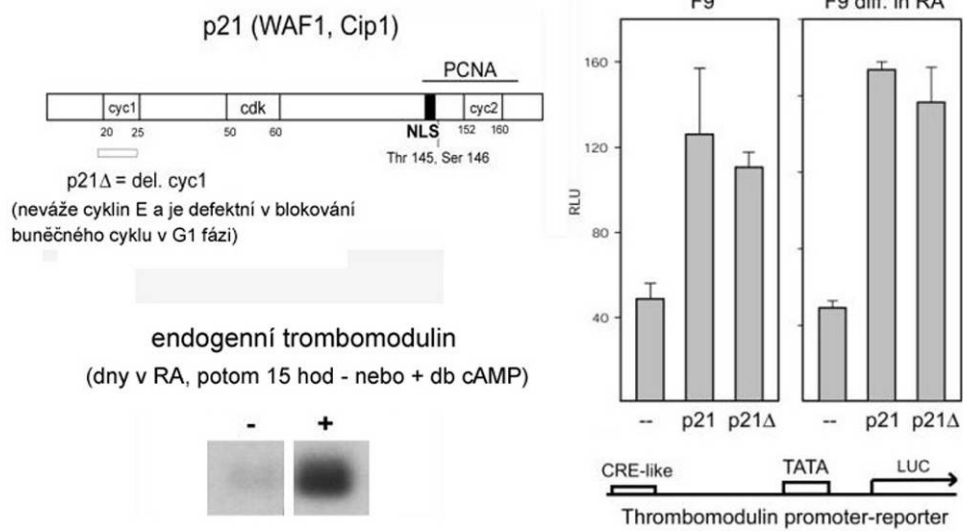
OBR. 5

Subcelulární lokalizace transfektovaného p21-HA



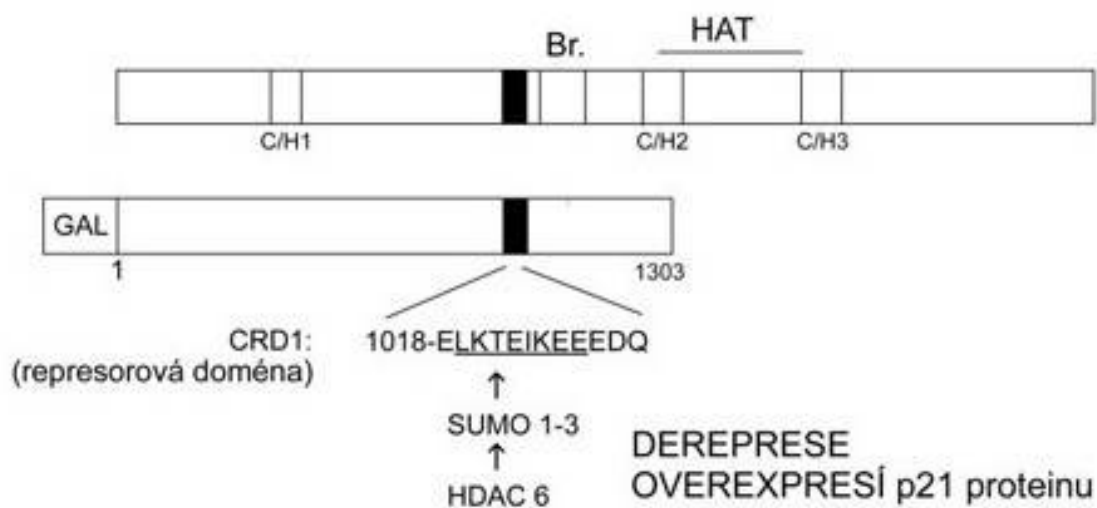
OBR. 6

Přechodná exprese exogenního p21 a p21Δ aktivuje thrombomodulin promoter-reportér



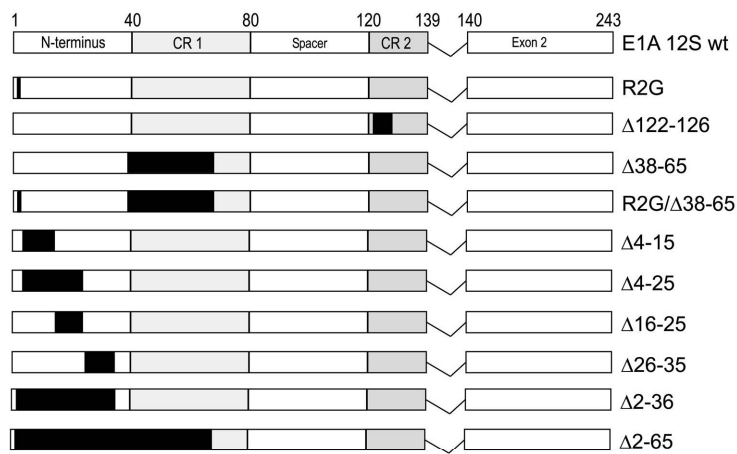
OBR. 7

Schéma p300 proteinu, lokalizace jeho transkripčně-supresorové domény, a dereprese p21 proteinem



OBR. 8

Schéma molekuly proteinu E1A a použitých mutant



OBR. 9