

V buňkách F9 (embryonální karcinom) lze indukovat pomocí kyseliny retinové a dbcAMP 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 diferenciaci. Klony F9 buněk stabilně exprimující exogenní p21 měly při diferenciaci zvýšenou hladinu trombomodulinu, specifického markeru PE diferenciaci. Transfektovaný p21 aktivoval trombomodulinový promóter-reportér a vazebné místo pro cyklin E v molekule p21 bylo postradatelné pro tuto aktivitu. Promóterová 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 proliferujících normálních melanocytech. Klony melanomových buněk se sníženou hladinou p21 proteinu dokonce proliferovaly pomaleji než kontroly. Promótery několika genů byly aktivovány transfekcí p21 expresního plasmidu. Zejména byl aktivován promóter 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 promóteru byla C-terminální oblast p21 postradatelná a byl naopak nutný krátký úsek na N-konci vázající cyklin E. Aktivace promóteru tedy probíhá mechanismem odlišným od dereprese represorové domény v p300 proteinu, což je podpořeno i zjištěním, že aktivace MITF promóteru 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 promóter je možné inhibovat adenovirovým onkoproteinem E1A, známým transkripčním represorem. Mutanty neinaktivující proteiny Rb rodiny a protein TRRAP byly schopny plně inhibovat MITF promóter. Protože tyto mutanty netransformují buňky (vzhledem k neschopnosti vázat uvedené proteiny), naskytá se možnost použít podobné mutanty (s kombinovanou mutací) při represii 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 promóter 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, promóteru způsobovaly i mutanty E1A s deletovanou doménou CR1 nebo s deletovaným N-koncem. Rovněž účinek TSA, inhibitoru histon-deacetylasy, na represii E1A mutantami byl odlišný u obou promóterů. Tyto výsledky ukazují na odlišný způsob koaktivace endogenního a transfektovaného cílového promóteru pro MITF.

Ačkoli bylo identifikováno více genů jejichž exprese je řízena transkripčním faktorem MITF, mechanismus aktivace transkripce cílových promóterů 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 represii cílového endogenního promóteru, 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 MITFdependentní promoter. 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.