

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT

*Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa*

*Praca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin*

GENY SUPRESOROWE — MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA I ICH ZNACZENIE W KONTROLI PROLIFERACJI KOMÓREK

WSTĘP

Powstanie nowotworu jest następstwem zaburzeń kontroli proliferacji komórek, ich interakcji pomiędzy sobą i otoczeniem. Skoordynowane działanie pozytywnych, jak i negatywnych, wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych czynników warunkuje prawidłowość przebiegu cyklu komórkowego. Zaburzenia tego działania leżą właśnie u podstaw niestabilności genomu komórek nowotworowych (HARTWELL 1992, WEINERT i LYDALL 1993) i prowadzą do nagromadzania się w nich błędów genetycznych (anomali) o charakterze dominującym lub recesywnym. Zmiany dominujące polegają przede wszystkim na aktywacji protoonkogenów w onkogeny. Zmiany recesywne zaś wynikają z braku syntezy lub syntezy nieaktywnych białek kodowanych przez geny, zwane genami supresorowymi nowotworów, recesywnymi onkogenami, czy wręcz anty-onkogenami (MARSHALL 1991, BISHOP 1991, WEINBERG 1991, BRYANT 1993). Określane są one również jako geny przeciwstawiające się rozwojowi nowotworu (KLEIN 1993).

Przez wiele lat zainteresowanie onkogenami zdominowało badania molekularnych podstaw nowotworzenia. Badania genów supresorowych mają krótszą historię i ich dynamiczny rozwój rozpoczął się w połowie lat osiemdziesiątych, kiedy to uświadomiono sobie, że do rozwoju nowotworów oprócz onkogenów muszą przyczyniać się jeszcze inne czynniki. Wskazówki o obecności w komórkach genów nie pozwalających na powstanie nowotworu uzyskano w różnego typu badaniach. Pierwsze dane otrzymano badając mieszańce (hybrydy), powstałe w wyniku fuzji komórek nowotworowych i prawidłowych. Hybrydy nie wykazywały cech komórek nowotworowych, wstrzyknięte zwierzętom nie wywoływały nowotworów, ale często obserwowano ich powrót do fenotypu nowotworowego. Następowo to po utracie, w czasie kolejnych podziałów, chromosomu(ów) pochodzącego z komórki prawidłowej (HARRIS 1993a, ANDERSON i STANBRIDGE 1993, NODA 1993). Wskazywało to na supresję w hybrydach fenotypu nowotworowego poprzez produkty genów obecnych tylko w komórkach prawidł-

lowych. Dalsze, bardzo istotne dane, świadczące o udziale genów supresorowych w genetycznym podłożu nowotworzenia, pochodziły z badań historii rodzin, w których występowały nowotwory, przede wszystkim siatkówczak (*retinoblastoma*). Wykazano, że do powstania nowotworu niezbędna jest utrata funkcjonowania dwóch alleli genu supresorowego, następująca zarówno na drodze predyspozycji genetycznej, jak też w efekcie licznych mutacji somatycznych (MARSHALL 1991, BISHOP 1991, EVANS i PROSSER 1992). Do wykrycia genów supresorowych przyczyniają się też badania stopnia utraty heterozygotyczności komórek nowotworowych (loss of heterozygosis, LOH), badania cytogenetyczne, jak również badania różnych mutacji (WEINBERG 1991, NOWELL 1994, HARRIS 1993b).

Przedmiotem artykułu jest omówienie sposobów działania niektórych z poznanych dotąd genów supresorowych, a także genów „podejrzanych” o takie właściwości (tabela 1). Jako „operacyjną” definicję genu supresorowego przyjęto propozycję WEINBERGA (1991), uznającą za gen supresorowy każdy genetyczny element, którego utrata lub inaktywacja powoduje w komórce pojawienie się różnorodnych zaburzeń wzrostu prowadzących do powstania nowotworu. Podana w tabeli 1 lista genów jest listą niepełną, ciągle bowiem są wykrywane geny, utracie funkcji których przypisuje się wywoływanie nowotworów. Produkty białkowe genów supresorowych mogą między innymi:

- występować w jądrze komórkowym i działać jako czynniki transkrypcyjne;
- w cytoplazmie i uczestniczyć w kaskadzie przekazywania sygnałów (aktywacja GTPazy);
- znajdować się w błonie komórkowej lub jej pobliżu, działając jako receptor sygnału zewnątrzkomórkowego, białko uczestniczące w adhezji komórkowej lub też w interakcji cytoszkieletu z błoną komórkową.

Tabela 1

Występowanie i właściwości białek kodowanych przez ludzkie geny supresorowe

Dziedziczny zespół	Nowotwór	Gen	Chromosom	Produkt genu i występowanie w komórce	Działanie produktu genu
Rodzinna brodawczakowatość jelita grubego (familial adenomatous polyposis coli)	gruczolakoraki jelita grubego	APC*	5q21	białko 310 kDa, cytoplazma	udział w adhezji komórek
Brak w rakach jelita grubego (deleted in colorectal carcinoma)	rak okrężnicy	DCC	18q21	białko 153–190 kDa, błona komórkowa	udział w adhezji komórek i w różnicowaniu; receptor błonowy
Rozsiany nowotwór komórek dokrewnych typ I (multiple endocrine neoplasia type I)	guzy przytarczyc, trzustki, ślinianek, piersi, kory nadnercza	MEN-1	11q13	?	?

Rozsiany nowotwór komórek dokrewnych typ II (multiple endocrine neoplasia type II)	guzy tarczycy, nerwiaki przyzwójowe	<i>MEN-2</i>	10	?	receptor o aktywności kinazy tyrozynowej ?
Nerwiakowłókienkowatość typ I (neurofibromatosis type I)	obwodowa nerwiakowłókienkowatość	<i>NF-1*</i>	17q11.2	białko 327 kDa, neurofibromina, cytoplazma	aktywator GTP-azy białka p21 ^{ras}
Nerwiakowłókienkowatość typ II (neurofibromatosis type II)	osłoniaki nerwowe, oponiaki	<i>NF-2*</i>	22q12	białko 66 kDa, błona komórkowa od strony wewnętrznej	udział w wiązaniu błony komórkowej z cytoszkieletem
—	czerniaki, glejaki, leukemie, rak płuc	<i>MTS-1</i>	9p21	białko 16 kDa, jądro komórkowe	hamowanie aktywności kinazy białkowej cdk 4
Li-Fraumeni	większość ludzkich nowotworów	<i>p53*</i>	17p12-13.3	białko 53 kDa, jądro komórkowe	czynniki transkrypcyjny, regulator cyklu komórkowego, G1-S
Siatkówczak (retinoblastoma)	siatkówczak (zarodkowy guz gałki ocznej); mięsak kostny, rak piersi	<i>Rb-1*</i>	13q14	białko 105–110 kDa, jądro komórkowe	modulator transkrypcji, regulator cyklu komórkowego, G1-S
Choroba Von Hippel-Lindau	rak nerek	<i>VHC*</i>	3p25	białko 34 kDa, błona komórkowa?	udział w adhezji komórek? przekazywanie sygnałów ?
Guz nerki typu Wilms'a	nerczak płodowy	<i>WT-1*</i>	11p13	białko 52–54 kDa, jądro komórkowe	czynniki transkrypcyjne
Wczesnie pojawiający się rodzinny rak piersi (early onset familial breast cancer)	rak piersi	?	17q	?	?
Wrodzony niebrodawczakowaty rak jelita grubego (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)	raki okrężnicy i macicy	?	2p	?	wpływ na wierność replikacji genu(ów)

* Geny oznaczone gwiazdką zostały sklonowane.

Z danych: MARX 1993a, 1994, TRAVIS 1993, KINZLER i VOGELSTEIN 1993, BISHOP 1991, HEDRICK i współaut. 1994, KUNDSON 1993.

Tak więc różnorodność funkcji białkowych produktów poszczególnych genów supresorowych jest olbrzymia. Mówi się także o właściwościach supresorowych

interferonów (LENGYEL 1993) i czynnika TGF- β (KOFF i współaut. 1993), inhibitorów angiogenezy (LIOTTA i współaut. 1991, BISHOP 1991) oraz białek uczestniczących w adhezji komórek (HEDRICK i współaut. 1993, TSUKITA i współaut. 1993). Szczególnie istotny dla procesu nowotworzenia jest udział produktów genów supresorowych w regulacji proliferacji komórek, co przedstawię na przykładach genów *p53*, *Rb* i *MST1*.

GEN *p53*

Wśród poznanych genów supresorowych gen *p53* zajmuje miejsce szczególne, przede wszystkim ponieważ najczęstszym defektem genetycznym stwierdzanym w ludzkich nowotworach są właśnie mutacje w tym genie (SOUSSE i współaut. 1994, SCHLICHTHOLZ i SOUSSE 1994). Ponadto gen *p53* gra też w komórce rolę tak zwanego strażnika genomu (LANE 1992), warunkując podjęcie przez komórkę syntezy DNA, lub wyłączając ją z cyklu, poprzez skierowanie na drogę śmierci programowanej (LANE 1993, SIKORA 1994, 1995, LOWE i współaut. 1993).

Wyjaśnienie podstawowych mechanizmów działania białka *p53* sprawiły, że gen *p53* został uznany w 1993 roku za „cząsteczkę roku” (molecule of the year, CULLOTA i KOSHLAND 1993). O genie *p53* opublikowano bardzo wiele syntetycznych opracowań dotyczących jego struktury i działania w komórce (LEVINE i MOMAND 1990, LEVINE i współaut. 1991, OREN 1992, LEVINE 1993, PRIVES 1993, SELTER i MONTENARH 1994, DONEHOVER i BRADLEY 1993, ULLRICH i współaut. 1992, VOGELSTEIN i KINZLER 1992, BERBEĆ 1994). Omówię wobec tego szczegółowiej osiągnięcia z lat 1993–1994, które w znacznym stopniu wyjaśniają molekularny mechanizm jego działania.

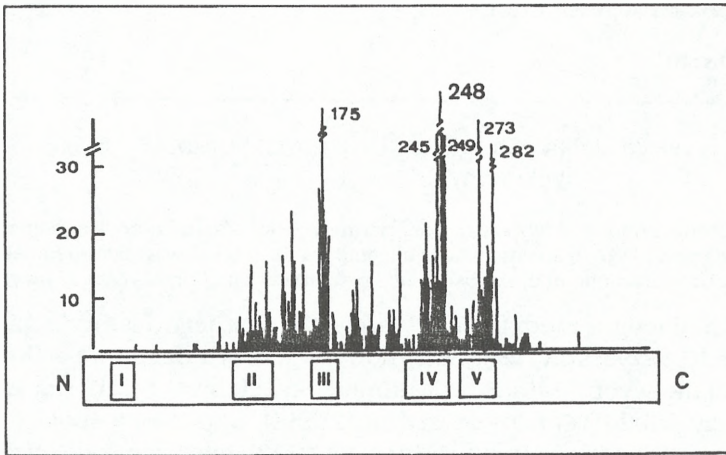
GEN *p53*, JEGO TRANSKRYPT I BIAŁKO *p53*

Gen *p53* składający się z około 20 kbp (tysięcy par zasad) zawiera 11 eksonów (sekwencji kodujących) i jest usytuowany w chromosomie 17 człowieka, a w 11 chromosomie myszy. Występuje również w chromosomach innych kręgowców. Jak dotąd nie znaleziono go w genomie bezkręgowców, chociaż przypuszcza się, że i u nich występuje gen spełniający podobne funkcje (DONEHOVER i BRADLEY 1993).

W obrębie genu *p53* stwierdzono 5 regionów o wysokiej konserwatywności, a geny *p53* różnych zwierząt odznaczają się dużą homologią. W genie *p53* zidentyfikowano też sekwencje nukleotydowe niewątpliwie uczestniczące w regulacji jego własnej transkrypcji. Obejmują one między innymi miejsce autoregulacji, miejsce podatne na stymulację przez surowicę oraz wiążące czynnik NF-1 i produkt genu *c-jun*. Ostatnio wykazano również wpływ protoonkogenu *c-myc* (REISMAN i współaut. 1993), a nawet samego białka *p53* (DEFFIE i współaut. 1993) na ekspresję genu *p53*. Dokładne omówienie zagadnień kontroli transkrypcji genu *p53* można znaleźć w artykułach przeglądowych (DONEHOVER i BRADLEY 1993, BERBEĆ 1994).

Mutacje w genie *p53* są bardzo częste. Najczęściej są to mutacje punktowe, spotykane są też insercje i delecje alleli w locus *p53*. Mutacje te występują głównie w części środkowej genu w regionach o wysokiej konserwatywności II–V

(ryc.1, HARRIS 1993b), przy czym różne nowotwory cechuje specyficzne na ogół spektrum mutacji (DONEHOVER i BRADLEY 1993, BERBEĆ 1994, SCHLICHTHOLZ i SOUSSI 1994). Tak na przykład w komórkach ludzi cierpiących na zespół Li-Fraumeni (charakteryzujący się dziedzicznymi skłonnościami do zapadania na choroby nowotworowe w młodym wieku), stwierdza się dziedziczenie mutacji w genie *p53* w jednym allelu oraz występowanie aż 13 mutacji w eksonie 7. Analiza charakteru mutacji genu *p53* w komórkach jest bardzo istotna, gdyż określony rodzaj mutacji może stanowić „molekularny dozymetr” ujawniający rodzaj wywołującego je karcynogenu i nawet ewentualnie czas trwania ekspozycji. Może też pozwalać na rozróżnienie, czy wywołujący mutacje czynnik jest pochodzenia egzo- czy endogennego (HARRIS 1993b). Przede wszystkim jednak mutacje w genie *p53*, w odróżnieniu od mutacji w innych genach supresorowych, powodują nie tylko utratę jego funkcji supresorowych, lecz również sprawiają, że zaczyna on działać jako onkogen.



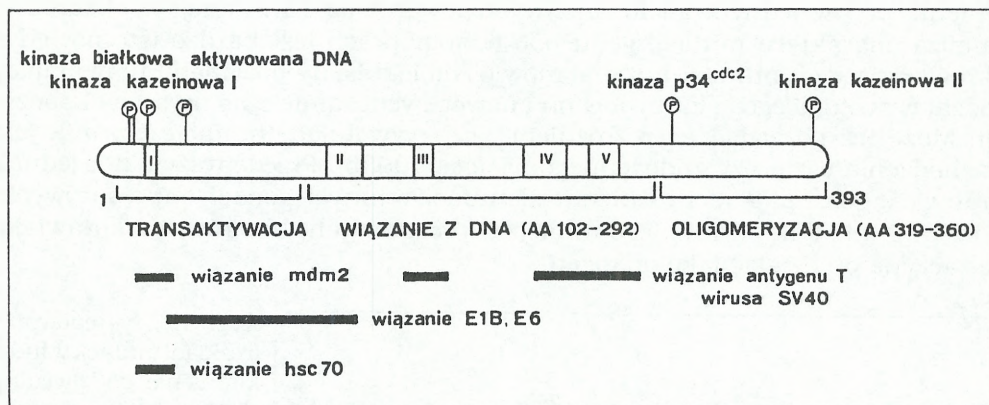
Ryc. 1. Występowanie (rozkład) mutacji w ludzkim genie *p53* (według HARRIS 1993, zmodyfikowane).

Na osi odciętych przedstawiono kolejne kodony *p53*, na osi rzędnych liczbę mutacji przypadających na poszczególny kodon (numer kodonu oznaczają liczby arabskie). Liczby rzymskie wyznaczają położenie regionów (fragmentów cząsteczki o wysokiej konserwatywności).

Wielkość transkryptu genu *p53*, zależnie od gatunku organizmu z którego pochodzi, waha się od 1.8–3.0 kbp. Białkowy produkt genu *p53* składa się z 393 aminokwasów, zawiera domeny konserwatywne (II–V) oraz szereg funkcjonalnych regionów. Uczestniczą one w wiązaniu z DNA, w oligomeryzacji cząsteczki białka *p53*, a także w wiązaniu z białkami komórkowymi (mdm 2, hsc 70) i wirusowymi (ryc. 2). N-końcowy fragment cząsteczki białka *p53* uczestniczy w procesach transaktywacji różnych genów. W C-końcu cząsteczki są zawarte natomiast sekwencje sygnałowe (NLS), odpowiedzialne za translokacje do jądra komórkowego zsyntetyzowanego w cytoplazmie białka *p53*, w momencie rozpoczęcia cyklu komórkowego (faza G1). Należy podkreślić, że obecne w cytoplazmie białko *p53* nie przejawia swej funkcji biologicznej (ROTTER i współaut. 1993).

Aminokwasy występujące w centralnej części białka *p53* (AA 102–292) uczestniczą w wiązaniu go z DNA (BARGONETTI i współaut. 1993, CHO i współaut. 1994, PRIVES 1994). Bardzo często mutacje w tych właśnie pozycjach genu *p53*, powodujące kodowanie niewłaściwych aminokwasów, uniemożliwiają powstawanie kompleksów białka *p53* z DNA, a tym samym pełnienie przez nie funkcji biologicznej. Olbrzymim osiągnięciem w 1994 roku jest zbadanie trójwymiarowej

struktury białka p53, zarówno części centralnej jego cząsteczki (CHO i współaut. 1994), jak i C-końcowego fragmentu uczestniczącego w autooligomeryzacji (CLORE i współaut. 1994). Znajomość tych struktur może pozwolić na projektowanie leków, które po połączeniu ze zmutowanym białkiem p53 mogłyby przywracać jego prawidłową konformację.



Ryc. 2. Schemat budowy mysiego białka p53 (według DONEHOVER i BRADLEY 1993, zmodyfikowany).

Liczbami rzymskimi zaznaczono regiony o wysokiej konserwatywności. Zaznaczono fragmenty cząsteczki uczestniczące w wiązaniu DNA, transaktywacji i oligomeryzacji, a także w wiązaniu białek komórkowych i wirusowych. Uwidoczniono miejsca fosorylacji przeprowadzanej przez różne kinazy.

Najważniejszą potranslacyjną modyfikacją białka p53 jest jego fosorylacja. Są ufosorylowane przede wszystkim reszty serynowe w wyniku działania kilku specyficznych kinaz białkowych, takich jak kinazy kazeinowe I i II (HUPP i współaut. 1992), kinazy cdk2 (BISCHOFF i współaut. 1990, SEGAWA i współaut. 1993), kinaza aktywowana DNA (DONEHOVER i BRADLEY 1993), jak również kinaza C (BAUDIER i współaut. 1992, SKOUV i współaut. 1994). Fosorylacji ulegają także, występujące w N-końcu cząsteczki, reszty treoninowe działaniem kinazy MAP aktywowanej przez mitogeny (MILNE i współaut. 1994). Stopień ufosorylowania białka p53 wywołuje jego zmiany konformacyjne i zmiany właściwości, a w rezultacie zmiany działania w komórce (ULLRICH i współaut. 1992 i 1993). Tak na przykład dla jądrowej lokalizacji białka p53 szczególne znaczenie wydaje się mieć ufosorylowanie seryny znajdującej się w pozycji 315 cząsteczki (BISCHOFF i współaut. 1990, ADDINSON i współaut. 1990).

Prawidłowe białko p53 najprawdopodobniej funkcjonuje jako oligomer (tetrametr, STENGER i współaut. 1992). Jego różne formy konformacyjne są wykrywane specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi (MILNER 1991). Tworzy ono kompleksy z wieloma komórkowymi i wirusowymi białkami (patrz tabela 2), przy czym niewątpliwie skład kompleksów może być różny w różnych komórkach, a także w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Funkcjonalne znaczenie takich kompleksów zostanie omówione w dalszej części artykułu.

Zmutowane białka p53 charakteryzują się znacznie dłuższym okresem półtrwania (3–7 h, LEVINE i współaut. 1991, ZAMBETTI i LEVINE 1993) niż białko

prawidłowe (5–20 min). Wykazują też zmienioną termowrażliwość i w przeciwieństwie do formy prawidłowej występują jedynie w cytoplazmie. W zależności od rodzaju mutacji, białka zmutowane często przybierają odmienną konformację (tak zwaną promotorową) niż białko prawidłowe (o konfiguracji „supresorowej”) (MILNER 1991), mogą też one tracić zdolność do oligomeryzacji a także do wnikania do jądra komórkowego, zwłaszcza jeśli w wyniku mutacji uległy skróceniu od C-końca. Zmutowane białka nie tworzą też kompleksów, zwłaszcza z onkogennymi białkami wirusowymi, co ma olbrzymie znaczenie dla działania tych białek w komórce. Dokładniejsze porównanie właściwości prawidłowego białka p53 z właściwościami białek zmutowanych przedstawiono w pracy przeglądowej (ZAMBETTI i LEVINE 1993). W komórkach mogą też występować heterooligomery zmutowanego i prawidłowego białka p53, co więcej w takich kompleksach w białku prawidłowym może zostać „wymuszona” konformacja białka zmutowanego (DONEHOVER i BRADLEY 1993, MILNER i MEDCALF 1991).

Tabela 2

Komórkowe i wirusowe białka zdolne do tworzenia kompleksów z białkiem p53

Białka komórkowe	Białka onkogenne kodowane przez
Czynniki transkrypcyjne	adenowirusy
SP-1	białko E1-B
WT-1	
TBF	papowawirusy
CBF	duży antygen T wirusa SV40
Produkty onkogenów	wirusy Papilloma
mdm2	białko E6
Białko uczestniczące w replikacji DNA	
RPA	
Białko pośredniczące w interakcji p53 z białkiem wirusowym E6	
E6-AP	
Kinaza cdc 2	
Kinaza kazeinowa 2	

Z danych: DONEHOVER i BRADLEY 1993, DUTTA i współaut. 1993, HAINES i współaut. 1994, LEVINE 1993, MAHESWARA i współaut. 1993.

BIOLOGICZNE I MOLEKULARNE MECHANIZMY DZIAŁANIA BIAŁKA p53

Biologiczne efekty działania prawidłowego białka p53 w komórce przejawiają się przede wszystkim jako:

- zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 i zahamowanie wzrostu komórek,
- utrzymanie stabilności genomu,
- zahamowanie transformacji nowotworowej i wzrostu nowotworów,
- indukowanie programowanej śmierci komórek, zwłaszcza po uszkodzeniach DNA.

Produkty białkowe zmutowanego genu *p53*, przeciwnie, nie wywołują wymienionych wyżej efektów i w konsekwencji mogą powodować transformację nowotworową komórek.

Mechanizmy molekularne leżące u podstaw działania produktu genu *p53* przedstawia tabela 3.

Przyczynę bezpośredniej regulacji replikacji DNA przez białko *p53* upatrywano od dawna w jego interakcji z bliżej nieokreślonym, wówczas nie rozpoznanym, białkiem replikacyjnym, odpowiedzialnym za inicjację syntezy DNA, dzięki czemu mogłoby następować zahamowanie syntezy DNA. Wydaje się, że białkiem tym może być trójskładnikowy kompleks białkowy, nazwany RPA (replication protein A), niezbędny do odmaskowania miejsca startu w syntezie DNA. Aktywność białka RPA jest znoszona po skompleksowaniu z białkiem *p53* (DUTTA i współaut. 1993).

Tabela 3

Molekularne mechanizmy działania białka *p53*

- Wiązanie z określonymi sekwencjami DNA
- Aktywacja transkrypcji z promotorów w DNA nie zawierających miejsca wiązania *p53*
- Hamowanie transkrypcji z promotorów w DNA nie zawierających miejsca wiązania *p53*
- Stymulacja wiązania z jednoniciowym DNA
- Hamowanie aktywności helikazy
- Hamowanie replikacji DNA
- Indukcja syntezy białkowego inhibitora *p21* kinaz zależnych od cyklin

Z danych PIETENPOL i VOGELSTEIN 1993, 533–536, uzupełnione.

Jako pośredni wpływ białka *p53* na replikację DNA można traktować jego udział w transaktywacji transkrypcji genów (DONEHOVER i BRADLEY 1993, ZAMBETTI i LEVINE 1993). W różnych genach zidentyfikowano specyficzne sekwencje nukleotydowe wybiórczo wiążące dimeryczne lub tetrameryczne białko *p53* (HUPP i współaut. 1992, SHAULIAN i współaut. 1993, BUTCHER i współaut. 1994). Białko *p53* może modulować ekspresję wielu genów poprzez hamowanie lub stymulowanie aktywności ich promotorów. Mówiąc najogólniej, prawidłowe białko *p53* może wpływać stymulująco (pobudzająco) na aktywność transkrypcyjną genów przyczyniających się do hamowania wzrostu komórek (na przykład *GADD45*), lub do ich intensywniejszego różnicowania (na przykład gen kodujący mięśniową kinazę kreatynową, *MCK*). Może też być negatywnym regulatorem (wpływać hamująco) aktywności genów promujących proliferację komórek (na przykład *c-fos*, *c-jun*, *c-myb*, *PCNA*, β -aktyna, *R*; ZAMBETTI i LEVINE 1993, SHIIO i współaut. 1992, VOGELSTEIN i KINZLER 1992). Ostatnio w obrębie cząsteczki białka *p53* wyróżniono nawet odrębne regiony uczestniczące w aktywacji lub represji transkrypcji (SANG i współaut. 1994).

Efektywność wiązania białka *p53* z DNA może być modyfikowana przez wiele czynników oddziałujących z C-końcem cząsteczki, wywołujących na przykład delecje aminokwasowe lub maskowanie końca (na przykład poprzez wiązanie przeciwciał monoklonalnych), a także przez czynniki zmieniające stopień ufosforylowania reszt serynowych w cząsteczce. Co więcej, niektóre związki o działaniu terapeutycznym, zwłaszcza różne leki przeciwnowotworowe i związki uszkadza-

jące DNA (TISHLER i współaut. 1993) oraz związki utleniające i chelatory (HAINAUT i MILNER 1993) mogą intensyfikować wiązanie białka p53 z DNA.

Aktywacja transkrypcji genów przez białko p53 w promotorach, które nie zawierają sekwencji nukleotydowej uczestniczącej w wiązaniu tego białka, zachodzi najprawdopodobniej za pośrednictwem innych białek, takich jak podstawowe czynniki transkrypcyjne (SP1), czy też białka CBF i TBF, wiążące się odpowiednio z występującymi w DNA sekwencjami CCAAT i TATA (SETO i współaut. 1992). Aktywacja promotora genu kodującego białko szoku cieplnego, HSP70, przez białko p53, przebiegająca z udziałem białka CBF (AGOFF i współaut. 1993), jest bardzo istotna ze względu na postulowany udział HSP70 w regulowaniu transkrypcji genu p53 (LANE i współaut. 1993).

Białko p53 będące produktem zmutowanego genu p53 (KERN i współaut. 1992, FARMER i współaut. 1992) oraz białkowe produkty onkogenów wirusowych (FARMER i współaut. 1992) hamują regulowaną przez prawidłowe białko p53 transkrypcję genów. Dlatego też o rzeczywistej efektywności transkrypcji decyduje wewnątrzkomórkowy poziom wolnego, prawidłowego białka p53.

REGULACJA WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO POZIOMU BIAŁKA p53

Białko mdm2

W komórce tylko wolne, prawidłowe białko p53 pełni funkcje supresorowe, zaś skompleksowanie go z innymi białkami unieczynnia je (tabela 2). Jednym z najważniejszych komórkowych białek „wyłączających” funkcjonowanie białka p53 jest produkt działania onkogenu *mdm2*, białko odznaczające się wysoką aktywnością transformacyjną (MOMAND i współaut. 1992). W stransformowanych komórkach mysich gen *mdm2* znaleziono w chromosomach minutowych (mouse double minute, FAKHARZADEH i współaut. 1991), w komórkach ludzkich zaś występuje on w chromosomie 12 (OLINER i współaut. 1992). W licznych komórkach nowotworowych (OLINER i współaut. 1992) gen *mdm2* ulega amplifikacji, co prowadzi do nagromadzenia się białka mdm2. Białko mdm2 występuje w kilku (co najmniej 5) formach molekularnych (OLSON i współaut. 1993), z których tylko formy z nieuszkodzonym N-końcem tworzą kompleksy z białkiem p53 (HAINES i współaut. 1994). W N-końcu białka mdm2 znajduje się bowiem domena uczestnicząca w interakcji z białkiem p53 (CHEN i współaut. 1993, BROWN i współaut. 1993). Dołączone do białka p53 białko mdm2 przesłania w nim domenę uczestniczącą w aktywacji transkrypcji i w efekcie kompleks mdm2-p53 nie wiąże się z DNA (ZAUERMAN i współaut. 1993, OLINER i współaut. 1993). Dlatego też powstanie kompleksów tych białek ma duże znaczenie w przezwyciężaniu supresorowego działania p53 na wzrost komórek (FINLAY 1993, OLINER 1993, OLINER i współaut. 1993). Ostatnio wysunięto hipotezę, że komórkowe poziomy białek mdm2 i p53 są regulowane na drodze sprzężenia zwrotnego (PICKSLEY i LANE 1993). Wydaje się to tym bardziej prawdopodobne, gdyż białko p53 indukuje w komórkach ekspresję genu *mdm2* (BARAK i współaut. 1993).

Onkogenne białka wirusowe

Szczególnie ważną rolę w „wyłączaniu” funkcjonowania białka p53, a także białka kodowanego przez inny gen supresorowy, retinoblastoma, (patrz rozdział

Gen p53), grają białka produkowane przez wirusy onkogenne, takie jak: adenowirusy (MORAN 1993), wirusy papilloma (VOUSDEN 1993) i papowawirusy (LUDLOW 1993). Pomimo, że w różny sposób eliminują działanie białka p53 to jednakże wszystkie zdolne są do wywoływania transformacji nowotworowej komórek.

Jedno z białek produkowanych przez adenowirusa Ad2, białko 55 kD E1B, wiąże się z N-końcowym fragmentem cząsteczki białka p53, niezbędnym dla jego funkcjonowania, jako transaktywatora transkrypcji. Rezultatem pojawienia się takiego kompleksu w komórce jest zahamowanie transkrypcji genów regulowanych bezpośrednio przez białko p53 (YEW i BERK 1992, YEW i współaut. 1994). Skompleksowanie białka p53 z dużym antygenem T wirusa SV40 także powoduje obniżenie efektywności regulowanej przez p53 transkrypcji genów (JIANG i współaut. 1993, SEGAWA i współaut. 1993, LUDLOW 1993, MIETZ i współaut. 1992), moduluje też niektóre funkcje antygenu T (aktywność ATP-azy, helikazy czy intensywności wiązania z DNA), które są niezbędne dla jego pełnej aktywności transformacyjnej (LUDLOW 1993, TACK i współaut. 1989).

Białko E6 produkowane przez wirusy papilloma typu 16 i 18, podobnie jak białka E1B i duży antygen T SV40, po skompleksowaniu z p53, znosi jego regulacyjne działanie w promowaniu lub hamowaniu transkrypcji genów (MIETZ i współaut. 1992, LECHNER i współaut. 1992). Jednakże główną funkcją białka E6 wydaje się być udział w usuwaniu z komórki białka p53, poprzez skierowanie go na drogę degradacji zachodzącej przy udziale systemu ubikwitynowego (SCHEFFNER i współaut. 1990, MEDCALF i MILNER 1993). W cząsteczce białka E6 wyróżnia się dwie podstawowe domeny uczestniczące w interakcji z p53: jedną związaną z hamowaniem aktywności transkrypcyjnej p53, drugą odpowiedzialną za degradację tego białka (CROOK i współaut. 1991). W wiązaniu p53 z tą ostatnią domeną białka E6 uczestniczy 100 kD białko E6-AP (E6-associated protein), będące najprawdopodobniej enzymem (ligazą) odpowiedzialnym za dołączanie cząsteczki ubikwityny do kompleksu p53-białko : E6 (HUIBREGTSE i współaut. 1993, SCHEFFNER i współaut. 1993). Obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu białka p53 w komórkach transformowanych wirusami onkogennymi z grupy *Papovirus* może mieć kluczowe znaczenie dla przebiegu wywołanej przez nie immortalizacji komórek (BAND i współaut. 1993), jak również powodować, że komórki takie nie „odpowiadają” zatrzymaniem wzrostu na uszkodzenia DNA (KESIS i współaut. 1993).

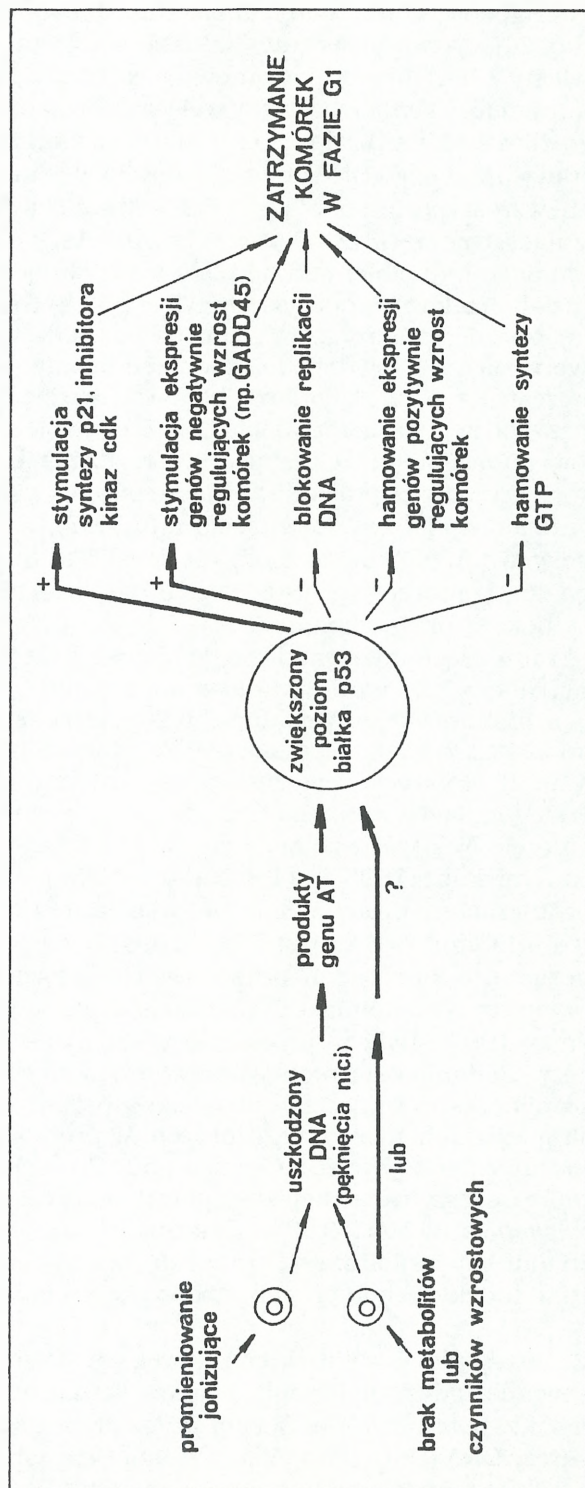
UDZIAŁ BIAŁKA p53 W REGULACJI PRZEJŚCIA KOMÓREK PRZEZ PUNKT RESTRYKCYJNY G1-S CYKLU KOMÓRKOWEGO

Pytanie, w jaki sposób prawidłowe białko p53 może hamować wzrost komórek intryguje badaczy od momentu udowodnienia jego supresorowych właściwości. Komórki bowiem, w których występuje nadekspresja genu *p53* — wywołana metodami transfekcji, działaniem czynników uszkodzających DNA, zbyt małą dostępnością niezbędnych metabolitów czy czynników wzrostowych — zatrzymują się w fazie G1 cyklu komórkowego (DNEHOVER i BRADLEY 1993, KUERBITZ i współaut. 1992, FRITSCHKE i współaut. 1993, ZHAN i współaut. 1993, MERLO i współaut. 1994, DOVER i współaut. 1994). Szlaki biochemiczne prowadzące do zwiększania ekspresji genu *p53* i ilości prawidłowego białka p53 nie są jeszcze w pełni poznane (ryc. 3). Przynajmniej w niektórych komórkach postuluje się

udział w nich produktów genów AT (*Ataksia-telangiektasia*), być może stabilizujących białko p53 i aktywujących jego syntezę (KASTAN i współaut. 1992, KHANA i LAVIN 1993). Fibroblasty i limfoblasty pacjentów cierpiących z powodu tego efektu genetycznego (mutacje w genie recesywnym AT na chromosomie 11q 22), odznaczają się nadwrażliwością na działanie czynników uszkadzających DNA, niezdolnością do naprawy uszkodzeń DNA i niestabilnością chromosomalną. Nie następuje też w nich wzrost poziomu białka p53 i indukcja pod wpływem promieniowania jonizującego genu *GADD45* (KARP i BRODER 1994). Gen *GADD45* (growth-arrest DNA-damage-inducible) koduje białko wywołujące zatrzymanie komórek w fazie G1. Szlak przekazywania sygnału AT — p53 — GADD, wzbudza coraz większe zainteresowanie badaczy ze względu na postulowany jego udział w powstaniu nowotworu piersi. Prawdopodobnie mechanizmy, poprzez które białko p53 mogłoby uczestniczyć w zatrzymaniu komórek w fazie G1, są podane na rycinie 3, niektóre z nich (wpływ na replikację DNA i regulację „pozytywnych” i „negatywnych” genów) omówiono już w poprzednich rozdziałach. Interesująca jest również hipoteza sugerująca, że prawidłowe białko p53, wywołujące obniżenie aktywności dehydrogenazy inozyno-monofosforanu (IMP), może pośrednio wpływać na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu GTP, który uczestniczy w przekazywaniu sygnałów komórkowych (SHERLEY 1991). Na ile ten mechanizm okaże się uniwersalny pokażą przyszłe badania.

Uniwersalnym być może mechanizmem, którego historia zaczęła się w końcu 1993 roku, jest udział białka p53 w indukowaniu w komórkach syntezy niewielkiego białka (21 kDa), inhibitora większości kinaz białkowych cdk, o aktywności uzależnionej od cyklin (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992, 1993, SHERR 1993, LEW i REED 1992, REED 1992). Wykrycie tego białkowego inhibitora jest zasługą badaczy zajmujących się regulacją przebiegu cyklu komórkowego oraz regulacją procesu starzenia komórek. Nazywano go białkiem WAF-1 (wild-type 53-activated fragment-1, XIONG i współaut. 1993, GU i współaut. 1993, EL-DEIRY i współaut. 1993), CIP1 (cdk-interacting protein, HARPER i współaut. 1993) czy też sdi (senescent cell derived inhibitor, NODA i współaut. 1994), używa się też nazwy PIC1. Białko to znaleziono w komórkach prawidłowych w formie kompleksu z kinazami cdk, nie wykryto go natomiast w komórkach pozbawionych białka p53 (HARPER i współaut. 1993). Były to przesłanki wskazujące na udział p53 w regulacji jego syntezy. Badania ostatnich lat potwierdziły to przypuszczenie. Indukcję przez białko p53 ekspresji genu kodującego inhibitor p21 wykazano w komórkach wielu linii ludzkich, mysich i szczurzych. W promotorze genu *p21* znaleziono sekwencje nukleotydowe wiążące białko p53. Co więcej, białko p21 wprowadzone do komórek drogą transfekcji zastępowało supresorowe działanie białka p53 (EL-DEIRY i współaut. 1993, 1994). Ostatnio doniesiono także o niezależnej od białka p53 indukcji inhibitora p21 przez surowicę i niektóre czynniki wzrostowe w mysich i ludzkich komórkach hodowanych *in vitro* (MICIELI i współaut. 1994).

Udział białka p21 w regulacji cyklu komórkowego w fazie G1 wzbudza szczególne zainteresowanie, gdyż znaleziono je także w napromieniowanych ludzkich fibroblastach i zatrzymanych w późnej fazie G1 bezpośrednio przed rozpoczęciem fazy syntezy DNA (DULIĆ i współaut. 1994). Bezpośrednią przyczyną zatrzymania komórek w tej fazie cyklu było, jak się okazało, zahamowanie



Ryc. 3. Hipotetyczny model udziału białka p53 w zatrzymaniu komórek w fazie G1, wywołanym działaniem na nie promieniowania jonizującego lub czynników środowiskowych (według DONEHOVER i BRADLEY 1993 oraz DULIĆ 1992, zmodyfikowany). Skrót AT oznacza gen odpowiedzialny za wystąpienie choroby Atakia-telangiectasia.

przez inhibitor p21 aktywności dwóch kinaz cdk, aktywowanych przez dołączenie cykliny E i cykliny A. Ilość białka p21 znacząco wzrastała po napromienieniu komórek, ale tylko takich, które zawierały funkcjonalne białko p53. Komórki nie zawierające go nie „odpowiadały” zatrzymaniem na granicy faz G1/S na napromieniowanie, nie obserwowano w nich także zahamowania aktywności kinazy cdk2 aktywowanej przez cyklinę E (DULIC i współaut. 1994). Aktywowane przez cykliny kinazy cdk przeprowadzają fosforylację wielu istotnych, dla przebiegu cyklu, substratów, w tym także genu supresorowego *Rb*. Szczegółowiej zagadnienie to zostanie przedstawione w rozdziale o genie retinoblastoma, w którym zostanie również omówione współdziałanie dwóch genów supresorowych w regulacji cyklu.

JAKIE KORZYŚCI MAJĄ KOMÓRKI Z ZATRZYMANIA W FAZIE G1 CYKLU?

Jak już powiedziano, zatrzymanie to występuje najczęściej po uszkodzeniu w komórkach DNA. Zatrzymanie zaś komórek w fazie G1 przed rozpoczęciem syntezy DNA, daje czas na jego reperację i nie zezwala na kopiowanie błędów. Na tym właśnie polega rola genu *p53* jako „strażnika genomu” (LANE 1992). Jeśli naprawa DNA się nie powiedzie, na przykład z powodu zbyt dużych uszkodzeń DNA, komórki najczęściej kierują się na drogę programowanej śmierci, to jest apoptozy. Problem apoptozy komórek jest omawiany w szeregu artykułach przeglądowych (LANE 1993, YONISH-ROUACH i współaut. 1993, SIKORA 1994, 1995).

Komórki zawierające zmutowany gen *p53* nie zatrzymują się w fazie G1. Stają się genetycznie mniej stabilne, może się w nich nagromadzać uszkodzone DNA, jak również mogą pojawiać się w nich liczne anomalie chromosomalne. W efekcie może to prowadzić do szybkiej selekcji klonów komórek nowotworowych. Z brakiem funkcjonalnego, niezmutowanego białka *p53* wiąże się zapewne genetyczna niestabilność komórek u osób z zespołami Li-Fraumeni i ich większa wrażliwość na czynniki uszkodzające DNA.

Coraz lepiej rozumiała staje się rola prawidłowego białka *p53* w „ochronie” komórek przed wystąpieniem transformacji nowotworowej, a także jego udział w utrzymywaniu integralności genomu. Natomiast zagadnienie, na ile niezbędny jest jego udział w różnicowaniu komórek prawidłowych nie jest dotychczas w pełni wyjaśnione (ROTTER i współaut. 1993, DONEHOVER i współaut. 1992). Wydaje się, że przynajmniej w niektórych komórkach układu krwiotwórczego więcej prawidłowego białka *p53* występuje w komórkach krańcowo zróżnicowanych, niż w ich dzielących się komórkach macierzystych. *In vivo* podwyższony jego poziom wykazano w „partiach” zarodków ulegających wyraźnemu różnicowaniu a także w dojrzewających spermatocytach (ROTTER i współaut. 1993). Założywszy, że również w komórkach prawidłowych ekspresja genu *p53* podlega znaczącej regulacji, można sądzić, że obniżenie ekspresji (downregulation) sprzyjałoby procesom proliferacyjnym. Pomocne w zrozumieniu funkcjonowania białka *p53* okazały się zapewne rozpoczęte ostatnio badania myszy genetycznie pozbawionych genu *p53* (*p53*-null mice, knocked-out, DONEHOVER i współaut. 1992). Chociaż ich zarodki rozwijają się prawidłowo, to jednak dorosłe myszy pozbawione genu *p53* bywają bezpłodne, częste jest też wśród nich występowanie

nowotworów. Może to sugerować, że funkcję białka p53 w rozwoju embrionalnym myszy mogą pełnić produkty innych genów.

GEN RETINOBLASTOMA (*Rb*)

Retinoblastoma (siatkówczak), guz gałki ocznej rozwijający się u dzieci, powodowany przez mutację recesywną, był pierwszym ludzkim nowotworem, w którego etiologię udokumentowano. Na przykładzie genu retinoblastomy (*Rb*) wykazano, że w przypadku rodzinnej postaci tego nowotworu, przekazywanej jako cecha dominująca, dziedziczy się tylko jeden allel genu i dopiero następująca w czasie rozwoju utrata lub mutacja drugiego prawidłowego allelu powoduje chorobę (KNUDSON 1993, HAMEL i współaut. 1993). Zjawisko to, zwane utratą heterozygotyczności (loss of heterogeneity lub reduction to homozygosity), odgrywa olbrzymią rolę także w rozwoju i innych nowotworów. Drugą postacią retinoblastomy jest postać spontaniczna, bez przeszłości rodzinnej, pojawiająca się jako wynik mutacji obydwu alleli genu *Rb*.

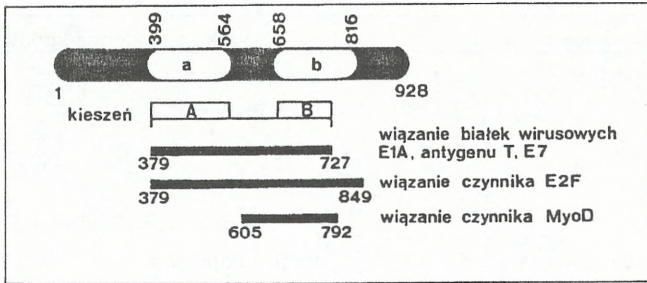
Mechanizmy działania genu *Rb* są równie złożone, jak mechanizmy działania omawianego już genu *p53*. Gra on bezpośrednią rolę w regulacji cyklu komórkowego i różnicowaniu komórek, uczestniczy w przekazywaniu wewnątrzkomórkowych sygnałów, a jego działanie pozostaje w ścisłym związku z działaniem genu *p53*. Genowi *Rb*, jego funkcjonowaniu w komórkach poświęcono liczne opracowania przeglądowe (WEINBERG 1992, 1993, MARSHALL 1991, LEWINE 1993, WIMAN 1993, LEVINE i MOMAND 1990).

GEN *Rb*, BIAŁKO p105 I JEGO FOSFORYLACJA, JAKO GŁÓWNA POTRANSLACYJNA MODYFIKACJA

Gen *Rb*, wyizolowany w 1986 roku, jest zbudowany z 200 kpz i zawiera 27 eksonów. W regionie 5' genu *Rb* występuje wiele reszt GC, co jest charakterystyczne dla genów metabolizmu podstawowego (house-keeping genes), nie ma zaś w nim promotorowych sekwencji TATA i CAAT. W eksonie 20 genu *Rb* znaleziono też sekwencje kodujące motywy strukturalne „zamka leucynowego” i „palców cynkowych”, typowych dla domen wiążących DNA (WEINBERG 1992). W obrębie eksonów 13-17 genu *Rb* występują często mutacje i delecje. Sprawia to, że zmutowane białko traci zdolność wiązania białkowych partnerów i ulegania fosforylacji (HIEBERT 1993, LEVINE 1993), co może wpływać na jego komórkową lokalizację (MITTNACHT i współaut. 1994). Aktywność promotora genu *Rb* wydaje się przynajmniej częściowo zależeć od stopnia metylacji występujących w nim reszt cytozyny (OHTANI-FUJITA i współaut. 1993). Sugeruje się też, że ekspresja genu *Rb* może być hamowana przez białko *Rb* na zasadzie autoregulacji przebiegającej z udziałem czynnika transkrypcyjnego E2F-1 (SHAN i współaut. 1994), jak również, że może być regulowana przez białko *p53* (OSIFCHIN i współaut. 1994).

Obecność transkryptu genu *Rb* stwierdza się praktycznie we wszystkich komórkach, białkowym zaś produktem genu *Rb* jest polipeptyd złożony z 928 aminokwasów, o c. cz. 105–110 kDa (różnice ciężaru wynikają z obecności form o różnym stopniu ufosforylowania). Charakteryzuje się ono długim, bo 6–12 h okresem półtrwania (GOODRICH i współaut. 1993) i występowaniem w formach

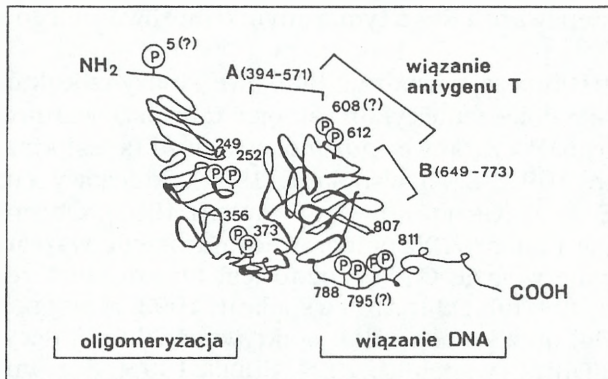
o różnym stopniu ufosforylowania. Na rycinie 4 przedstawiono schematycznie strukturę białka Rb zaznaczając regiony cząsteczki uczestniczące w wiązaniu z różnymi komórkowymi i wirusowymi białkami. Na rycinie 5 pokazano zaś przestrzenne usytuowanie w cząsteczce reszt aminokwasowych ulegających fosforylacji, zaznaczono też pozycje „kieszeni”.



Ryc. 4. Schemat budowy białka p105 (według KOUZARIDES 1993, zmodyfikowany).

Literami A i B oznaczono fragmenty cząsteczki tworzące w cząsteczce białka tak zwaną kieszeń. Zaznaczono też fragmenty cząsteczki uczestniczące w wiązaniu czynników transkrypcyjnych E2F i MyoD oraz onkogennych białek wirusowych E1A, E7 i dużego antygeny T wirusa SV40 a także miejsca sekwencji zbliżonych do sekwencji czynników TBP i TFIIB (a i b). Liczby oznaczają numery reszt aminokwasowych w łańcuchach polipeptydowych.

Szczególne znaczenie w wiązaniu białka Rb z innymi białkami mają domeny A i B, tworzące wraz z łączącym je peptydem tak zwaną kieszeń. W tym miejscu cząsteczki białka może następować dołączanie bądź to czynników transkrypcyjnych bądź też onkogennych białek wirusowych oraz cyklin, białek regulujących przebieg cyklu komórkowego (patrz tabela 4, DOWDY i współaut. 1993, KOUZARIDES 1993, GOODRICH i LEE 1993). Co więcej, sekwencje aminokwasowe w regionach A i B przejawiają istotne podobieństwo do sekwencji znajdujących w dwóch, tak zwanych podstawowych, czynnikach transkrypcyjnych TBF i TFIIB (KOUZARIDES 1993). To podobieństwo sekwencji może tłumaczyć zdolność wią-



Ryc. 5. Schemat budowy białka p105 (wg GOODRICH i LEE 1993). Zaznaczono usytuowanie aminokwasów ulegających fosforylacji, obszar „kieszeni” (A, B), jak również regiony uczestniczące w wiązaniu białka z DNA i w oligomeryzacji cząsteczki.

zania supresorowego białka Rb również z licznymi regulującymi czynnikami transkrypcyjnymi (tabela 4). Aminokwasy w obszarze kieszeni białka p105 uczestniczą także w wiązaniu go z DNA.

Tabela 4

Komórkowe i wirusowe białka zdolne do tworzenia kompleksów z białkiem p105Rb

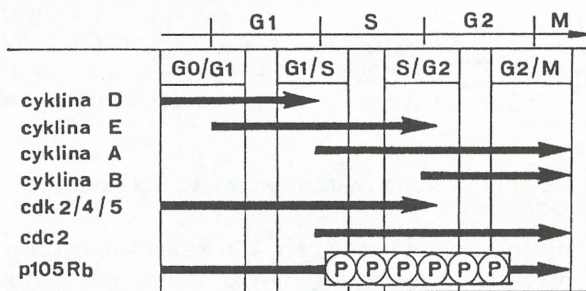
Białka komórkowe	Białka onkogenne kodowane przez
Czynniki transkrypcyjne	adenowirusy
E2F	białko E1A
MyoD	
ATF-2	papowawirusy
Ple-1	duży antygen T wirusa SV40
Produkty protoonkogenów	wirusy Papilloma
C-myc, N-myc	białko E7
C-abl	
Kinaza cdk	
Cykliny D	
Białko szoku cieplnego	
(hsc), 73 kDa	
Lamina C	

Z danych: KOUZARIDES 1993, GOODRICH i LEE 1993, DOWDY i współaut. 1993, RUSTGI i współaut. 1991, WELCH i WANG 1993, NIHEI i współaut. 1993.

W fazie G0/G1 cyklu komórkowego białko p105 nie jest lub jest jedynie słabo ufosforylowane; w kolejnych fazach cyklu coraz więcej jego reszt serynowych i treoninowych podlega fosforylacji (możliwość fosforylacji 15 reszt), osiągając maksimum w fazie G2 i M (WEINBERG 1992). Ta postranslacyjna modyfikacja białka Rb jest niezmiernie istotna, ponieważ stopień ufosforylowania wpływa na zdolność wiązania się białka p105 ze strukturami jądrowymi i decyduje o cytoplazmatycznym (białko hiperfosforylowane) lub jądrowym (białko nieufosforylowane) występowaniu Rb, a tym samym o możliwości jego funkcjonowania (WEINBERG 1992).

Fosforylację p105 przeprowadzają białkowe kinazy cdk, których aktywność regulowana poprzez dołączenie cyklin i stopień ufosforylowania oscyluje podczas cyklu komórkowego. Początkowo sądzono, że kinazą tą jest kinaza cdc2 (=cdk1) (LEES i współaut. 1991, LIN i współaut. 1991), kluczowy enzym regulujący przejście z fazy S do M (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992). Obecnie uważa się, że *in vivo* fosforylację białka p105 przeprowadzają przede wszystkim kinazy cdk występujące jedynie w fazie G1 cyklu, to jest kinaza cdk4 regulowana przez dołączenie cyklin D2 i/lub D3 (KATO i współaut. 1993, MATSUSCHIME i współaut. 1992, SHERR 1994) oraz kinaza cdk2, o aktywności której decyduje dołączenie cykliny E (ryc. 6) (DULIĆ i współaut. 1994, SHERR 1994). Zarówno cykliny D, jak i cyklina E są cyklinami typowymi tylko dla fazy G1 (MOTOKURA i ARNOLD 1993) i można je traktować jako „wielofunkcyjne” białka regulujące aktywność różnych kinaz cdk i uczestniczące w wiązaniu ich z różnymi komórkowymi substratami, w tym z białkiem p105 (HINDS i współaut. 1992).

Aktywność kinaz cdk, a zwłaszcza kinazy cdk4, może być hamowana przez działanie endogennego białkowego inhibitora p21, którego syntezę stymuluje prawidłowe białko p53 (patrz rozdział: *Udział p53 w regulacji przejścia komórek przez punkt restrykcyjny G1-S cyklu komórkowego*) oraz białka p16, będącego produktem genu *MTS1* (multiple tumor suppressor 1) umiejscowionego na krótkim ramieniu chromosomu 9 (9p21) (SERRANO i współaut. 1993, KAMB i współaut. 1993). Zmiany chromosomalne w pozycji genu *MTS1* występują w komórkach bardzo licznych linii komórkowych. Postuluje się nawet, że gen *MTS1* może być nie rozpoznany dotąd genem supresorowym (MARX 1994a i b). Białko p16, kodowane przez gen *MTS1*, jest inhibitorem tylko kinazy cdk4. Jeśli okaże się, że hamuje on aktywność kinazy cdk4 także *in vivo*, to jego znaczenie w regulacji cyklu komórkowego poprzez wpływ na poziom ufosforylowania p105 będzie wyjątkowe.



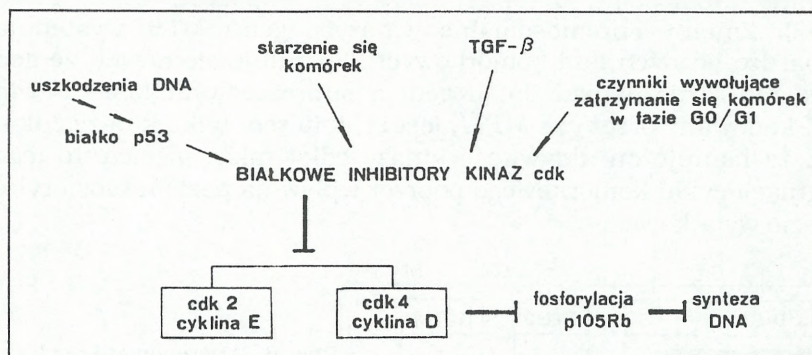
Ryc. 6. Występowanie cyklin, kinaz cdk 2/4 i cdc2 w różnych fazach cyklu komórkowego. Zaznaczono także występowanie zdefosforylowanego i ufosforylowanego białka p105.

Są odkrywane coraz to nowe endogenne inhibitory kinaz cdk pojawiające się w komórkach pod wpływem bardzo różnych czynników (ryc. 7) (HUNTER 1993, NASMYTH i HUNT 1993, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995). Tak na przykład w ludzkich komórkach epitelialnych, zahamowanych w fazie G1 po traktowaniu TGF- β , znaleziono ciepłostabilne białko p27^{KIP1}, hamujące aktywność kinaz cdk zależnych od cykliny E i A (SLINGERLAND i współaut. 1994, POLYAK i współaut. 1994). W kompleksach z kinazami cdk mogą też występować specyficzne fosfatazy, na przykład tyrozynowa fosfataza cdi1 (cyclin-dependent kinase interactor 1), regulujące ich aktywność dzięki wpływowi na stopień ich ufosforylowania (GYURIS i współaut. 1993).

Zahamowanie aktywności kinaz cdk powoduje, że w komórkach białko p105 pozostaje nieufosforylowane i jako takie oddziałuje z innymi białkami, w tym z czynnikami transkrypcyjnymi, blokując ich działanie i w efekcie syntezę DNA (patrz rozdział następny). Sądzi się, że brak fosforylacji białka Rb jest jednym z powodów niemożności wejścia starzejących się fibroblastów w fazę syntezy DNA, co w konsekwencji pociąga za sobą niepodjęcie przez nie podziałów (DIMRI i współaut. 1994). W starych ludzkich fibroblastach występują bowiem nieaktywne kinazy cdk, w odróżnieniu od komórek młodych, w których aktywne kinazy cdk fosforylują p105 (DULIĆ i współaut. 1993).

Defosforylacja p105 rozpoczyna się w anafazie, końcowym etapie mitozy. Najprawdopodobniej przeprowadzają ją serynowo-treoninowe fosfatazy — fosfataza typu 1 (PP1, LUDLOW i współaut. 1993, ALBERTS i współaut. 1993) i fosfataza typu 2 (PP2A, ALBERTS i współaut. 1993). Zahamowanie aktywności fosfatazy

PP1 przez kwas okadajowy (okadaic acid) doprowadza do hiperfosforylacji zarówno białka p105, jak i białka p53 (YATSUNAMI i współaut. 1993). Fakt ten — to znaczy unieczynnianie i zmiana subkomórkowej lokalizacji tych białek supresorowych — może mieć kapitalne znaczenie w promocji nowotworów wywołanej przez kwas okadajowy.



Ryc. 7. Udział białkowych inhibitorów kinaz cdk w regulacji ufosforylowania p105 i zahamowaniu syntezy DNA.

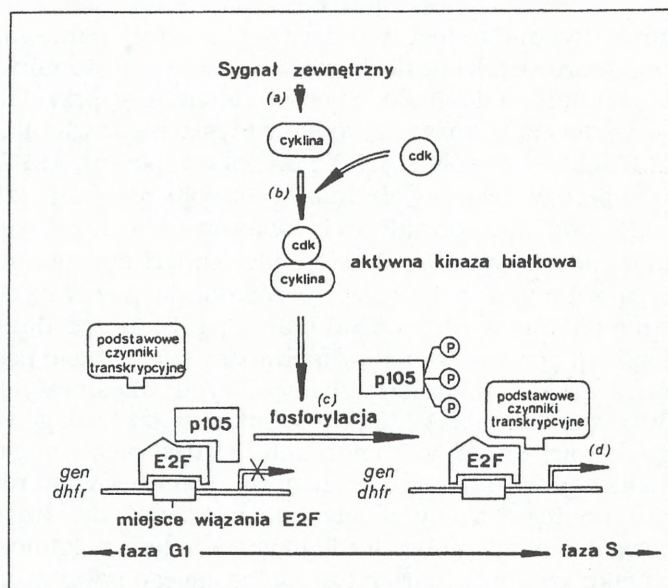
REGULACJA TRANSKRYPCJI GENÓW PRZEZ BIAŁKO p105 JAKO PODSTAWOWY MOLEKULARNY MECHANIZM JEGO DZIAŁANIA

Gen *Rb* wprowadzony do komórek nowotworowych, nie zawierających jego prawidłowego białkowego transkryptu, osłabia lub wręcz znosi ich fenotyp nowotworowy, a przede wszystkim hamuje intensywną proliferację komórek (FUNG i współaut. 1993, GOODRICH i współaut. 1991). Fakt ten, jak również jądrowa lokalizacja p105Rb w komórkach zatrzymanych w fazie G1 (MANCINI i współaut. 1994) i zdolność do tworzenia kompleksów z licznymi komórkowymi i wirusowymi białkami (tabela 4) silnie sugerowały, że białkowy produkt genu *Rb* może uczestniczyć w regulacji wzrostu komórek. To działanie p105 zachodzi przede wszystkim w komórkach będących w fazie G0/G1 cyklu dzięki jego wiązaniu się z czynnikami transkrypcyjnymi DRTFI/E2F (NEWINS 1992, LEES i współaut. 1993, La THANGUE 1994) i ATF-2 (KOUZARIDES 1993). Te heterogenne białka bezpośrednio uczestniczą w modulacji ekspresji genów związanych z odpowiedzią komórek na sygnały zewnątrzkomórkowe (*c-fos*, *c-myc*), jak też i genów, których produkty niezbędne są dla prawidłowego przebiegu licznych procesów metabolicznych związanych z podjęciem w komórkach syntezy DNA (FARNHAM i współaut. 1993). Mowa tu o genach kodujących, na przykład, reduktazie dihydrofolianowej, kinazie tymidynowej, syntazie tymidylanowej, polimerazie α , a także kinazie cdc2 (NEWINS 1992) i cyklinie D (MULLER i współaut. 1994). Przy udziale czynnika transkrypcyjnego ATF-2 jest regulowana natomiast przez p105 aktywność transkrypcyjna genu *TGF- β* , którego produkt wpływa hamująco na wzrost komórek (NEWINS 1992).

Aktywność czynnika E2F, jako aktywatora transkrypcji, jest hamowana dzięki utworzeniu kompleksu z p105 lub także z pokrewnymi mu białkami p107 i p130 (FATTAHEY i współaut. 1993, HOLLINGSWORTH i współaut. 1993, HAMEL i współaut. 1992, COBRINIK i współaut. 1992, HELIN i HARLOW 1993). W efekcie transkrypcja genów, w promotorach których występują sekwencje DNA specyfi-

cznie wiążące białka DRTF1/E2F, zostaje zahamowana. Tylko nieufosforylowane p105 wiąże się z białkiem E2F, formy ufosforylowane bądź zmutowane nie przejawiają tej właściwości. Fosforylacja p105, w wyniku działania kinaz cdk zmieniająca jego ładunek i konformację, powoduje oddysocjowanie ufosforylowanego białka Rb i umożliwia funkcjonowanie E2F, w tym jego skompleksowanie z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi. Na rycinie 8 pokazano schematycznie udział białka Rb w regulacji ekspresji genów na przykładzie genu reduktazy dihydrofolianowej. Zablockowanie przez nieufosforylowane białko p105 funkcjonowania czynnika transkrypcyjnego E2F i aktywacji genu *dhfr* blokuje komórki w fazie G1.

Są jednak dane sugerujące, że białko p105 może w pewnych warunkach powodować zatrzymanie komórek także i w fazie G2, czyli po zakończeniu syntezy DNA (KARANTZA i współaut. 1993). Należy zaznaczyć, że kompleks E2F-p105 jest tylko jednym z licznych kompleksów czynnika E2F z białkami regulatorowymi (LA THANQUE 1994, HELIN i HARLOW 1993), pojawiają się też doniesienia o obecności w komórkach czynników E2F-podobnych, co stwarza dalsze możliwości regulacji.



Ryc. 8. Regulacja ekspresji genów przez p105 i czynnik E2F na przykładzie genu reduktazy dihydrofolianowej (*dhfr*) (według HOLLINGSWORTH i współaut. 1993, zmodyfikowane).

Etapy (a) i (b) to synteza cyklin fazy G1 i tworzenie ich aktywnego enzymatycznie kompleksu z kinazami cdk. Fosforylacja, etap (c), białka Rb wywołuje jego oddysocjowanie od kompleksu z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, do którego z kolei mogą dołączać się podstawowe czynniki transkrypcyjne i aktywować ekspresję genu *DHFR*, etap (d).

Nie tylko ufosforylowanie p105 rozbija jego połączenie z E2F. To samo działanie wywołuje skompleksowanie białka p105 z białkami produkowanymi przez wirusy onkogenne, jak białko E1A adenowirusów (MORAN 1993), duży antygen T wirusa SV40 (LUDLOW 1993) i białko E7 wirusa HPV16 (VOUSDEN 1993, tabela 4). Te same bowiem regiony cząsteczki p105 uczestniczą w wiązaniu z E2F, jak i z białkami wirusowymi (ryc. 4). Stabilność kompleksów białka Rb z białkami wirusowymi jest niższa w przypadku białek wirusowych o słabych własnościach transformujących i wyższa w przypadku silnie transformujących białek. Białka wirusowe wiążą się przede wszystkim z nieufosforylowaną formą

p105 (GOODRICH i LEE 1993). Skompleksowanie to uniemożliwia białku Rb pełnienie „normalnych”, supresorowych funkcji. Zezwala ono zarazem na uaktywnienie transkrypcji zarówno wirusowych, jak i komórkowych genów, co może doprowadzić do transformacji komórek (HAMEL i współaut. 1993, MOTOKURA i ARNOLD 1993).

Regulacja ekspresji genów przez białko Rb może zachodzić nie tylko poprzez jego współdziałanie z czynnikami transkrypcyjnymi. Może również następować poprzez interakcję białka p105 z obecnymi w promotorach niektórych genów, tak zwanymi sekwencjami RCE (retinoblastoma controlling elements). Ten mechanizm regulacji zaobserwowano w przypadku genu *c-fos*, *c-myc* i insulino-podobnego czynnika wzrostu (KOUZARIDES 1993).

UDZIAŁ BIAŁKA p105 W RÓŻNICOWANIU KOMÓREK

Jak przedstawiono w poprzednim rozdziale, hamujące działanie białka p105 na efektywność transkrypcji różnych genów może zatrzymać komórki w fazie G1 cyklu komórkowego. Ta „negatywna” regulacja cyklu komórkowego dokonuje się dzięki interakcji białka p105 z bardzo różnymi, ważnymi dla przebiegu cyklu białkami. Czy jednak jego obecność w komórce jest rzeczywiście niezbędna do wystąpienia podziału komórek. Pytanie to jest tym bardziej zasadne, ponieważ liczne komórki, zarówno nowotworowe jak i prawidłowe (zwłaszcza embrionalne) mogą dzielić się pomimo braku w nich genu *Rb*. Spektakularny tego przykład stanowi prawidłowy, aż do 13 dnia ciąży, rozwój zarodków myszy nie zawierających funkcjonalnego białka Rb (LEE i współaut. 1992, JACKS i współaut. 1992, CLARKE i współaut. 1992). Dopiero w następnych dniach rozwoju pojawiają się w takich embrionach różnego rodzaju anormalności, zwłaszcza w centralnym układzie nerwowym i w układzie krwiotwórczym. Następująca śmierć embrionów jest konsekwencją powstania zaburzeń w procesie różnicowania powyższych tkanek i wskazuje na prawdopodobny w nich udział białka p105. Liczne dane dokumentują też wzrost ekspresji genu *Rb* w komórkach różnicujących się pod wpływem różnych czynników, zwłaszcza w komórkach nerwowych i mięśniowych (HAMEL i współaut. 1993, GOODRICH i LEE 1993). Fakty te, jak również brak genu *Rb* (lub jego strukturalnego odpowiednika) w komórkach bezkręgowców sugerują, że podstawową rolą białka p105 może być utrzymanie komórek w stanie spoczynkowym, niezbędnym do tego, ażeby mogły one wkroczyć na drogę różnicowania. Rolą dodatkową zaś mogłoby być funkcjonowanie jego w komórkach organizmów dorosłych jako czynnika (bariery) zapobiegającego powstawaniu nowotworu (transformacji nowotworowej). Postuluje się też, że białko p105 może „stanowić łącznik” pomiędzy licznymi czynnikami środowiska wpływającymi na przebieg cyklu komórkowego typu (na przykład hormonów czy też czynników wzrostowych) a podstawowym cyklem komórkowym (GOODRICH i LEE 1993).

Ostatnio zaproponowano nawet hipotezę omawiającą udział białka p105 w przekazywaniu komórkom sygnałów do różnicowania (HAMEL i współaut. 1993). Pod wpływem sygnału do różnicowania obecne w komórkach białko p105 pozostawać ma nieufosforylowane, a zatem aktywne, regulujące aktywność, na przykład czynnika transkrypcyjnego E2F, co może wywoływać hamowanie eks-

presji genów, których produkty są niezbędne dla proliferacji komórek, stymulację zaś ekspresji genów, których produkty mogą być istotne w procesach różnicowania. Przy braku sygnału do różnicowania, białko p105 miałyby ulegać inaktywacji wskutek ufosforylowania, a komórka mogłaby podjąć syntezę DNA i wkroczyć w fazę S cyklu komórkowego. Tak więc obecność w komórce aktywnej lub nieaktywnej formy białka p105 decydowałoby o tym, czy komórka „wychodzi” z cyklu i staje się komórką spoczynkową i ewentualnie różnicującą się, czy też pozostaje w cyklu i dzieli się. Wydaje się więc, że białko p105 może w różnych komórkach mieć inne działanie, zależnie od rodzajów otrzymywanych przez nie sygnałów zewnętrznych. Należy podkreślić, że w działaniu białka p105, zwłaszcza w procesach różnicowania, olbrzymią rolę wydaje się odgrywać jego współdziałanie z białkowym produktem protoonkogenu *c-myc* (YEN i współaut. 1992, GOODRICH i LEE 1993), jednym z bardziej istotnych regulatorów proliferacji komórek.

INNE GENY SUPRESOROWE

Podstawowe mechanizmy działania produktów genów *p53* i *Rb* są obecnie dość dobrze poznane, natomiast stosunkowo mniej wiadomo o mechanizmach działania innych genów supresorowych. Sklonowanie w latach dziewięćdziesiątych wielu z nich i poznanie budowy kodowanych przez nie białek, pozwala na wysnuwanie przypuszczeń, co do ich funkcjonowania i znaczenia w metabolizmie komórek.

GEN WT-1

Najsilniejszą ekspresję genu *WT-1* wykrywa się w komórkach rozwijającej się nerki (co przemawia za udziałem produktu tego genu w procesach różnicowania nerek), a także w komórkach grzebienia płciowego, płodowej gonadzie i w komórkach krwiotwórczych. Inaktywacja genu *WT-1* wraz z innymi genetycznymi zmianami wywołuje u dzieci nowotwór nerek, guz Wilmsa (WEINBERG 1991, GERALD 1994, RUPPRECHT i współaut. 1994). Produktem genu *WT-1* jest jądrowe białko o c.c. 52–54 kDa, zaliczane ze względu na swą budowę do grupy czynników transkrypcyjnych zawierających motyw palców cynkowych. Białko to jest zdolne do wiązania się z sekwencjami nukleotydowymi w DNA, z którymi łączą się również białka *EGR-1* (early growth response zinc-finger protein), pojawiające się bardzo szybko po zastymulowaniu komórek do podziałów, na przykład działaniem surowicy. Ze względu na kompetycję o te same miejsca wiązania w DNA, białko *WT-1* hamuje ekspresję genów stymulowaną przez białko *ERG-1*. Są to geny związane przede wszystkim z proliferacją komórek i kodujące między innymi także czynniki wzrostowe, jak insulino-podobny czynnik wzrostowy II i łańcuch A płytkowego czynnika wzrostu (GERALD 1994, RUPPRECHT i współaut. 1994). Co więcej, białko *WT-1* może również hamować ekspresję kodującego je genu (RUPPRECHT i współaut. 1994). Wykazane ostatnio współdziałanie zarówno „fizyczne”, jak i funkcjonalne białka *WT-1* z białkiem *p53* stanowi przykład wewnątrzkomórkowej regulacji funkcjonowania produktów różnych genów supresorowych (MAHESWARAN i współaut. 1993).

Omówione dotychczas geny *p53*, *Rb* i *WT-1* kodują białka jądrowe uczestniczące w regulacji transkrypcji. Produktami genów supresorowych mogą być także białka błonowe i cytoplazmatyczne, uczestniczące w adhezji komórek do podłoża (na przykład gen *APC*, *DDC*, *VHL*), w wiązaniu błony komórkowej z cytoszkieletem (gen *NF-2*), w percepcji przez komórkę różnego typu sygnałów komórkowych (na przykład *DDC*, *MEN-2*) a także ich modulacji (gen *NF-1*).

Szczególne znaczenie dla regulacji podziałów komórkowych ma produkt genu supresorowego *NF-1*, ze względu na wpływ na udział w regulacji funkcjonowania onkogenu *ras*.

GEN *NF-1*

Gen *NF-1* koduje cytoplazmatyczne białko o c.cz. 330 kDa nazwane neurofibrominą. Brak lub inaktywacja genu *NF-1* prowadzi do powstawania łagodnych lub złośliwych nowotworów, przede wszystkim w obrębie układu nerwowego (WEINBERG 1991). Mechanizm działania neurofibrominy nie jest jeszcze poznany. Jednakże obecność w jej cząsteczce domen o sekwencjach aminokwasowych, homologicznych z występującymi w białkach GAP, aktywujących GTPazę będącą produktem onkogenu *ras*, pozwala przypuszczać, że również neurofibromina mogłaby działać podobnie jak białka GAP (REY i HALL 1993). Modulacja endogennej aktywności GTPazowej białka $p21^{ras}$ jest bardzo istotna, gdyż decyduje o tym, czy występuje ono w formie aktywnej (związanej z GTP), czy też nieaktywnej (związanej z GDP) (WEISMULLER i WITTINGHOFFER 1994). Aktywne białko $p21^{ras}$, zdolne do przekazywania sygnałów mitogennych i sygnałów do różnicowania, wydaje się być niezbędne przynajmniej dwukrotnie podczas przebiegu cyklu komórkowego a także niezbędne do „wyjścia” komórek z cyklu (MOODIE i WOLFMAN 1994). Wysunięto hipotezę, według której stymulacja przez neurofibrominę lub GAP GTPazy białka $p21^{ras}$ sprawia, że ilość jego aktywnej formy spada. Wydaje się, że konsekwencją braku w komórkach neurofibrominy może być zwiększenie poziomu formy aktywnej $p21^{ras}$, zdolnej do przekazywania sygnałów mitogennych i stymulowania podziałów komórkowych, a w końcu do nowotworzenia. Tak więc neurofibrominę można traktować jako jedno z białek o działaniu antyproliferacyjnym.

WSPÓLDZIAŁANIE PRODUKTÓW ONKOGENÓW I GENÓW SUPRESOROWYCH W REGULACJI CYKLU

Znajomość podstawowych molekularnych mechanizmów działania w komórkach produktów kodowanych przez poszczególne onkogeny i geny supresorowe pozwala wysuwać przypuszczenia o możliwości skoordynowanego działania. Szczególnie ważne w regulacji cyklu jest współdziałanie białek supresorowych z białkami genów tak zwanej wczesnej odpowiedzi komórek na sygnały zewnętrzne, to jest z białkami *c-ras*, *c-myc*, *c-fos* i *c-jun* (MARSHALL 1991). Przynajmniej w niektórych komórkach przekazywanie sygnału do proliferacji poprzez białka kodowane przez onkogen *c-ras*, może pozostawać pod kontrolą genu supresorowego *NF-1*. Natomiast zmiany intensywności ekspresji genów *c-myc*, *c-jun* i *c-fos*, występujące po zadziałaniu białka *ras*, mogłyby wpływać, według ostatnio

zapropionowanej hipotezy, na aktywność kinaz cdk, enzymów fosforylujących produkty genów supresorowych *p53* i *Rb* (GEWIRTZ 1993). Z jednej strony wzrost poziomu i/lub aktywności tych białek supresorowych mogłyby na zasadzie sprzężenia zwrotnego regulować ekspresję, na przykład *c-myc* i *c-fos*, z drugiej zaś wywoływać — bezpośrednio (białko *p53*) lub też pośrednio — przy udziale czynnika E2F (białko *p105*) zatrzymanie komórek w fazie G1. W konsekwencji, komórki pozostając w tej fazie cyklu albo nie dzieliłyby się, albo też mogłyby ginąć przede wszystkim w procesie apoptozy. O intensywności apoptozy komórek decydowałby także poziom produktu onkogenu *bc1-2*, którego ekspresja podlega regulacji przez białko *p53*.

W tym szalenie uproszczonym opisie współdziałania produktów onkogenów i genów supresorowych mało uwagi poświęcono mechanizmom wywołującym zatrzymanie komórek na granicy faz G2 — M, bloku powodowanym przez wiele związków terapeutycznych. Ten etap również wydaje się pozostawać pod kontrolą produktów genów supresorowych, zwłaszcza genu *MTS1* i *p53*, poprzez ich wpływ na syntezę białkowych inhibitorów kinaz cdk, w tym kinazy *cdc2*, której aktywność jest niezbędna do rozpoczęcia podziałów mitotycznych.

UWAGI KOŃCOWE

W artykule przedstawiono podstawowe mechanizmy funkcjonowania niektórych genów supresorowych, istotnych dla przebiegu cyklu komórkowego. Szereg innych aspektów ich działania wymaga dalszych badań. Nie wyjaśnione jest w pełni, na przykład zagadnienie tak zwanej specyficzności tkankowej poszczególnych genów supresorowych, która sprawia, że brak ich powoduje powstanie nowotworów tylko w określonych narządach. Niewiele jest też informacji, poza informacjami o genach *p53* i *Rb*, o współdziałaniu w komórce innych genów supresorowych, a także o mechanizmach prowadzących do ich inaktywacji. Wymaga też dalszych badań problem udziału białka *p53* w przerzutowaniu komórek nowotworowych.

Zrozumienie mechanizmów działania przynajmniej niektórych genów supresorowych, chociaż z pewnością jeszcze nie pełne, stwarza też nowe możliwości terapeutyczne. Czynione są udane próby hamowania wzrostu komórek nowotworowych poprzez wprowadzanie do nich, metodami inżynierii genetycznej, genów *p53* i *Rb*. Myśli się też o syntezie związków, które mogłyby symulować działanie prawidłowych białek supresorowych w komórkach zawierających ich zmienione formy. Na ile tytuł jednego z artykułów *Geny supresorowe — nadzieja* okaże się prawdą, pokażą najbliższe lata.

SUPPRESSOR GENES — MOLECULAR MECHANISMS OF THEIR ACTION AND IMPORTANCE FOR CONTROL OF CELLULAR PROLIFERATION

Summary

It is generally accepted that loss of function of various genes whose products are needed for normal cell functioning contributes to cancer development. These genes are known as tumor suppressor genes, antioncogenes or genes antagonizing tumor development. The proteins coded by such genes play various roles in the cell functioning, e.g. they may be nuclear proteins acting as

transcription factors or membrane proteins involved in signal transduction, adhesion phenomena or interaction between cytoskeleton and membrane.

The two best characterized suppressor genes are *p53* and *Rb* and the functioning, at the molecular level, of the proteins coded by them became in the recent years fairly well understood. Our knowledge about other suppressor genes is less advanced, but for *WT-1*, *NF-1*, *MTS-1* and *APC* and *DCC* genes a general mode of action has already been discovered.

In the article a detailed description of actions of protein products of *p53* and *Rb* genes is given, with special emphasis on their interactions with various cellular and viral proteins. The special role of protein *p53* as the transcription factor in the regulation of expression of different genes is described and a hypothesis on its involvement in G1 cell cycle arrest is proposed. The action of *p105* as the regulator of transcription of genes, resulting from its interaction with the transcription factor *E21*, is also presented. The significance of *p105* phosphorylation for this interaction and participation of various endogenous protein inhibitors of *cdk* kinases in phosphorylation of this suppressor protein is described.

LITERATURA

- AGOFF S. N., HOU J., LINZER D. I. H., WU B., 1993. *Regulation of the human hsp 70 promoter by p53*. Science 259, 84-67.
- ADDINSON C., JENKINS J. R., STURZBECHER H. W., 1990. *The p53 nuclear localization signal is structurally linked to a p34 cdc2 kinase motif*. Oncogene 5, 423-26.
- ALBERTS A. S., THORBURN A. M., SHENOLIKAR S., MUMBY M. C., FERAMISCO J. R., 1993. *Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 388-392.
- ANDERSON M. J., STANBRIDGE E. J., 1993. *Tumor suppressor genes studied by cell hybridization and chromosomal transfer*. FASEB J. 7, 826-833.
- BAND V., DALAL S., DELMOLINO L., ANDROPHY E. J., 1993. *Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells*. EMBO J., 12, 1847-1852.
- BARAK Y., JUVEN T., HAFFNER R., OREN M., 1993. *Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity*. EMBO J., 12, 461-468.
- BARGONETTI J., MANFREDI J. J., CHEN X., MARSHAK D. R., PRIVES C., 1993. *A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein*. Gene & Develop. 7, 2565-2574.
- BAUDIER J., DELPHIN C., GRUNWALD D., KHOCHBIN S., LAWRENCE J. J., 1992. *Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S 100b-binding protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11627-11631.
- BERBEČ H., 1994. *Gen p53 człowieka*. Post. Biochem. 40, 6-11.
- BISHOP J. M., 1991. *Molecular themes in oncogenesis*. Cell 64, 235-248.
- BISCHOFF J. R., FRIEDMAN P. N., MARSHAK D. R., PRIVES C., BEACH D., 1990. *Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4766-4770.
- BROWN D. R., DEB S., MUNOZ R. M., SUBLER M. A., DEB S. P., 1993. *The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein*. Mol. Cell. Biol., 13, 6849-6857.
- BRYANT P. J., 1993. *Towards the cellular functions of tumour suppressors*. Trends in Cell Biol. 3, 31-35.
- BUTCHER S., HAINAUT P., MILNER J., 1994. *Increased salt concentration reversibly destabilizes p53 quaternary structure and sequence-specific DNA binding*. Biochem. J. 298, 513-516.
- CHEN J., MARECHAL V., LEVINE A. J., 1993. *Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains*. Mol. Cell. Biol., 13, 4107-4114.
- CHO Y., GORINA S., JEFFREY P. D., PAVLETICH N. P., 1994. *Crystal structure a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science 265, 346-355.
- CLARKE A. R., MAANDAG E. R., VAN ROON M., VAN DER LUGT N. M. T., VAN DER VALK M., HOOPER M. L., BERNIS A., TE RIELE H., 1992. *Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development*. Nature 359, 328-28-330.
- CLORE G. M., OMICHINSKI J. G., SAKAGUCHI K., ZAMBRANO M., SAKAMOTO H., APPELLA E., GRONENBORN A. M., 1994. *High-resolution structure of the oligomerisation domain of p53 by multidimensional NMR*. Science 265, 386-391.

- COBRINIK D., DOWDY S. F., HINDS P. W., MITTNACHT S., WEINBERG R. A., 1992. *The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling*. TIBS 17, 312-315.
- CROOK T., TIDY J. A., VOUDSEN K. H., 1991. Degradation of p53 can be targeted by HPVE6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. Cell 67, 547-556.
- CULOTTA E., KOSHLAND D. E. Jr., 1993. *p53 Sweeps through cancer research*. Science 262, 1958-1961.
- DEFFIE A., WU H., REINKE V., LOZANO G., 1993. *The tumor suppressor p53 regulates its own transcription*. Mol. Cell. Biol., 13, 3415-3423.
- DIMRI G. P., HARA E., CAMPISI J., 1994. *Regulation of two E2F-related genes in presenscent and senescent human fibroblasts*. J. Biol. Chem. 269, 16180-16186.
- DONEHOVER L. A., HARVEY M., SLAGLE B. L., MCARTHUR M. J., MONTGOMERY C. A., BUTEL J. S., BRADLEY A., 1992. *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors*. Nature 356, 215-221.
- DONEHOVER L. A., BRADLEY A., 1993. *The tumour suppressor p53*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 181-205.
- DOVER R., JAYARAM Y., PATEL K., CHINERY R., 1994. *p53 Expression in cultured cells following radioisotope labelling*. J. Cell Sci., 107, 1181-1184.
- DOWDY S. F., HINDS P. W., LOUIE K., REED S. I., ARNOLD A., WEINBERG R. A., 1993. *Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins*. Cell 73, 499-511.
- DULIĆ V., DRULLINGER L. E., LEES E., REED S. I., STEIN G. H., 1993. *Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk complexes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 11034-11038.
- DULIĆ V., KAUFMANN W. K., WILSON S., Tlsty T. D., LEES E., HARPER J. W., ELLEDGE S. J., REED S. I., 1994. *p53-Dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest*. Cell 76, 1013-1023.
- DUTTA A., RUPPERT J. M., ASTER J. C., WINCHESTER E., 1993. *Inhibition of DNA replication factor RPA by p53*. Nature 365, 79-82.
- EL-DEIRY W. S., TOKINO T., VELCULESCU V. E., LEVY D. B., PARSONS R., TRENT J. M., LIN D., MERCER E., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell 75, 817-825.
- EL-DEIRY W. S., HARPER J. W., O'CONNOR P. M., VELCULESCU V. E., CANMAN C. E., JACKMAN J., PIETENPOL J. A., BURRELL M., HILL D. E., WANG Y., WIMAN K. G., MERCER W. E., KASTAN M. B., KOHN K. W., ELLEDGE S. J., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1994. *WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis*. Cancer Res. 54, 1169-1174.
- EVANS H. J., PROSSER J., 1992. *Tumor-suppressor genes: cardinal factors in inherited predisposition to human cancer*. Environmental Health Perspect. 98, 25-37.
- FAKHARZADEH S. S., TRUSKO S. P., GEORGE D. L., 1991. *Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumour cell line*. EMBO J., 10, 1565-1569.
- FARMER G., BARGONETTI J., ZHU H., FRIEDMAN P., PRYWES R., PRIVES C., 1992. *Wild-type p53 activates transcription in vitro*. Nature 358, 83-86.
- FARNHAM P. J., SLANSKY J. E., KOLLMAR R., 1993. *The role of E2F in the mammalian cell cycle*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 125-131.
- FATTAEY A., HELIN K., HARLOW E., 1993. *Transcriptional inhibition by the retinoblastoma protein*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 340, 333-336.
- FINLAY C. A. *The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth*. Mol. Cell. Biol., 13, 301-306.
- FRITSCHÉ M., HAESSLER C., BRANDNER G., 1993. *Induction in nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents*. Oncogene 8, 307-318.
- FUNG Y. K. T., TANG A., MURPHREE A. L., ZHANG F. H., QIU W. R., WANG S. W., SHI X. H., LEE L., DRISCOLL B., WU K. J., 1993. *The Rb gene suppresses the growth of normal cells*. Oncogene 8, 2659-2672.
- GERALD W. L., 1994. *The molecular genetics of Wilms tumor: a paradigm of heterogeneity in tumor development*. Cancer Invest., 12, 350-359.
- GEWIRTZ D. A., 1993. *DNA damage, gene expression, growth arrest and cell death*. Oncol. Res. 5, 397-408.
- GOODRICH D. W., WANG N. P., QIAN Y. W., LEE E. Y., -H. P., LEE W. -H., 1991. *The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle*. Cell 67, 293-302.
- GOODRICH D. W., LEE W. H., 1993. *Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 43-61.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1992. *Regulacja cyklu komórkowego — historii i komplikacji ciąg dalszy*. Post. Biochem. 38, 98-107.

- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1993. *Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego*. Post. Biochem. 39, 16-25.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995. *Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów, kinaz cyklino-zależnych*. Post. Biochem. 41, 80-93.
- GU Y., TURCK C. W., MORGAN D. O., 1993. *Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit*. Nature 366, 707-710.
- GYRIS J., GOLEMIS E., CHERTKOV H., BRENT R., 1993. *Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2*. Cell 75, 791-803.
- HAINAUT P., MILNER J., 1993. *Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro*. Cancer Res. 53, 4469-4473.
- HAINES D. S., LANDERS J. E., ENGLE L. J., GEORGE D. L., 1994. *Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins*. Mol. Cell. Biol., 14, 1171-1178.
- HAMEL P. A., GALLIE B. L., PHOLLIIPS R. A., 1992. *The retinoblastoma protein and cell cycle regulation*. TIG 8, 180-185.
- HAMEL P. A., PHILLIPS R. A., MUNCASTER M., GALLIE B. L., 1993. *Speculations on the roles of RB1 in tissue specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression*. FASEB J. 7, 846-854.
- HARPER J. W., ADAMI G. R., WEI N., KEYOMARSI K., ELLEDGE S. J., 1993. *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell 75, 805-816.
- HARRIS C. C., 1993a. *How tumor suppressor genes were discovered*. FASEB J. 7, 978-979.
- HARRIS C. C., 1993b. *p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment*. Science 262, 1098-1099.
- HARTWELL L., 1992. *Defects in a cell cycle, checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells*. Cell 71, 543-546.
- HEDRICK L., CHO K. R., VOGELSTEIN B., 1993. *Cell adhesion molecules as tumour suppressors*. Trends in Cell Biol. 3, 36-39.
- HEDRICK L., CHO K. R., FEARON E. R., WU T. C., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1994. *The DDC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis*. Gene. Develop. 8, 1174-1183.
- HELIN K., HARLOW E., 1993. *The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor*. Trends Cell Biol. 3, 43-46.
- HIEBERT S. W., 1993. *Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression*. Mol. Cell. Biol., 13, 3384-3391.
- HINDS P. W., MITTNACHT S., DULIC V., ARNOLD A., REED S. I., WEINBERG R. A., 1992. *Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins*. Cell 70, 993-1006.
- HOLLINGSWORTH R. E., CHEN P. L., LEE W. -H., 1993. *Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein*. Curr. Op. Cell Biol. 5, 194-200.
- HUIBREGTSE J. M., SCHEFFNER M., HOWLEY P. M., 1993. *Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interactions of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53*. Mol. Cell. Biol., 13, 775-784.
- HUNTER T., 1993. *Braking the cycle*. Cell 75, 839-841.
- HUPP T. R., MEEK D. W., MIDGLEY C. A., LANE D. P., 1992. *Regulation of the specific DNA binding function of p53*. Cell 71, 875-886.
- JACKS T., FAZELI A., SCHMITT E. M., BRONSON R. T., GOODALL M. A., WEINBERG R. A., 1992. *Effects of an Rb mutation in the mouse*. Nature 359, 295-300.
- JIANG D., SRINIVASAN A., LOZANO G., ROBBINS P. D., 1993. *SV40 T antigen abrogates p53-mediated transcriptional activity*. Oncogene 8, 2805-2812.
- KAMB A., GRUIS, LIU Q., HARSHMAN K., TAVTIGIAN S. V., STOCKERT E., DAY III R. S., JOHNSON B. E., SKOLNICK M. H., 1993. *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science 264, 436-440.
- KARANTZA V., MAROO A., FAY D., SEDIVY J. M., 1993. *Overproduction of Rb protein after G1/S boundary causes G2 arrest*. Mol. Cell Biol., 13, 6640-6652.
- KARP J. E., BRODER S., 1994. *New directions in molecular medicine*. Cancer Res. 54, 653-665.
- KASTAN M. B., ZHAN Q., EL-DEIRY W. S., CARRIER F., JACKS T., WALSH W. V., PLUNKETT B. S., VOGELSTEIN B., FORNACE A. J. Jr., 1992. *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia*. Cell 71, 587-597.
- KATO J., MATSUSCHIME H., HIEBERT S. W., EWEN M. E., SHERR C. J., 1993. *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Gene & Develop. 7, 331-342.

- KERN S. E., PIETENPOL J. A., THIAGALINGAM S., SEYMOUR A., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1992. *Oncogenic forms of p53-regulated gene expression*. Science 256, 827-830.
- KESSIS T. D., SLEBOS R. J., NELSON W. G., KASTAN M. B., PLUNKETT B. S., HAN S. M., LORINCZ A. T., HEDRICK L., CHO K. R., 1993. *Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3988-3992.
- KHANA K. K., LAVIN M. F., 1993. *Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells*. Oncogene 8, 3307-3312.
- KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *A gene for neurofibromatosis 2*. Nature 363, 495-496.
- KLEIN G., 1993. *Genes that can antagonize tumor development*. FASEB J. 7, 821-825.
- KNUDSON A. G., 1993. *Antioncogenes and human cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10914-10921.
- KOFF A., OHTSUKI M., POLYAK K., ROBERTS J. M., MASSAGUE J., 1993. *Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF- β* . Science 260, 536-539.
- KOUZARIDES T., 1993. *Transcriptional regulation by the retinoblastoma protein*. Trends Cell Biol. 3, 211-213.
- KUERBITZ S. J., PLUNKETT B. S., WALSH W. V., KASTAN M. B., 1992. *Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7491-7495.
- LANE D. P., 1992. *p53, Guardian of the genome*. Nature 358, 15-16.
- LANE D. P., 1993. *A death in the life of p53*. Nature 362, 786-787.
- LANE D. P., MIDGLEY C., HUPP T., 1993. *Tumour suppressor genes and molecular chaperones*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 339, 369-373.
- LA THANGUE N. B., 1994. *DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control*. Cell Biol. 6, 443-450.
- LECHNER M. S., MACK D. H., FINIDE A. B., CROOK T., VOUSDEN K. H., LAIMINIS L. A., 1992. *Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53 mediated repression of transcription*. EMBO J., 11, 3045-3052.
- LEE E. Y., -H. P., CHANG C. -Y., HU N., WANG Y. -C. J., HERRUP K., LEE W. -H., BRADLEY A., 1992. *Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis*. Nature 359, 288-294.
- LEES J. A., BUCHKOVICH K. J., MARSHAK D. R., ANDERSON C. W., HARLOW E., 1991. *The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2*. EMBO J., 10, 4279-4290.
- LEES J. A., SAITO M., VIDAL M., VALENTINE M., LOOK T., HARLOW E., DYSON N., HELIN K., 1993. *The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors*. Mol. Cell. Biol., 13, 7813-7825.
- LENGYEL P., 1993. *Tumor suppressor genes: news about the interferon connections*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5893-5895.
- LEVINE A. J., MOMAND J., 1990. *Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and genes products*. Biochim. Biophys. Acta 1032, 119-136.
- LEVINE A. J., MOMAND J., FINLAY C. A., 1991. *The p53 tumor suppressor gene*. Nature 351, 453-456.
- LEVINE A. J., 1993. *The tumor suppressor genes*. Annu. Rev. Biochem. 62, 623-651.
- LEW D. J., REED S. I., 1992. *A proliferation of cyclins*. Trends in Cell Biol. 2, 77-81.
- LIN B. T. Y., GRUENWALD S., MORLA A. O., LEE W. H., WANG J. Y. J., 1991. *Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc2 kinase*. EMBO J., 10, 857-864.
- LIOTTA L. A., STEEG P. S., STETLER-STEVENSON W. G., 1991. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation*. Cell 64, 327-336.
- LOWE S. W., RULEY H. E., JACKS T., HOUSMAN D. E., 1993. *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents*. Cell 74, 957-967.
- LUDLOW J. W., 1993. *Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor protein-pRB and protein-p53*. FASEB J. 7, 866-871.
- LUDLOW J. W., GLENDENING C. L., LIVINGSTON D. M., DECAPRIO J. A., 1993. *Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein*. Mol. Cell. Biol. 13, 367-372.
- MAHESWARAN S., PARK S., BERNARD A., MORRIS J. F., RAUSCHER III F. J., HILL D. E., HABER D. A., 1993. *Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5100-5104.
- MANCINI M. A., SHAN B., NICKERSON J. A., PENMAN S., LEE W. -H., 1994. *The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 418-422.
- MARSHALL C. J., 1991. *Tumor suppressor genes*. Cell 64, 313-326.
- MARX J., 1993a. *Learning how to suppress cancer*. Science 261, 1385-1387.

- MARK J., 1993b. *How p53 suppresses cell growth*. Science 262, 1644–1645.
- MARK J., 1994a. *A challenge to p16 gene as a major tumor suppressor*. Science 264, 1846.
- MARK J., 1994b. *New tumor suppressor may rival p53*. Science 264, 344–345.
- MATSUSCHIME H., EWEN M. E., STROM D. K., KATO J. Y., HANKS S. K., ROUSSEL M. F., SHERR C. J., 1992. *Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK-J3}/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins*. Cell 71, 323–334.
- MEDCALF E. A., MILNER J., 1993. *Targeting and degradation of p53 by E6 of human papillomavirus type 16 is preferential for the 1620⁺ p53 conformation*. Oncogene 8, 2847–2851.
- MERLO G. R., VENESIO T., TAVERNA D., MARTE B. M., CALLAHAN R., HYNES N. E., 1994. *Growth suppression of normal mammary epithelial cells by wild-type p53*. Oncogene 9, 443–453.
- MICHEL P., CHEDID M., LIN D., PIERCE J. H., MERCER W. E., GIOLO D., 1994. *Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway*. Cancer Res. 54, 3391–3395.
- MIETZ J. A., UNGER T., HUIBREGTSE J. M., HOWLEY P. M., 1992. *The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein*. EMBO J., 11, 5013–5020.
- MILNE D. M., CAMPBELL D. G., CAUDWELL F. B., MEEK D. W., 1994. *Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases*. J. Biol. Chem. 269, 9253–9260.
- MILNER J., 1991. *A conformation hypothesis for the suppressor and promoter functions of p53 in cell growth control and in cancer*. Proc. R. Soc. Lond. B 245, 139–145.
- MILNER J., MEDCALF E. A., 1991. *Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation*. Cell 65, 765–774.
- MITTNACHT S., LEES J. A., DESAI D., HARLOW E., MORGAN D. O., WEINBERG R. A., 1994. *Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation*. EMBO J., 13, 118–127.
- MOMAND J., ZAMBETTI G. P., OLSON D. C., GEORGE D., LEVINE A. J., 1992. *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. Cell 69, 1237–1245.
- MOODIE S. A., WOLFMAN A., 1994. *The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation*. Trends in Genetics 10, 44–48.
- MORAN E., 1993. *Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53*. FASEB J. 7, 880–885.
- MOTOKURA T., ARNOLD A., 1993. *Cyclins and oncogenesis*. Biochim. Biophys. Acta 1155, 63–78.
- MULLER H., LUKAS J., SCHNEIDER A., WARTHOF P., BARTEK J., EILERS M., STRAUSS M., 1994. *Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2945–2949.
- NASMYTH K., HUNT T., 1993. *Dams and sluices*. Nature 366, 634–635.
- NEVINS J. R., 1992. *E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. Science 258, 424–429.
- NIHEI T., TAKAHASHI S., SAGAE S., SATO N., KIKUCHI K., 1993. *Protein interaction of retinoblastoma gene product pRb110 with M73,000 heat shock cognate protein*.
- NOWELL P. C., 1994. *Cytogenic approaches to human cancer genes*. FASEB J. 8, 408–413.
- NODA M., 1993. *Mechanism of reversion*. FASEB J. 7, 834–840.
- NODA A., NING Y., VENABLE S. F., PEREIRA-SMITH O. M., SMITH J. R., 1994. *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*. Exp. Cell Res. 211, 90–98.
- OHTANI-FUJITA N., FUJITA T., AOIKE A., OSIFCHIN N. E., ROBBINS P. D., SAKAI T., 1993. *CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Oncogene 8, 1063–1067.
- OLINER J. D., KINZLER K. W., MELTZER P. S., GEORGE D. L., VOGELSTEIN B., 1992. *Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas*. Nature 358, 80–83.
- OLINER J. D., 1993. *Discerning the function of p53 by examining its molecular interactions*. BioEssays 15, 703–707.
- OLINER J. D., PIETENPOL J. A., THIAGALINGAM S., GYURIS J., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53*. Nature 362, 857–860.
- OLSON D. C., MARECHAI V., MOMAND J., CHEN J., ROMOCKI C., LEVINE A. J., 1993. *Identification and characterization of multiple mdm2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes*. Oncogene 8, 2353–2360.
- OREN M., 1992. *p53: the ultimate suppressor gene?* FASEB J. 6, 3169–3176.
- OSIFCHIN N. E., JIANG D., OHTANI-FUJITA N., FUJITA T., CARROZA M., KIM S. J., SAKAI T., ROBBINS P. D., 1994. *Identification of a p53 binding site in the human retinoblastoma susceptibility gene promoter*. J. Biol. Chem. 269, 6383–6389.

- PICKSLEY S. M., LANE D. P., 1993. *The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?* BioEssays 15, 689-690.
- PIETENPOL J. A., VOGELSTEIN B., 1993. *No room at the p53 inn.* Nature 365, 17-18.
- POLYAK K., KATO Y. J., SOLOMON C. J., SHERR J., MASSAGUE J., ROBERTS J. M., KOFF A., 1994. *p27^{kip1}, a cyclin-cdk inhibitor links transforming growth factor β and contact inhibition to cell cycle arrest.* Genes 8, 9-22.
- PRIVES C., 1993. *Doing the right thing: feedback control and p53.* Curr. Op. Cell Biol. 5, 214-218.
- PRIVES C., 1994. *How loops, β -sheets, and a helices help us to understand p53.* Cell 78, 543-546.
- REED S. I., 1992. *The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition.* Annu. Rev. Cell Biol. 8, 529-561.
- REISMAN D., ELKIND N. B., ROY B., BEAMON J., ROFTER V., 1993. *c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif.* Cell Growth & Differ. 4, 57-65.
- REY I., HALL A., 1993. *Tumor suppressors and the regulation of GTP binding protein activity.* Trends in Cell Biol. 3, 39-42.
- ROTTER V., FOORD O., NAWOT N., 1993. *In search of the functions of normal p53 protein.* Trends in Cell Biol. 3, 46-49.
- RUPPRECHT H. D., DRUMMOND I. A., MADDEN S. L., RAUSCHER III F. J., SUKHAMATE V. P., 1994. *The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated.* J. Biol. Chem. 269, 6198-6206.
- RUSTGI A. K., DYSON N., BERNARDS R., 1991. *Amino-terminal of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product.* Nature 352, 541-544.
- SANG B. C., CHEN J. Y., MINNA J., BARBOSA M. S., 1994. *Distinct regions of p53 have a differential role in transcriptional activation and repression functions.* Oncogene 9, 853-859.
- SCHEFFNER M., WERNESSE B. A., HUIBREGTSE J. M., LEVINE A. J., HOWLEY P. M., 1990. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.* Cell 63, 1129-1136.
- SCHEFFNER M., HUIBREGTSE J. M., VIERSTRA R. D., HOWLEY P. M., 1993. *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53.* Cell 75, 495-505.
- SCHLICHTHOLZ B., SOUSSI T., 1994. *Perspektywy praktycznego zastosowania badań nad genem p53.* Post. Biochem. 40, 211-221.
- SEGAWA K., HOKUTO I., MINOWA A., OHYAMA K., TAKANO T., 1993. *Cyclin E enhances p-53-mediated transactivation.* FEBS Lett. 3, 283-286.
- SEGAWA K., MINOWA A., SUGASAWA K., TAKANO T., HANAOKA F., 1993. *Abrogation of p53-mediated transactivation by SV 40 large T antigen.* Oncogene 8, 543-548.
- SELTHER H., MONTENARH M., 1994. *The emerging picture of p53.* Int. J. Biochem. 26, 145-154.
- SERRANO M., HANNON G. J., BEACH D., 1993. *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.* Nature 366, 704-707.
- SETO E., USHEVA A., ZAMBETTI G. P., MOMAND J., HOROKOSHI N., WEINMANN R., LEVINE A. J., SHENK T., 1992. *Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 12028-12032.
- SHAN B., CHANG C. Y., JONES D., LEE W. H., 1994. *The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression.* Mol. Cell. Biol., 14, 299-309.
- SHAULIAN E., ZAUBERMAN A., MILNER J., DAVIES E. A., OREN M., 1993. *Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppressor transformation.* EMBO J., 12, 2789-2797.
- SHERLEY J. L., 1991. *Guanine nucleotide biosynthesis is regulated by the cellular p53 concentration.* J. Biol. Chem. 266, 24815-24828.
- SHERR C. J., 1993. *Mammalian G1 cyclins.* Cell 73, 1059-1065.
- SHERR C. J., 1994. *The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock.* Trends Cell Biol. 4, 15-18.
- SHIO Y., YAMAMOTO T., YAMAGUCHI N., 1992. *Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5206-5210.
- SIKORA E., 1994. *Mechanizmy programowanej śmierci komórek (apoptozy).* Post. Biochem. 40, 150-160.
- SIKORA E., 1995. *Apoptoza komórek nowotworowych.* Kosmos 44, 353-363.
- SKOUV J., JENSEN P. O., FORCHHAMMER J., LARSEN J. K., LUND L. R., 1994. *Tumor-promoting phorbol ester transiently down- modulates the p53 level and blocks the cell cycle.* Cell Growth & Differ. 5, 329-340.

- SLINGERLAND J. M., HENGST L., PAN C. H., ALEXANDER D., STAMPFER M. S., REED S. I., 1994. A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor β -arrested epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 3683-3694.
- SOUSSE T., LEGROS Y., LUBIN R., DRY K., SCHICHTHOLZ B. 1994. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int. J. Cancer* 57, 1-9.
- STENGER J. E., MAYR G. A., MANN K., TEGTMEYER P., 1992. Formation of stable homotetramers and multiples of tetramers. *Mol. Carcinog.* 5, 102-106.
- TACK L. C., WRIGHT J. H., DEB S. P., TEGTMEYER P., 1989. The p53 complex from monkey cells modulates the biochemical activities of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 63, 1310-1317.
- TISHLER R. B., CALDERWOOD S. K., COLEMAN C. N., PRICE B. D., 1993. Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res.* 53, 2212-2216.
- TRAVIS J., 1993. New tumor suppressor gene captured. *Science* 260, 1235.
- TSUKITA S., ITOH M., NAGAFUCHI A., YONEMURA S., TSUKITA S., 1993. Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J. Cell Biol.*, 123, 1049-1053.
- ULLRICH S. J., ANDERSON C. W., MERCER W. E., APPELLA E., 1992. The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 267, 15259-15262.
- ULLRICH S. J., SAKAGUCHI K., LEESMILLER S. P., FISCELA M., MERCER W. E., ANDERSON C. W., APPELLA E., 1993. Phosphorylation at ser-315 and ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5954-5958.
- VOGELSTEIN B., KINZLER K. W. (1992). p53 Function and dysfunction. *Cell* 70, 523-528.
- VOUSDEN K., 1993. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J.* 7, 872-879.
- WEINBERG R., 1991. Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138-1146.
- WEINBERG R. A., 1992. The retinoblastoma gene and gene product. *Cancer Surveys* 12, 43-57.
- WEINBERG R., 1993. Tumor suppressor genes. *Neuron* 11, 191-196.
- WEINERT T., LYDALL D., 1993. Cell cycle checkpoints, genetic instability and cancer. *Cancer Biol.* 4, 129-140.
- WEISMULLER L., WITTINGHOFFER F., 1994. Signal transduction pathways involving Ras. *Cellular Signaling* 6, 247-267.
- WELCH P. J., WANG J. Y. J., 1993. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75, 779-790.
- WIMAN K. G., 1994. The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *FASEB J.* 7, 841-845.
- XIONG Y., HANNON G. J., ZHANG H., CASSO D., KOBAYASHI R., BEACH D., 1993. p21 Is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
- YATSUNAMI J., KOMORI A., OHTA T., SUGANUMA M., FUJIKI H., 1993. Hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and p53 by okadaic acid, a tumor promoter. *Cancer Res.* 53, 239-241.
- YEN A., CHANDLER S., FORBES M. E., FUNG Y. K., T'ANG A., PEARSON R., 1992. Coupled down-regulation of the RB retinoblastoma and c-myc genes antecedes cell differentiation: possible role of RB as a „status quo” gene. *Europ. J. Cell Biol.* 57, 210-221.
- YEW P. R., BERK A. J., 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early region E1B protein. *Nature* 357, 82-85.
- YEW P. R., LIU X., BERK A. J., 1994. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes & Develop.* 8, 190-202.
- YONISH-ROUACH E., GRUNWALD D., WILDER S., KIMCHI A., MAY E., LAWRENCE J. J., MAY P., OREN M., 1993. p53-Mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 1415-1423.
- ZAMBETTI G. P., LEVINE A. J., 1993. A comparison of the biological activity of wild-type and mutant p53. *FASEB J.* 7, 855-865.
- ZAUBERMAN A., BARAK Y., RAGIMOW N., LEVY N., OREN M., 1993. Sequence-specific DNA binding by p53: identification of target sites and lack of binding to p53-MDM2 complexes. *EMBO J.*, 12, 2799-2808.
- ZHAN Q., CARRIER F., FORNACE A. J. jr., 1993. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4242-4250.