

PROTEIN P53, STABILIZOVANÝ V NÁDORECH MUTACÍ, JE VÝRAZNĚ FOSFORYLOVÁN NA SERINU 15 A SERINU 392

FREQUENT PHOSPHORYLATION OF OVEREXPRESSED MUTANT P53 PROTEIN AT SERINE 15 AND SERINE 392 RESIDUES IN HUMAN CANCERS

NENUTIL R.¹, ŠMARDOVÁ J.², HANZELKOVÁ Z.¹, PAVLOVÁ Š.³, REJTHAR A.⁴, MÜLLER P.³, VOJTĚŠEK B.³

¹ ODDĚLENÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

² PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV, FAKULTNÍ NEMOCNICE, BRNO

³ ZÁKLADNÁ EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

⁴ I. PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV, FAKULTNÍ NEMOCNICE U SVATÉ ANNY, BRNO

Souhrn: Východisko: Nádorový supresorový protein p53 je latentní transkripční faktor s krátkým poločasem rozpadu. K jeho stabilizaci a funkční aktivaci dochází v reakci na poškození DNA a to komplexním mechanismem, který zahrnuje fosforylaci proteinu na N- a C-terminálních aminokyselinových zbytcích a zadržení oligomerizovaného proteinu v jádře. Přes všechny dosažené poznatky v oblasti studia antionkogenu p53 je úloha fosforylaci p53 a buněčná lokalizace mutantního proteinu p53 stále nejasná. **Soubor nemocných a metodika:** Analyzovali jsme hladinu proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem u karcinomů prsu (23), endometria (3), ovária (6), děložního čípku (2) a vulvy (1) s použitím monoklonálních a polyklonálních protilátek rozeznávajících jednak nefosforylovaný a jednak fosforylovaný cílový epitop specifický pro fosforylovaný serin 15 a serin 392 proteinu p53. Funkční status p53 byl u stejných vzorků hodnocen s použitím metody FASAY. **Výsledky:** Funkční analýzou FASAY byla prokázána mutace p53 u 16 analyzovaných nádorů. U 11 ze 16 nádorů s mutací p53 jsme detekovali vysoké hladiny celkového proteinu p53. V 10 z těchto případů se vyskytovala také vysoká hladina fosforylace serinu 392. Ve všech případech s vysokou hladinou proteinu p53 byl protein fosforylován také na serinu 15. U 13 z 19 nádorů s nemutovaným proteinem p53 a nízkou nebo střední hladinou p53 byla fosforylace serinu 15 naopak imunohistochemicky neprokazatelná. **Závěr:** Analýza exprese proteinu p53 a jeho fosforylované formy na serinu 15 a serinu 392 odhalila vysokou hladinu obou fosforylovaných forem jako fenomén typický pro p53 mutanty s vysokou hladinou exprese.

Klíčová slova: karcinomy, imunohistochemie, FASAY, p53, fosforylace

Abstract: Background: The tumour suppressor protein p53 is a latent, short-lived transcription factor. Its stabilisation and functional activation occurs in response to DNA damage via a complex mechanism that includes protein phosphorylation at N- and C-terminal amino acid residues and nuclear retention of the oligomerised protein. However, very little is known about phosphorylation and localisation of mutant p53. **Patients and methods:** We analysed expression of p53 and its phosphorylated form in breast carcinoma (23), carcinoma of endometrium (3), ovary (6), uterine cervix (2) and vulva (1) using monoclonal and polyclonal p53 specific antibodies recognising target non-phosphorylated epitope or target phosphorylated epitope with phosphorylated serine 15 and serine 392. Functional status of p53 was evaluated using FASAY. **Results:** FASAY detected p53 mutation in 16 analysed cases. 11 of 16 tumours with p53 mutation expressed high level of total p53. In 10 of these cases there was also high level of serine 392 phosphorylation. In all cases with high p53 level, the protein was also phosphorylated at serine 15. In 13 of 19 tumours with wild-type p53 and low or intermediate level of p53, the immunostaining for serine 15 phosphorylation was negative. **Conclusion:** Analysis of expression of p53 and phosphorylated form of p53 at serine 15 and serine 392 revealed high level of both phosphorylated forms as a typical phenomena for p53 mutants with high level of expression.

Key words: carcinoma, immunohistochemistry, FASAY, p53, phosphorylation

Teoretický úvod

Při vývoji lidských nádorů se velmi často setkáváme s genetickými změnami typu mutací nebo delecí genu, který kóduje protein p53 (1). P53 je oligomerní fosfoprotein, který se váže na specifické sekvence DNA a aktivuje transkripci cílových genů jak *in vivo* tak *in vitro* (2). Nemutovaný protein p53 se v buňce nachází v latentní formě s velmi krátkým poločasem rozpadu a k jeho stabilizaci a funkční aktivaci dochází teprve při vystavení buňky nejružnějším stresovým podmínkám. Tyto stresové signály mají za následek aktivaci komplexních mechanismů v buňce, které jsou zodpovědné za fosforylaci N- a C-koncových oblastí p53, což vede i k zadržení proteinových oligomerů v jádře. Takto stabilizovaný protein p53 aktivuje transkripci genů, které kódují proteiny podílející se na regulaci buněčného cyklu, reparace DNA a/nebo apoptózy (3). Různé funkce proteinu p53 jsou tedy regulovány sérií jeho posttrans-

lačních modifikací typu fosforylace nebo acetylce (4). Jedním z nejdůležitějších míst fosforylace proteinu p53 je serin 15, který je fosforylován jak *in vivo* tak *in vitro* celou řadou kináz. Důležitou roli při modifikaci serinu 15 hrají především kinázy DNA-PK (DNA-dependentní protein kináza), ATM (ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ataxia telangiectasia related), které patří do rodiny PI-3K (phosphatidyl-inositol-3'-kinase) (5-7) a dále pak MAP kinázy (mitogen-activated protein) p38 a ERK1/2 (8, 9). Fosforylace serinu 15 je nezbytnou podmínkou pro koordinaci komplexní fosforylace proteinu p53 a je rovněž základní příčinou porušení interakce mezi proteiny p53 a MDM2. Modifikace serinu 15 a tím rozrušení vazby mezi p53 a MDM2 má za následek (i) stabilizaci nemutované formy proteinu p53 (10, 11), (ii) porušení jeho transportu z jádra a (iii) stimulaci jeho transkripčně aktivní schopnosti spojené se zvýšenou asociací s koaktivátorem p300. Druhou kritickou modi-

fikací proteinu p53 je fosforylace serinu 392 na C-konci, za níž je zodpovědná CK2 (casein kinase 2). Fosforylace serinu 392 pozitivně ovlivňuje tvorbu tetrameru i zvýšení vazby p53 na DNA (10, 12, 13). Důležitost posttranslačních modifikací proteinu p53 na serinech 15 a 392 potvrzují studie, které dokazují, že současná modifikace serinu 15 a serinu 392 je nezbytná pro účinnou transkripční funkci p53 po poškození DNA vyvolané UV zářením (10). Zda existuje souvislost mezi statusem posttranslačních modifikací proteinu p53 na obou výše zmíněných místech a rezistencí nádoru k používané terapii, zatím nebylo prokázáno.

Bodové mutace v genu p53 inaktivují funkci proteinu a způsobují tak zvýšené riziko vzniku nádorů. Gen p53 je častým cílem mutací vyvolaných různými karcinogeny u více než 50 % lidských nádorů (14). Některé typy mutací přinášejí proteinu p53 nové onkogenní vlastnosti, které jsou závislé na změně struktury proteinu. Jedná se o mutace v centrální části proteinu p53, které jsou časté u lidských nádorů. Tyto bodové mutace byly rozděleny do dvou funkčních tříd: (i) mutace v místech, která přímo ovlivňují kontakt s DNA, a (ii) mutace podílející se na stabilizaci strukturální integrity této domény (15). Nejnovější studie rovněž prokázaly, že různé typy mutací v centrální části proteinu p53 mají za následek i různé biologické vlastnosti lidských nádorů (16, 17). Přes všechny dosažené poznatky, které potvrdily, že fosforylace proteinu p53 probíhá za různých stresových podmínek na různých místech tohoto proteinu, celkový význam těchto modifikací pro funkci proteinu p53 nebyl dosud objasněn. Přestože tyto fosforylace mohou ovlivnit konformační změny nemutovaného i mutovaného proteinu p53 a tím rovněž změnit jeho DNA vazebnou aktivitu, skutečný dopad fosforylace p53 na serinech 15 a 392 u lidských nádorů exprimujících mutované formy proteinu p53 je stále nejasný.

V naší studii jsme využili fosfo-specifické protilátky rozlišující fosforylované formy proteinu p53 na serinu 392 a serinu 15 s cílem analyzovat stupeň posttranslačních modifikací tohoto proteinu na daných aminokyselinách v různých lidských nádorech. Tyto výsledky byly korelovány s výsledky imunohistochemické analýzy proteinu p53 pomocí protilátky DO1 a s výsledky funkční analýzy p53 v jednotlivých nádorových vzorcích metodou FASAY.

Material a metody

Soubor pacientek

Do studie bylo zařazeno 35 pacientek s karcinomem prsu (23), endometria (3), ovária (6), čípku (2) nebo vulvy (1). Vzorky byly získány z diagnostických resekátů, které poskytly dostatečný objem nádorové tkáně pro přípravu formol-parafinových bloků, paralelní odběr a uchování hluboce zmrazeného nativního vzorku. Tkáňový materiál pro imunohistochemickou analýzu byl fixován v neutrálním 4% formaldehydu a zalit do parafinu. Tkáňové řezy o tloušťce 4 µm byly fixovány na elektrostaticky nabitá skla (Superfrost Plus). Nativní materiál pro analýzu RNA, DNA a proteinů byl zmražen do 10 minut po odběru v tekutém dusíku.

Imunohistochemická detekce proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem

Tkáňové řezy byly odparafinovány v xylenu a rehydratovány. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována po dobu 15 minut 3% roztokem H₂O₂ v PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfátem na pH 7,5). Odmaskování antigenních epitopů bylo provedeno následovně: (i) pro detekci p53 proteinu (protilátkou DO1) povařením řezů po dobu 30 minut při 93 °C v roztoku 1mM EDTA-NaOH, pH 8,0; (ii) pro detekci p53 fosforylovaných forem [Phospho-53(ser15); FPS392] proteinu zahřátím na teplotu 93 °C po dobu 10 minut [pro Phospho-53(ser15)] resp. 30 minut (pro FPS392) v roztoku 1mM EDTA-NaOH, pH 8,0. Po promytí v PBS (3x5 minut) byly z důvodu zablokování nespecifické vazebné aktivity řezy pře-

vrstveny na dobu 15 minut roztokem 1% nízkotučného mléka v TBS (fyziologický roztok pufovaný Tris na pH 7,6). Primární monoklonální protilátky a polyklonální protilátka byly aplikovány na řezy při teplotě 4 °C přes noc. Po trojím promytí v PBS byla nanesena anti-myši resp. anti-králíčí sekundární protilátka značená biotinem a ABC reagentie (Vector Elite ABC kit, Vector) přesně dle návodu a doporučení výrobce. Peroxidázová aktivita byla vizualizována kitem DAB+ (Dako, Denmark). Po promytí v destilované vodě byly řezy dobarveny Gillovy hematoxylinem, dehydratovány, projasněny a zamontovány pro mikroskopické zhodnocení. Hladina analyzovaného proteinu byla vyhodnocena semikvantitativně. Bylo vyhodnoceno minimálně 100 jader ve dvou reprezentativních zorných polích. Jádra byla hodnocena jako negativní, slabě pozitivní nebo silně pozitivní. Výsledný index pozitivity byl pak stanoven podle vzorce:

$$\text{index pozitivity} = \text{odmocnina z \% slabé pozitivity} + \% \text{ silné pozitivity}$$

Použité protilátky

DO1 – myši monoklonální protilátka specifická pro N-koncovou oblast proteinu p53 (sekvenci aminokyselin ²⁰-SDLWKL-²⁵) (18).

FPS392 – myši monoklonální protilátka specifická pro fosforylovanou formu proteinu p53 na serinu 392 (19).

SER15 – králíčí polyklonální protilátka rozlišující fosforylovanou formu proteinu p53 na serinu 15 [Phospho-53(ser15), (Cell Signaling Technology)].

FASAY

Vzorky nádorových tkání uchovávané v kapalném dusíku byly před přípravou RNA homogenizovány v lyzačním pufru RLT (Qiagen Inc.) a uchovávány v –80 °C nebo okamžitě použity pro přípravu RNA. Metoda FASAY byla provedena dle protokolu Flamana et al. (20) s několika modifikacemi (21). Celková RNA byla izolována s využitím RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc.). cDNA byla syntetizována pomocí enzymu SuperScript II (Life Technologies Inc.), jako primer byl použit oligo(dT)₁₂. PCR byla provedena s primery P3 (5'-CCT-TGC-CGT-CCC-AAG-CAA-TGG-ATG-AT-3') a P4 (5'-ACC-CTT-TTT-GGA-CTT-CAG-GTG-GCT-GGA-GT-3') a Pfu DNA polymerázou (Stratagene). Kvasinky byly transformovány produkty PCR, linearizovaným vektorem pSS16 a nosičovou DNA (salmon sperm DNA - GibcoBRL) metodou teplotního šoku s použitím acetátu litného (22). Transformované kvasinky byly vysety na minimální medium bez leucinu a s nízkým obsahem adeninu (5 mg/ml) a kultivovány po dobu 2-3 dnů při 35 °C s následnou 2-3 denní inkubací při pokojové teplotě. Následovalo odečtení barvy nejméně 100 kvasinkových kolonií a určení poměru červených a bílých kolonií.

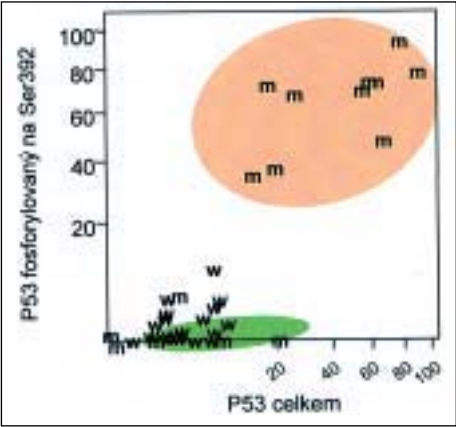
Výsledky

Analyzovali jsme expresi proteinu p53 a jeho fosforylovaných forem na serinu 15 a serinu 392 u 35 lidských nádorů. Funkční analýzou FASAY byla v tomto souboru prokázána mutace p53 u 16 nádorů a absence mutace u 19 nádorů. Tabulka 1 shrnuje výsledky imunohistochemické i funkční analýzy p53.

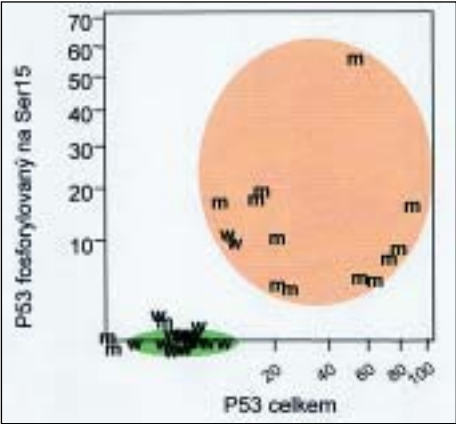
Tabulka 1: Počet nádorů dle výsledku FASAY a indexu pozitivity.

Parametr	Status p53 dle FASAY	Index pozitivity (%)			
		0	0,1-1	1,1-10	10 a více
Celkový p53	Wild-type	0	2	17	0
	Mutace	2	0	3	11
Fosforylace na Ser392	Wild-type	6	9	4	0
	Mutace	5	0	1	10
Fosforylace na Ser15	Wild-type	13	3	3	0
	Mutace	3	1	7	5

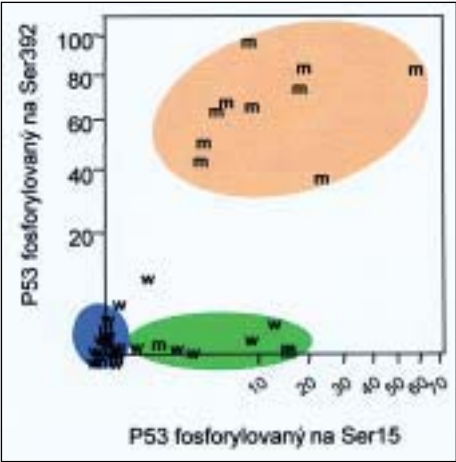
Obrázek 1: Vztah fosforylace na serinu 392 k celkové hladině proteinu p53. Analýza exprese mutované formy proteinu p53 (m) a wild-type formy proteinu p53 (w). V růžovém poli jsou případy s výraznou fosforylací serinu 392. V zeleném poli jsou případy s nedetekovatelnou nebo nízkou fosforylací serinu 392.



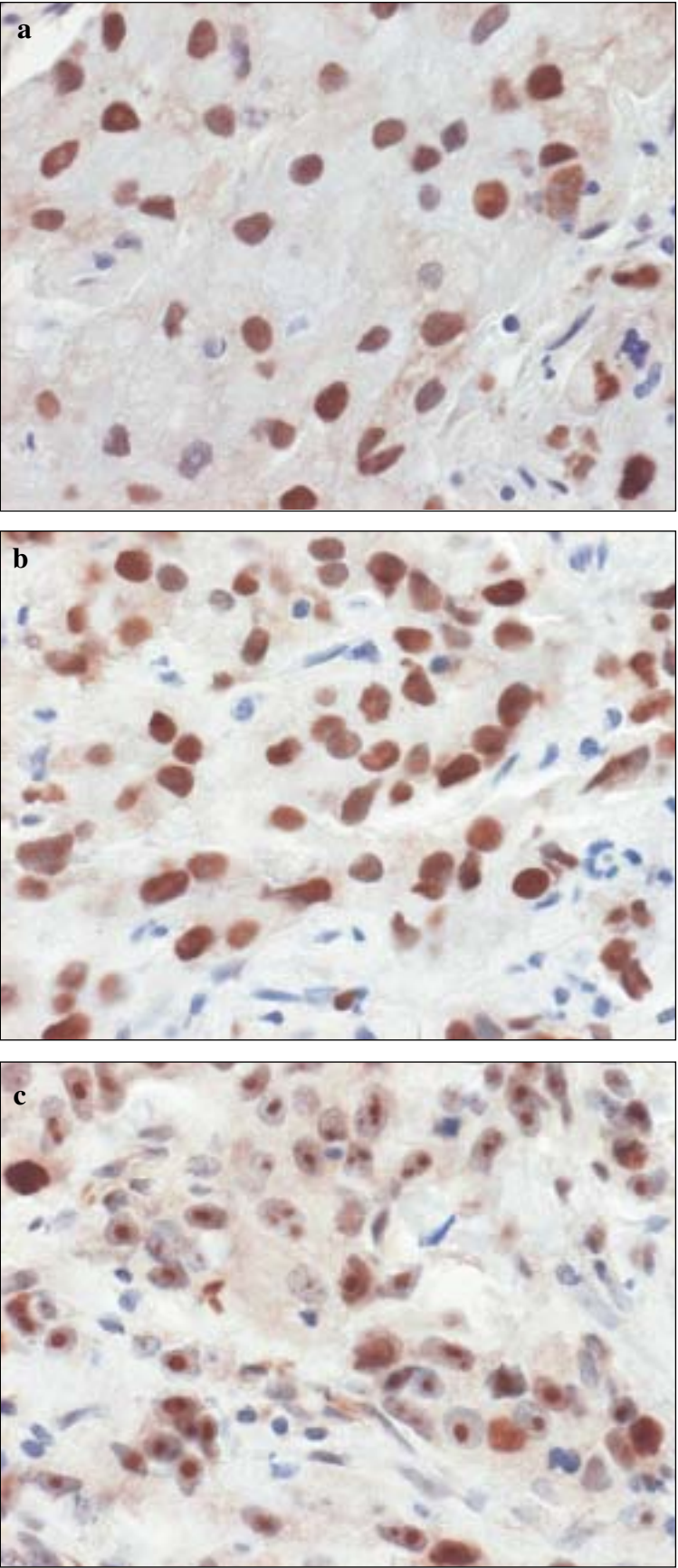
Obrázek 2: Vztah fosforylace na serinu 15 k celkové hladině proteinu p53. Analýza exprese mutované formy proteinu p53 (m) a wild-type formy proteinu p53 (w). V růžovém poli jsou případy s výraznou fosforylací serinu 15. V zeleném poli jsou případy s nedetekovatelnou nebo nízkou fosforylací serinu 15.



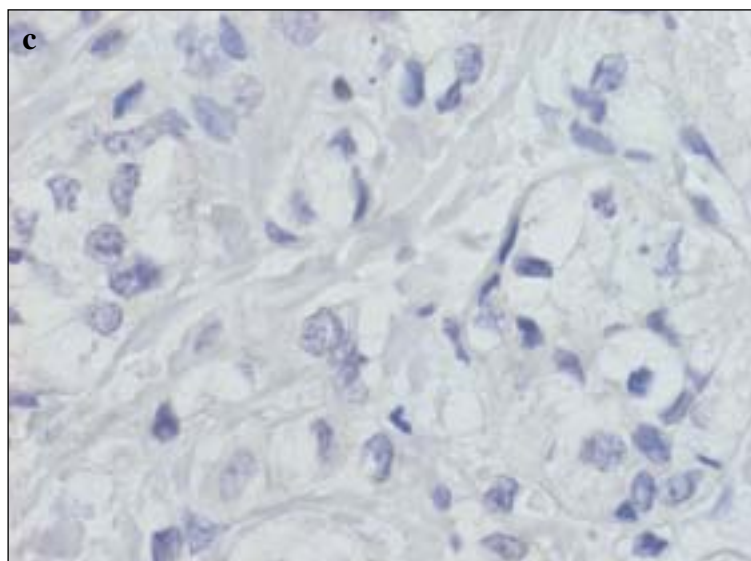
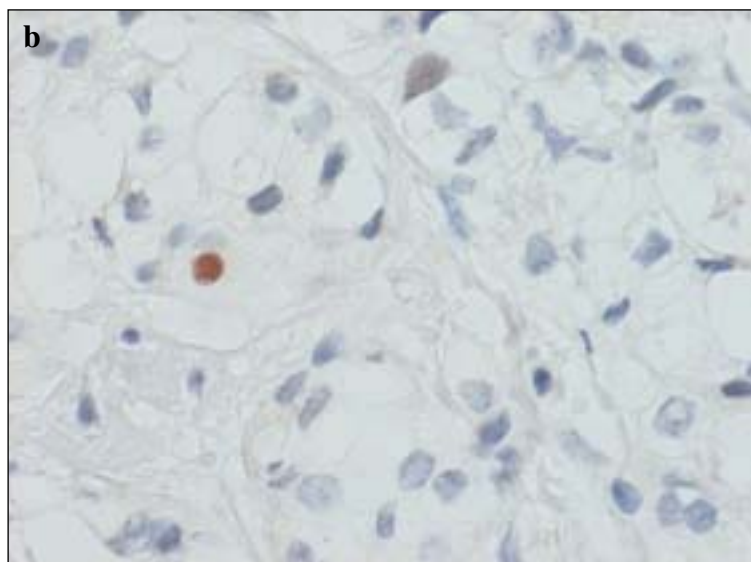
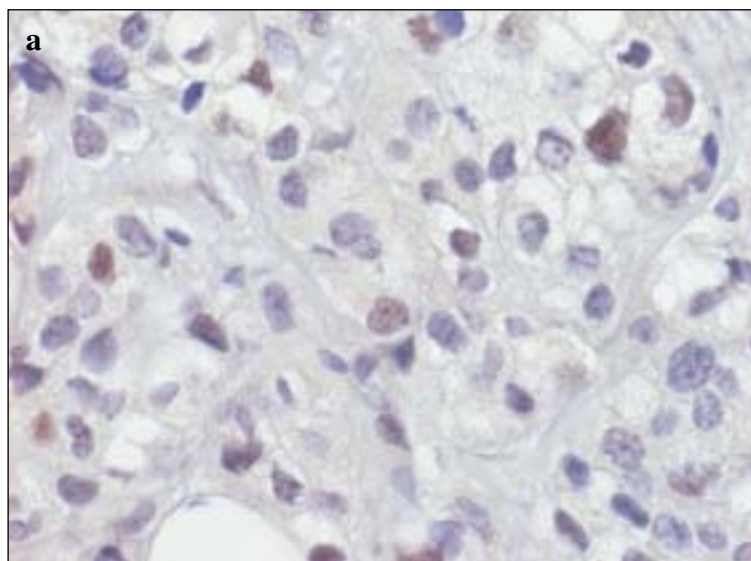
Obrázek 3: Vzájemný vztah fosforylací na serinu 15 a serinu 392. Exprese mutované formy proteinu p53 (m) a wild-type formy proteinu p53 (w). V růžovém poli jsou případy s vysokou fosforylací serinu 15 i serinu 392. V zeleném poli jsou případy s nízkou fosforylací serinu 392 a vyšší fosforylací serinu 15. V modrém poli jsou případy s nízkou fosforylací serinu 392 i serinu 15.



Obrázek 4: Imunoprofil nádoru s mutací v TP53 a stabilizací proteinu. Pozitivita (a) celkového proteinu p53 detekovaná DO-1, (b) fosforylovaného proteinu p53 na serinu 392 detekovaná FPS392 a (c) fosforylovaného proteinu p53 na serinu 15 detekovaná Phospho-53(ser15).



Obrázek 5 : Imunoprofil nádoru s wild-type TP53. Celková hladina proteinu (a) je nízká, ale dobře detekovatelná senzitivní metodou a protilátkou DO-1, (b) část proteinu p53 je fosforylována na serinu 392 (detekovaná FPS392) a (c) fosforylace proteinu p53 na serinu 15 není detekovatelná Phospho-53(ser15) protilátkou.



Vyšší hladiny proteinu p53 byly obecně zjištěny u nádorů s mutací p53, i když u části mutantů byla nalezena nízká resp. nedetekovatelná hladina p53. Nádory s funkčním („wild-type“) p53 měly vždy detekovatelnou, v průměru však nižší hladinu celkového p53. Fosforylace proteinu p53 na serinu 392 převážně odpovídá hladině celkového proteinu p53 (obrázek 1). Pouze v 11 případech nebyla hladina serinu 392 detekována imunohistochemicky. Jednalo se převážně o případy, u nichž byl metodou FASAY určen status p53 jako wild-type. V šesti z těchto 11 případů však byla detekovatelná hladina fosforylace p53 na Ser15 (obrázek 2). Hladina p53 fosforylovaného na serinu 15 leží u většiny nádorů s wild-type p53 pod úrovní senzitivity detekce, naopak mutanty p53 s vyšší celkovou hladinou vykazují zpravidla vyšší index pozitivitu (obrázek 3). Typický imunohistologický profil nádoru s mutací p53 (obrázek 4a, b, c) vykazuje vysokou celkovou hladinu proteinu p53 fosforylovaného na serinu 392 a serinu 15. Naopak nádory s wild-type p53 vykazují nízkou hladinu p53 s odpovídající fosforylací na serinu 392 a nedetekovatelnou fosforylací na serinu 15 (obrázek 5a, b, c).

Diskuse

Je všeobecně známo, že ztráta funkcí proteinu p53 vede k poruchám procesů vývoje a diferenciace, apoptózy a proliferace (23, 24). Je akceptována rovněž myšlenka, že určité mutanty mohou vykazovat kromě ztráty antionkogenní funkce i nové onkogenní vlastnosti, které ještě více zvyšují maligní potenciál buňky (25). Přestože většina mutantů p53 vyskytujících se v nádorech je obecně defektní ve vazbě na promotory nesoucí specifická vazebná místa pro nemutovaný p53, jsou některé z nich naopak schopny vazby na nespecifické sekvenční DNA (3, 26). Onkogenní („gain of function“) fenotyp mutovaného p53 je závislý na zachování transaktivační domény, sekvenčně nespecifické DNA vazebné domény a schopnosti mutované formy p53 oligomerizovat. Přes všechny výše uváděné skutečnosti je málo informací o úloze fosforylací mutované formy p53, které by analogicky jako u wild-type p53 mohly ovlivňovat stabilizaci mutovaného proteinu p53 a/nebo jeho transaktivační aktivitu.

Vhodnost proteinu p53 jako prognostického indikátoru pro různé typy nádorů byla rovněž diskutována v mnoha pracích již od doby, kdy bylo prokázáno, že nádory s aberantní expresí mutované formy proteinu p53 se chovají mnohem agresivněji než nádory s wild-type p53. Přes všechny snahy zaměřené na objasnění daného chování nádorů je mechanismus, kterým alterace p53 mohou ovlivňovat průběh onemocnění stále nejasný (27).

Tyto neúplné poznatky nás vedly ke spekulaci, že mutované formy p53 mohou být s různou intenzitou fosforylovány na N-konci nebo C-konci, i případně v závislosti na typu mutace, a mohou být spojeny s agresivitou onemocnění.

V naší studii jsme provedli imunohistochemickou analýzu exprese proteinu p53 a jeho forem fosforylovaných na serinu 392 a serinu 15 *in vivo* podmínkách na souboru 35 lidských nádorů.

rů se známým statutem genu p53 stanoveným metodou FASAY. Analýza fosforylované formy p53 na serinech 15 a 392 byla vybrána proto, že jedním z mechanismů podílejících se na regulaci funkce proteinu p53 *in vivo* jsou právě jeho posttranslační modifikace typu fosforylace (28, 29). Prokázali jsme, že protein p53 stabilizovaný v důsledku mutace je téměř vždy výrazně fosforylován na serinu 392 a na serinu 15. U nádorů s wild-type p53 je i v případech s poněkud vyšší celkovou hladinou proteinu p53 fosforylace na serinu 15 často nepřítomná. Pokud se týká vzájemné korelace fosforylací serinu 392 a serinu 15, byla zachycena skupina nádorů vykazující výraznou fosforylací na serinu 15 při nízké fosforylací serinu 392. Výsledky potvrzují, že velmi vysoká hladina proteinu p53 souvisí s přítomností mutace v genu p53. Totéž platí pro fosforylované formy proteinu p53, kdy jejich imunohistochemická detekce může být pro stanovení statusu p53 (wild-type versus mutant) přínosná. Z našich výsledků rovněž vyplývá, že modifikace proteinu p53 na serinech 15 a 392 není závislá na typu nádoru, ale na statusu p53.

Některé studie ukázaly, že aktivace p38 MAPK vede k fosforylaci proteinu p53 na serinu 15 a následnému navození apoptózy. Přímá souvislost mezi fosforylací serinu 392 a apoptózou zatím nebyla přesvědčivě prokázána (29, 30). Existuje však celá řada prací, které jednoznačně ukázaly, že za fyziologických podmínek je úroveň hladiny p53 v buňce důležitá pro rozhodování mezi apoptózou a zástavou buněčného dělení, kdy exprese nízké hladiny wild-type p53 má za následek

zástavu buněčného dělení, zatímco vysoká hladina tohoto proteinu vede k navození apoptózy (31, 32). Posttranslační modifikace v oblasti Ser15, Thr18 a Ser20 jsou zodpovědné jednak za snížení vazby proteinu p53 s MDM2 a jednak za zvýšení vazby proteinů transkripčního aparátu (p300 a CBP). Důsledkem fosforylací v tomto místě je tedy jak zvýšení hladiny, tak zvýšení transaktivací schopnosti p53 (33). Nejnovější poznatky také ukázaly, že fosforylace proteinu p53 na serinu 15 koreluje lépe s apoptózou než se stabilizací proteinu p53 a bude tedy nutné v následných pracích věnovat pozornost analýze fosforylace proteinu p53 na serinu 15 (nezávisle na statusu p53) ve vztahu k apoptotickému indexu na jednotlivých nádorech. Pro danou analýzu je zajímavá naše skupina nádorů vykazující výraznou fosforylací na serinu 15 při nízké fosforylací serinu 392 ať v nemutovaném nebo mutované formě. V rámci naší analýzy vzorků jsme však našli rovněž ojedinělé atypické případy (nedetekovatelná hladina p53 při mutaci genu p53). Podrobná analýza takových případů spolu s analýzou vztahu fosforylace proteinu p53 na serinu 15 a apoptotického indexu, které jsou v současné době prováděny, mohou být přínosem z hlediska studia funkční inaktivace proteinu p53 i pro podrobnější studium mechanismu rozhodování mezi zástavou proliferace a apoptózou zprostředkovanými p53.

Poděkování: Práce byla podporována grantovým projektem IGA MZ ČR číslo 7131-3.

Literatura

- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C. C.: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015):49-53.
- Vogelstein B. and Kinzler K. W.: p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70(4):523-6.
- Ko L. J. and Prives C.: p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10(9):1054-72.
- Sionov R. V. and Haupt Y.: The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18(45):6145-57.
- Lees-Miller S. P., Sakaguchi K., Ullrich S. J., Appella E. and Anderson C. W.: Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 1992; 12(11):5041-9.
- Banin S., Moyal L., Shieh S., Taya Y., Anderson C. W., Chessa L., Smorodinsky N. I., Prives C., Reiss Y., Shiloh Y. and Ziv Y.: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281(5383):1674-7.
- Tibbetts R. S., Brumbaugh K. M., Williams J. M., Sarkaria J. N., Cliby B. A., Shieh S. Y., Taya Y., Prives C. and Abraham R. T.: A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 1999; 13(2):152-7.
- Persons D. L., Yazlovitskaya E. M. and Pelling J. C.: Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem* 2000; 275(46):35778-85.
- She Q. B., Bode A. M., Ma W. Y., Chen N. Y. and Dong Z.: Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res* 2001; 61(4):1604-10.
- Kapoor M., Hamm R., Yan W., Taya Y. and Lozano G.: Cooperative phosphorylation at multiple sites is required to activate p53 in response to UV radiation. *Oncogene* 2000; 19(3):358-64.
- Shieh S. Y., Ikeda M., Taya Y. and Prives C.: DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91(3):325-34.
- Kapoor M. and Lozano G.: Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(6):2834-7.
- Sakaguchi K., Sakamoto H., Lewis M. S., Anderson C. W., Erickson J. W., Appella E. and Xie D.: Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* 1997; 36(33):10117-24.
- Hollstein M., Rice K., Greenblatt M. S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B., Montesano R. and Harris C. C.: Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(17):3551-5.
- Cho Y., Gorina S., Jeffrey P. D. and Pavletich N. P.: Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265(5170):346-55.
- Berns E. M., van Staveren I. L., Look M. P., Smid M., Klijn J. G. and Foekens J. A.: Mutations in residues of TP53 that directly contact DNA predict poor outcome in human primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(7):1130-6.
- Powell B., Soong R., Iacopetta B., Seshadri R. and Smith D. R.: Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):443-51.
- Vojtesek B., Bartek J., Midgley C. A. and Lane D. P.: An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 1992; 151(1-2):237-44.
- Blaydes J. P., Craig A. L., Wallace M., Ball H. M., Traynor N. J., Gibbs N. K. and Hupp T. R.: Synergistic activation of p53-dependent transcription by two cooperating damage recognition pathways. *Oncogene* 2000; 19(34):3829-39.
- Flaman J. M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sappino A. P., Limacher I. M., Bron L., Benhattar J. and et al.: A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(9):3963-7.
- Smardova J., Nemajero A., Trbusek M., Vagunda V. and Kovarik J.: Rare somatic p53 mutation identified in breast cancer: a case report. *Tumour Biol* 2001; 22(2):59-66.
- Ishioka C., Frebourg T., Yan Y. X., Vidal M., Friend S. H., Schmidt S. and Iggo R.: Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet* 1993; 5(2):124-9.
- Gottlieb E., Haffner R., von Ruden T., Wagner E. F. and Oren M.: Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *Embo J* 1994; 13(6):1368-74.
- Aloni-Greinster R., Schwartz D. and Rotter V.: Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma-irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa light chain gene expression. *Embo J* 1995; 14(7):1392-401.
- Sigal A. and Rotter V.: Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60(24):6788-93.
- Koga H. and Deppert W.: Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245→Ser) in vivo. *Oncogene* 2000; 19(36):4178-83.
- Furihata M., Yamasaki I., Ohtsuki Y., Sonobe H., Morioka M., Yamamoto A., Terao N., Kuwahara M. and Fujisaki N.: p53 and human papillomavirus DNA in renal pelvic and ureteral carcinoma including dysplastic lesions. *Int J Cancer* 1995; 64(5):298-303.
- Hupp T. R., Sparks A. and Lane D. P.: Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 1995; 83(2):237-45.
- Unger T., Sionov R. V., Moallem E., Yee C. L., Howley P. M., Oren M. and Haupt Y.: Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. *Oncogene* 1999; 18(21):3205-12.
- Lee Y. J., Kuo H. C., Chu C. Y., Wang C. J., Lin W. C. and Tseng T. H.: Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(12):2281-9.
- Chen X., Ko L. J., Jayaraman L. and Prives C.: p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1996; 10(19):2438-51.
- Adachi J., Ookawa K., Shiseki M., Okazaki T., Tsuchida S., Morishita K. and Yokota J.: Induction of apoptosis but not G1 arrest by expression of the wild-type p53 gene in small cell lung carcinoma. *Cell Growth Differ* 1996; 7(7):879-86.
- Grossman S. R.: p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* 2001; 268(10):2773-8.