

FASAY: NOVÉ MOŽNOSTI

FASAY: RECENT ACHIEVEMENTS

J. ŠMARDOVÁ

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Metoda FASAY je jednoduchý test pro stanovení důsledku mutací na funkci p53. FASAY byla využita při analýze mutací p53 v buněčných liniích, v somatických buňkách nádorů i v krevních buňkách při vyhledávání mutací zárodečných. Tato metoda našla rovněž své uplatnění při studiu afinity mutovaných proteinů p53 k promotorům jednotlivých cílových genů.

Klíčová slova: p53, mutace, FASAY, transaktivace

Abstract: The aim of the FASAY is to determine the effects of p53 mutations on the function and activity of the p53 protein. The method was successfully used for mutation analysis of p53 in various cell lines, somatic tumor cells and in blood cells for analysis of germ-line mutations. In addition, the method was also found effective in tests measuring affinity of mutant p53 proteins to promoters of target genes.

Key words: p53, mutation, FASAY, transactivation

Úvod

Molekula nádorového supresoru p53 patří k „evergreenům“ molekulární onkologie. Tento protein, poprvé detekovaný v roce 1979 (1,2), vyhlášený molekulou roku 1993, je už po několika let intenzivně studován celou řadou světových laboratoří. Zájem o p53 má nejméně dvě příčiny: tou první je fakt, že více než 50% liských nádorů má mutaci v genu pro p53 (3,4,5); druhým důvodem je skutečnost, že p53 hraje významnou roli v regulaci tak základních procesů buňky jako jsou buněčný cyklus, apoptóza a genomová stabilita (6,7).

V roce 1997 jsme v tomto časopise publikovali krátký přehledný článek (8), který měl čtenáře seznámit s poměrně novou metodou nazývanou FASAY, vytvořenou pro vyhledávání mutací v genu pro p53 v klinickém materiálu. Tímto přehledem chceme na předchozí článek navázat, shrnout výsledky, kterých bylo pomocí metody FASAY dosaženo při studiu klinického materiálu, a ukázat, jak se metoda, určená původně především pro onkologickou praxi a aplikovaný výzkum, stala skvělým nástrojem základního výzkumu a přinesla originální poznatky o proteinu p53.

FASAY

FASAY („functional analysis of separated alleles in yeast“) je funkční test pro analýzu genu pro p53. Tímto testem se měří transkripčně aktivační schopnosti proteinu p53, který je exprimován v kvasinkách z genu, jehož centrální část (kodóny 67 až 374) byla získána z vyšetřovaného materiálu (nádorová tkáň, krevní buňky,...) technikou RT-PCR. Vzniklý protein p53 potom aktivuje (nebo neaktivuje) transkripci reportérského genu, kterým je buď ADE2 nebo HIS3. Ve verzi využívající ADE2 mají kolonie kvasinek vyrostlé na selekčním médiu bez adeninu buď bílé (obsahují-li funkční p53) nebo červené zbarvení (mají-li nefunkční p53) (9). Při využití HIS3 se porovnává počet kolonií kvasinek vyrostlých na plotnách s histidinem nebo bez histidinu (10).

Klinické studie využívající FASAY

Metoda FASAY má několik výhod: je schopná zachytit mutaci p53 i v nádorové tkáni kontaminované značným množstvím

zdravé tkáně, měří odděleně obě alely genu, je schopná stanovit *ts* mutanty („temperature sensitive“ - mutanty citlivé na zvýšení inkubační teploty) (9). To vše ji předurčuje k tomu, aby byla použita k měření somatických mutací genu pro p53 v nádorech, zárodečných mutací ve vzorcích krve a také mutací v modelových buněčných liniích. Pro všechny tyto případy byla FASAY skutečně použita, často v kombinaci s dalšími metodami. Uvádíme zde přehled těchto prací; zvláště se zaměříme na srovnání s jinými technikami a všechna vylepšení vlastní metody nebo její interpretace.

1. Buněčné linie

Buněčné linie byly použity jako zdroj p53 už v jedné z původních prací (9), a to k ověření spolehlivosti metody. Výsledky měření 11 buněčných linií přesně odpovídaly již dříve známým údajům o přítomnosti mutace v genu pro p53. U dalších dvou linií autoři zjistili částečnou aktivitu p53 (růžové zbarvení kolonií kvasinek vyrostlých na plotnách bez adeninu) a následně prokázali přítomnost *ts* mutace v genu pro p53. Zajímavé výsledky poskytlo také měření buněčné linie LN428, která měla na každé alele jinou mutaci: v jedné alele byla mutace 173M, ve druhé 282W (9). Na plotnách bez adeninu vyrostly nejenom červené kolonie (obsahující nefunkční p53), ale také 15% bílých kolonií. Následnou analýzou bylo prokázáno, že v kvasinkách došlo k intragenové rekombinaci. Další práce využívající FASAY sledovala 3 různé buněčné linie odvozené z kolorektálního karcinomu: SNU-C1, SNU-C4 a SNU-C5 (11). Zatímco SNU-C1 a SNU-C4 měly obě alely genu pro p53 funkční, linie SNU-C5 měla obě alely mutantní. Jedna alela nesla mutaci 248trp a druhá 218leu. Celkově se buňky této linie chovaly odpovídajícím způsobem: nebyly schopny reagovat na poškození DNA indukci p53, *waf-1* a *mdm-2*, či zastavením buněčného cyklu v G1/S fázi. Zajímavý byl ale výsledek FASAY: ten ukázal, že klony s mutací 218leu mají schopnost transaktivovat promotor specifický pro p53. Autoři interpretovali tento výsledek tak, že buď má alela 248trp silnou dominantně negativní aktivitu nebo má alela 218leu zatím neznámou abnormální funkci.

V jiné práci byla FASAY použita ke stanovení stavu genu pro p53 u dvaceti nově ustavených lidských buněčných linií (12).

U 11 linií byly obě alely mutované, u 8 funkční. Jedna linie byla heterozygotní a měla jednu alelu funkční a druhou mutovanou. Následné sekvenování genu p53 tento heterozygotní stav potvrdilo.

FASAY se stala součástí také další rozsáhlé studie, v níž bylo 58 lidských buněčných linií podrobeno pečlivému zkoumání stavu genu pro p53 (13). V této práci byl protein p53 studován nejen metodou FASAY, ale také western blottingem, byla sekvenována cDNA p53 a navíc byly použity další testy funkčnosti: schopnost indukovat zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a exprese *cip1/waf1*, GADD45 a *mdm2* δ -zářením. Z 54 buněčných linií, které byly testovány metodou FASAY, mělo 36 linií nefunkční alely p53. Ve všech byla sekvenováním zjištěna mutace. 17 linií mělo funkční alely, z toho u 15 nebyla mutace sekvenováním odhalena, ve dvou případech ano. Jedna linie - ve shodě s výsledky sekvenování - měla jednu alelu funkční a druhou nefunkční. Celkově úspěšnost metody FASAY v odhalování mutací p53 dosáhla 96% (porovnáno se sekvenováním), což bylo ze všech použitých metod nejvíce. FASAY byla použita také v několika studiích, které hledaly souvislost mezi stavem genu pro p53 a rezistencí či citlivostí buněčné linie či sublinie k chemoterapeutikům (14, 15) a TNF- α (16). Ke sledování stavu genu pro p53 byly využity vedle metody FASAY také sekvenování genu p53 (14, 16), SSCP (16) a imunocytochemické metody (15).

2. Nádory

Opět již v jedné z původních prací o metodě FASAY se objevují první výsledky vyhledávání mutací v genu pro p53 v nádorové tkáni (9). Autoři tato měření prováděli u 10 nádorů hlavy a krku a zjistili, že dva nádory obsahovaly pouze funkční alely p53 a v osmi nádorech zachytili mutaci. Ve dvou případech přítomnost mutace dodatečně ověřili sekvenováním. Na tyto prvotní výsledky navázala další rozsáhlá studie, v níž autoři stanovovali metodou FASAY stav genu pro p53 u celkem 53 pacientů s nádory hlavy a krku (nádory horních cest dýchacích a horní části trávicího traktu) (17). Smyslem této studie bylo zjistit, zda existuje souvislost mezi mutací v genu pro p53 a pravděpodobností výskytu násobných primárních nádorů. Autoři měřili p53 přímo v nádorech všech pacientů a také vždy alespoň ve třech nezávislých biopsiích histologicky normální okolní tkáně. Porovnáním výsledků získaných u pacientů s jediným nádorem a pacientů s více nádory došli k závěru, že mutace v genu pro p53 v histologicky normální tkáni zvyšuje významně pravděpodobnost vzniku násobných primárních nádorů. Autoři v této práci použili metodu FASAY ve zdokonalené formě - tzv. „split assay“. Tato varianta metody měří odděleně dvě části genu pro p53 a umožňuje tak odlišit klonální (tedy reálné) a neklonální (vzniklé sekundárně během provádění vlastní metody) mutace tohoto genu.

Autoři dalších dvou prací (18, 19) analyzovali gen pro p53 v 54 maligních astrocytomech, nejčastějších nádorech centrálního nervového systému u dospělých. Mutace byla zjištěna u 26 nádorů. Ve třech případech počet červených kolonií dosahoval 10 až 20%, a proto u nich byla provedena analýza technikou „split assay“. Ve všech třech případech byla potvrzena přítomnost klonální mutace. Ve 26 případech, u nichž byla nalezena mutace, bylo provedeno klonování genu pro p53. Ve všech případech byla mutace potvrzena, ve dvou případech byla na každé alele odlišná mutace (heterozygotní dvojnásobní mutanti). Celkem byly mutace nalezeny u 48% případů, což je mnohem více než dříve uváděných 29%. Autoři tento výsledek připisují především citlivosti metody FASAY.

Metoda FASAY byla využita k analýze mutací v genu pro p53 u epitelálních dysplasií a karcinomů dutiny ústní japonských pacientů a pacientů ze Srí Lanky (20). Celkem bylo vyšetřeno 33 japonských pacientů s primárním nádorem, 14 pacientů s dysplasií a 6 pacientů s hyperplasií. Mutace v genu pro p53 byla nalezena ve 26 primárních nádorech (79%) a 5 dysplasiích (36%), u hyperplasií mutace nalezena nebyla. Primární

nádory pacientů ze Srí Lanky byly analyzovány metodou FASAY a dále metodou SSCP. Zatímco FASAY zachytila 9 pozitivních nádorů (53%), SSCP pouze 6 (35%). Mutace byly potvrzeny sekvenováním. Autoři dále v této práci podrobně měřili citlivost metody FASAY a přesnost interpretace jejích výsledků. Zjistili, že touto metodou lze zachytit přítomnost nejméně 6% DNA s mutací v genu pro p53. Srovnáním výsledků FASAY a sekvenování zjistili, že klonální mutace byly potvrzeny u těch případů, které metodou FASAY vykazovaly alespoň 17% červených kolonií. V případech, kdy počet červených kolonií byl nižší než 13%, klonální mutace potvrzeny nebyly. Autoři proto navrhuji, aby počet červených kolonií nad 20% byl považován za bezpečnou klinickou hranici stanovení mutace v genu pro p53 bez sekvenční analýzy.

3. Zárodečné mutace

Metoda FASAY byla původně vyvinuta především pro vyhledávání zárodečných mutací p53, tedy pro stanovování heterozygotního stavu p53. Proto také byla k tomuto účelu hned v první práci použita (10). Byly vyšetřeny lymfocyty 6 pacientů s Li-Fraumeniho syndromem, kde riziko výskytu zárodečné mutace p53 dosahuje 50 až 70% (21, 22, 23, 24). U tří pacientů byla metodou FASAY nalezena mutace v jedné alele genu pro p53, druhá alela byla funkční. Následné sekvenování tento výsledek potvrdilo. Také při zavedení další verze metody FASAY (9) byla sekvenováním ověřena její schopnost zachytit heterozygotní stav genu pro p53 u jednoho pacienta.

V další práci se metodou FASAY podařilo vyřešit několik let starý neobjasněný případ. Jednalo se o případ pacientky, která odpovídala kritériím Li-Fraumeniho syndromu, s manifestním nádorem prsu. V nádoru i ve zdravé tkáni pacientky (a také její stejně postižené matky) byla naměřena zvýšená hladina proteinu p53. Ani sekvenováním genu p53, ani specifickou imunoprecipitací, nebyla prokázána mutace v genu pro p53 (25). O několik let později se autoři k tomuto nedořešenému případu vrátili a ke stanovení p53 použili FASAY a také další funkční metodu - test schopnosti vyvolat apoptózu jako následek γ -záření (26). Výsledky FASAY byly překvapivé. Jedna alela genu p53 byla jednoznačně funkční, ale kolonie kvasinek, které obsahovaly druhou alelu, byly různé - barvou ani velikostí neodpovídaly ani funkčnímu ani nefunkčnímu p53. Přítomnost ts mutace, která dává také různě zbarvení kolonií (9), byla vyloučena. Podobně výsledek testu na apoptózu poskytoval hodnoty, které byly mezi hodnotami jednoznačně funkčního a jednoznačně nefunkčního p53. Až sekvenování genu p53 odhalilo neobvyklou mutaci kodónu 337 v oligomerizační doméně. Tato mutace byla dále studována a bylo potvrzeno, že skutečně způsobuje nedostatečnou oligomerizaci. Protein p53 mající tuto neobvyklou mutaci v kodónu 337 tvoří funkční tetramery s méně než 50% účinností (27, 28).

Další studií (29), která se pokusila využít metodu FASAY, byla práce podrobně charakterizující zárodečnou mutaci p53 u rodiny, která nesplňovala přesná kritéria Li-Fraumeniho syndromu, ale měla tzv. Li-Fraumeniho-like syndrom. Mutace, která se u postižených členů rodiny vyskytovala, byla velmi neobvyklá: mutovaný byl nukleotid na třetí pozici kodónu 125, což je tichá záměna neměnicí smysl kodónu. Proto chtěli autoři jednoznačně prokázat souvislost mezi touto mutací a predispozicí ke vzniku nádorů u jejích nositelů. Autoři prokázali, že popsaná mutace v kodónu 125 je sice tichá na úrovni aminokyselin, ale postihuje donorové místo pro sestřih a způsobuje tak vznik neobvyklých transkriptů. Autoři použili několik funkčních metod ke zjištění, zda aberantní transkripce vede k tvorbě nefunkčních proteinů p53, mezi nimi také FASAY. V tomto případě však FASAY (podobně jako např. apoptotický test, míra radiorezistence,...) selhala, metoda zachytila pouze funkční p53. Aberantní transkripty - ač teoreticky metodou zachytitelné - se nepodařilo naklonovat. Tento výsledek se zatím nepodařilo vysvětlit.

FASAY ve službách základního výzkumu

Po dlouhou dobu se předpokládalo, že schopnost proteinu p53 indukovat zastavení buněčného cyklu a schopnost indukovat apoptózu jsou neoddelitelné. Postupně se ale objevilo několik studií, které tento názor změnily. Např. se podařilo nalézt mutantní varianty proteinu p53 neschopné indukovat zastavení buněčného cyklu, ale zcela kompetentní indukovat apoptózu alespoň v některých buněčných typech (30). Na druhé straně bylo zjištěno, že p53 nesoucí mutaci v kodónu 175 vede ke ztrátě apoptotické funkce při zachování schopnosti vyvolat zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (31). Podobné mutace v kodónu 143 zachovávají proteinu p53 schopnost indukovat zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (32). Také byly studovány mutace v genu p53 buněčných linií odvozených z lymfoblastů pacientů s Li-Fraumeniho syndromem, tedy heterozygotní mutace p53. Buněčná linie s mutací jedné alely p53 v kodónu 282 měla zcela normální blok ve fázi G1 buněčného cyklu, ale výrazně sníženou indukcí apoptózy, zatímco heterozygotní mutace v kodónu 286 měla vedle snížené apoptózy také sníženou schopnost zastavit buněčné dělení v G1 fázi (33). Ze všech výše uvedených studií plyne: 1. indukce apoptózy a indukce bloku buněčného cyklu v G1 fázi jsou separovatelné funkce p53; 2. různé mutace p53 různě ovlivňují tyto funkce; 3. inaktivace pouze apoptotické funkce p53 může sama o sobě přispívat ke zvýšené dispozici ke vzniku nádorů.

Funkční p53 má schopnost regulovat jak apoptózu, tak zastavení buněčného cyklu. Obě funkce vykonává - alespoň do jisté míry - mechanismem transaktivace svých cílových genů: v případě zastavení buněčného cyklu jednoznačně regulací exprese genu *p21/waf1* (34), v případě apoptózy např. regulací exprese genu *bax* (35). Z výše uvedených analýz mutantních p53 vyplynulo, že obě tyto dráhy představují odlišné funkce p53. Jedním z možných mechanismů tohoto oddělení funkcí by byla různá míra afinity p53 k regulačním oblastem v promotorech genů *p21* a *bax*. Ověření této možnosti bylo předmětem několika studií, z nichž některé využily metodu FASAY.

V první studii řešící tuto problematiku (36) využili její autoři „klasické“ metody: schopnost p53 vázat DNA sledovali metodou EMSA („electrophoretic mobility shift assay“), transaktivní schopnosti testy β -galaktosidázové a luciferázové aktivity. Studium schopnosti tří různých mutantů p53 (173L, 175P, 181L) transaktivovat tři různé promotory - promotor genu *p21*, genu *bax* a genu IGF-BP3 - boxB - zjistili, že mutant 175P a 181L aktivují expresi genu *p21* a mají tedy schopnost indukovat zastavení buněčného cyklu ve fázi G1, ale zároveň netransaktivují *bax* a IGF-BP3 a mají proto výrazně sníženou schopnost indukovat apoptózu.

Pro řešení stejné otázky byla později upravena metoda FASAY. Původní metoda vycházela z obecně přijímaného názoru, že testování schopnosti p53 vázat se do regulační sekvence RGC je spolehlivým měřítkem transaktivace způsobilosti p53 (9,10). V nové verzi upravili autoři metodu tak, že před reportérský gen ADE2 předřadili regulační sekvenci, která se nachází v promotoru genu *p21*, a regulační sekvenci

z promotoru genu *bax*. To jim umožňovalo měřit zvlášť schopnost p53 transaktivovat gen *p21* a gen *bax* (37). Touto metodou potom analyzovali 51 mutací p53. Většina mutantů (celkem 42) nebyla schopna transaktivovat ani jeden reportér. Devět mutantů bylo schopno transaktivovat promotor *p21*, ale ne promotor *bax*.

Další studie měla podobnou strategii, ale šla ještě dále (38). Její autoři testovali 19 různých mutantů p53 klasifikovaných jako transkripčně neaktivní v testu, který využíval regulační sekvenci RGC. Před reportérský gen - v tomto případě *HIS3* - předřadili postupně regulační sekvence genů: *p21*, *mdm2*, *GADD45*, *Cyclin G*, *bax*, *IGF-BP3* - boxA, *IGF-BP3* - boxB, *RGC* a *SCS* (uměle odvozené vazebné místo s vysokou afinitou pro p53). FASAY byla navíc prováděna ve třech různých teplotách: 37 °C, což je fyziologická teplota lidských buněk, 30 °C, což je optimální teplota pro růst kvasinek a 24 °C. Ze všech testovaných mutantů jen šest bylo zcela nefunkčních se všemi reportéry při všech teplotách. Další mutantů byli rozděleni na skupiny podle selektivity a podle závislosti na teplotě.

Obvyklý biologický efekt mutace p53 je inaktivace tohoto proteinu jako transkripčního faktoru. Výše uvedené práce ukázaly, že mezi mutanty p53 mohou být podstatné rozdíly. Jejich přesnější klasifikace může mít významné klinické důsledky. Např. nádory obsahující p53 schopné aktivovat indukcí *p21* mohou reagovat na terapii jinak než nádory se zcela nefunkčním p53 (39). Modifikovaná verze FASAY (37) se nabízí jako jeden z možných testů schopných tohoto rozlišení.

ZÁVĚR

Tímto krátkým přehledem se snad podařilo ukázat, že metoda FASAY zcela splnila očekávání, které do ní její autoři vložili, a našla uplatnění v onkologickém výzkumu, a to jak při testování mutací p53 v nádorech, tak při testování zárodečných mutací p53. V některých případech bylo technikou FASAY dosaženo slibných až skvělých výsledků (např. 13, 17, 25), spíše výjimečně selhala (29). FASAY byla navíc vtipně využita i ve studiích, které přinesly zcela nové poznatky o p53, které se dříve či později odrazí v klinickém onkologickém výzkumu i v onkologické praxi. Dá se očekávat, že FASAY bude jejich důležitým nástrojem.

Pro úplnost je třeba uvést, že tento krátký přehled neuvádí všechny práce, které metodu FASAY využily, většina neuvedených je ale citována v předešlém přehledu publikovaném v tomto časopise (8). Naopak chceme na závěr zdůraznit, že metoda FASAY není využitelná pouze pro stanovení p53, ale s příslušnými úpravami ji lze využít i ke stanovení dalších genů pro faktory s transaktivními vlastnostmi. Tak byla FASAY využita např. pro testování mutací, které eliminují funkci NF1GRD („GTPase-activating protein related domain of the human neurofibromatosis type 1 protein“) (40) nebo pro lidský estrogenový receptor (41).

Práce byla sponzorována grantem IGA MZ ČR č. M/16-3

Literatura

1. Lane D. P. and Crawford L. V.: T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979, 278: 261-263
2. Linzer D. I. and Levine A. J.: Characterization of a 54Kdalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979, 17: 43-52
3. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C. C.: p53 Mutations in Human Cancers. *Science* 1991, 253: 49-53
4. Lane D. P.: p53 and human cancers. *Brit. Med. Bull.* 1994, 50: 582-599
5. Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M. and Harris C. C.: Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Res.* 1994, 54: 4855-4878
6. Cox L. S. and Lane D. P.: Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates to DNA damage. *BioEssays* 1995, 17: 501-508
7. Levine A. J.: p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 1997, 88: 323-331
8. Šmardová J.: FASAY: funkční analýza p53. *Klin. Onkol.* 1997, 10: 131-134
9. Flaman J.-M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sappino A.-P., Limacher J.-M., Bron L., Benhattar J., Tada M., Van Meier E. G., Estreicher A. and Iggo R. D.: A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 3963-3967
10. 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. *Nature Genet.* 1993, 5: 124-129
11. Rand A., Glen K. S., Alvares C. P., White M. B., Thibodeau S. M. and Karnes W. E. Jr.: p53 functional loss in a colon cancer cell line with two missense mutations (2181eu and 248trp) on separate alleles. *Cancer Lett.* 1996, 98: 183-191
12. Mihara K., Miyazaki M., Kondo T., Fushimi K., Tsuji T., Inoue Y., Fukaya K., Ishioka C. and Namba M.: Yeast Functional Assay of the p53 Gene Status in Human Cell Lines Maintained in Our Laboratory. *Acta Med. Okayama* 1997, 51: 261-265

13. O'Connor P. M., Jackman J., Bae I., Myers T. G., Fan S., Mutoh M., Scudiero D. A., Monks A., Sausville E. A., Weinstein J. N., Friend S. and Fornace A. J. Jr.: Characterization of the p53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlations with the Growth-Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents. *Cancer Res.* 1997, 57: 4285-4300
14. Wosikowski K., Regis J. T., Robey R. W., Alvarez M., Buters J. T. M., Gudas J. M. and Bates S. E.: Normal p53 Status and Function despite the Development of Drug Resistance in Human Breast Cancer cells. *Cell Growth Different.* 1995, 6: 1395-1403
15. Gudas J.M., Nguyen H., Li T., Sadzewicz L., Robey R., Wosikowski K. and Cowan K. H.: Drug-resistant breast cancer cells frequently retain expression of a functional wild-type p53 protein. *Cancerogenesis* 1996, 17: 1417-1427
16. Cai Z., Capoulade C., Moyret-Lalle C., Amor-Gueret M., Feunteun J., Larsen A. K., Bressac-de Paillerets B. and Chouaib S.: Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 1997, 15: 2817-2826
17. Waridel F., Estreicher A., Bron L., Flaman J.-M., Fontollet C., Monnier P., Frebourg T. and Iggo R.: Field cancerisation and polyclonal p53 mutation in the upper aero-digestive tract. *Oncogene* 1997, 14: 163-169
18. Tada M., Iggo R.D., Ishii N., Shinohe Y., Sakuma S., Estreicher A., Sawamura Y. and Abe H.: Clonality and stability of the p53 gene in human astrocytic tumor cells: Quantitative analysis of p53 gene mutations by yeast functional assay. *Int.J.Cancer* 1996, 67: 447-450
19. Tada M., Iggo R. D., Waridel F., Nozaki M., Matsumoto R., Sawamura Y., Shinohe Y. and Abe H.: Reappraisal of p53 Mutations in Human Malignant Astrocytic Neoplasms by p53 Functional Assay: Comparison With Conventional Structural Analyses. *Mol. Carcinogenesis* 1997, 18: 171-176
20. Kashiwazaki H., Tonoki H., Tada M., Chiba I., Shindoh M., Totsuka Y., Iggo R. and Moriuchi T.: High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. *Oncogene* 1997, 15: 2667-2674
21. Malkin D., Li F. P., Strong L. C., Fraumeni J. F. Jr., Nelson C. E., Kim D. H., Kassel J., Gryka M. A., Bischoff F. Z., Tainski M. A. and Friend S. H.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasias. *Science* 1990, 250: 1233-1238
22. Birch J. M., Hartley A. L., Tricker K. J., Prosser J., Condle A., Kelsey A. M., Harris M., Morris Jones P. H., Binchy A., Crowther D., Craft A. W., Eden O.B., Evans D. G. R., Thompson E., Mann J. R., Martin J., Michell E. L. P. and Santibanez - Koref M. F.: Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1988, 54: 1298-1304
23. Varley J. M., Evans D. G. R. and Birch J. M.: Li-Fraumeni syndrome - a molecular and clinical review. *Br.J.Cancer.* 1997, 76: 1-14
24. Varley J. M., McGown G., Thorncroft M., Santibanez-Koref M. F., Kelsey A. M., Tricker K. J., Evans D. G. R. and Birch J. M.: Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni Families: an extended study of 39 families. *Cancer Res.* 1997, 57: 3245-3252
25. Barnes D. M., Hanby A. M., Gilett C. E., Mohammed S., Hodgson S., Bobrow L. G., Leigh I. M., Purkis T., MacGeoch C., Spurr N. K., Bartek J., Vojtesek B., Pickles S. M., and Lane D. P.: Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet* 1992, 340: 259-263
26. Lomax M. E., Barnes D. M., Gilchrist R., Pickles S. M., Varley J. M. and Camplejohn R.S.: Two functional assays employed to detect an unusual mutation in the oligomerisation domain of p53 in a Li-Fraumeni like family. *Oncogene* 1997, 14: 1869-1874
27. Lomax M. E., Barnes D. M., Hupp T. R., Pickles S. M. and Camplejohn R. S.: Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li - Fraumeni and Li - Fraumeni like family members. *Oncogene* 1998, 17: 643-649
28. Davison T. S., Yin P., Nie E., Kay C. and Arrowsmith C. H.: Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li - Fraumeni-like syndrome. *Oncogene* 1998, 17: 651-656
29. Varley J. M., Chapman P., McGown G., Thorncroft M., White G. R. M., Greaves M. J., Scott D., Spreadborough A., Tricker K. J., Birch J. M., Evans D. G. R., Reddel R., Camplejohn R. S., Burn J. and Boyle J. M.: Genetic and functional studies of a germline TP53 splicing mutation in a Li-Fraumeni-like family. *Oncogene* 1998, 16: 3291-3298
30. Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vousden K. H. and Oren M.: Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation deficient p53. *Genes.Dev.* 1995, 9: 2170-2183
31. Rowan S., Ludwig R. L., Haupt Y., Bates S., Lu X., Oren M. and Vousden K.: Specific loss of apoptotic but not cell arrest function in a human tumour derived p53 mutant. *EMBO J.* 1996, 15: 827-838
32. Pocar M., Chevillard S., Villaudy J., Poupon M. F., Dutrillaux B. and Remvikos Y.: Different p53 mutations produce distinct effects on the ability of colon carcinoma cells to become blocked at the G1/S boundary after irradiation. *Oncogene* 1996, 12: 875-882
33. Delia D., Goi K., Mizutani S., Yamada T., Ariello A., Fontanella E., Lamorte G., Iwata S., Ishioka C., Krajewski S., Reed J. C. and Pierotti M. A.: Dissociation between cell cycle arrest and apoptosis can occur in Li-Fraumeni cells heterozygous for p53 gene mutations. *Oncogene* 1997, 14: 2137-2147
34. El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parson V. E., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. and Vogelstein B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 1993, 78: 817-825
35. Miyashita T. and Reed J.C.: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of human bax gene. *Cell* 1995, 80: 293-299
36. Ludwig R.L., Bates S and Vousden K.H.: Differential Activation of Target Cellular promoters by p53 Mutants with Impaired Apoptotic Function. *Mol.Cell.Biol.* 1996, 16: 4952-4960
37. Flaman J.-M., Robert V., Lenglet S., Moreau V., Iggo R. and Frebourg T.: Identification of human p53 mutations with differential effects on the bax and p21 promoters using functional assay in yeast. *Oncogene* 1998, 16: 1369-1372
38. Di Como C. J. and Prives C.: Human tumor-derived p53 proteins exhibit binding site selectivity and temperature sensitivity for transactivation in a yeast-based assay. *Oncogene* 1998, 16: 2527-2539
39. Waldman T., Zhang Y., Dillehay L., Yu J., Kinzler K., Vogelstein B. and Williams J.: Cell-Cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat.Med.* 1997, 3: 1034-1036
40. Ishioka C., Ballester R., Engelstein M., Vidal M., Kassel J., The I., Bernards A., Gusella J. F. and Friend S. H.: A functional assay for heterozygous mutations in the GTPase activating protein related domain of the neurofibromatosis type 1 gene. *Oncogene* 1995, 10: 841-847
41. van Dijk M. A. J., Floore A. N., Kloppenborg K. I. M. and van't Veer L. J.: A Functional Assay in Yeast for the Human estrogen receptor Displays Wild-Type and Variant Estrogen receptor Messenger RNAs Present in Breast Carcinoma. *Cancer Res.* 1997, 57: 3478-3485