

FELIPE DA COSTA SOUZA

Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16^{INK4A} replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q.

Dissertação apresentada Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dra. Eugenia Costanzi-Strauss

Versão Original

São Paulo
2011

Resumo

Costa-Souza F. Geração e caracterização de linhagens isogênicas portadoras de mutantes de p53: Modelo para avaliar a estratégia de reparação dos genes p53 e p16INK4A na presença dos mutantes p53R175H e p53R248Q. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

A proliferação celular descontrolada é uma característica comum a todos os tipos de tumores humanos. Isso ocorre, em partes, devido a destruição funcional das vias de controle do ciclo celular pRb/p16^{INK4A} e p53/p21^{WAF}. As alterações na via de p53 ocorrem em mais de 50% dos tumores humanos. Estudos sugerem que moléculas mutantes de p53 não apenas perdem suas atividades como fator de transcrição, mas também desenvolvem propriedades inteiramente distintas das observadas na molécula selvagem. Alguns mutantes conseguem modular elementos responsivos de genes diferentes daqueles modulados pela molécula selvagem, ou ainda mantêm a capacidade de associar-se com moléculas selvagens para formar heterotetrâmeros no lugar dos homotetrâmeros selvagens. Com isso, o mutante consegue exercer um efeito dominante negativo sobre as atividades de p53 selvagem. Adicionalmente, algumas mutações conferem à molécula mutada atividade oncogênica, adquirida através da regulação de genes associados a proliferação e progressão tumoral. Muitos estudos fazem associação entre mutações *hotspots*, como as que ocorrem nos códons 175 e 248, com o prognóstico negativo e baixa eficiência em estratégias de terapia gênica com mediação de p53. Nesse trabalho, visamos a geração e caracterização de linhagens isogênicas portando diferentes mutantes de p53 como modelo de estudo para remediação simultânea de p53 e p16 na presença de mutantes *hotspots* específicos. Os mutantes R175H e R248Q não geraram alterações na cinética de proliferação da linhagem H358, mas levaram a um aumento de 27,5% na eficiência de plaqueamento e, no caso de R248Q, ao dobro de eficiência na formação de colônias em suspensão. Os resultados do tratamento das linhagens isogênicas com adenovírus Adp16 e Adp53 mostraram que os mutantes não interferiram no parada do ciclo celular em G1 induzida por p16.

Palavras-Chave: Mutantes de p53. p53. Cancer. H358. Ciclo celular. Linhagens isogênicas.

Abstract

Costa-Souza F. Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q. [Masters thesis] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Abnormal cell proliferation is a common problem for all human tumors due, in part, to the functional destruction of the pRb/p16INK4A and p53/p21WAF cell cycle control pathways. Alterations in the p53 tumor suppressor gene occur in more than 50% of all human cancers. Several studies suggest that mutated p53 molecules not only lose their normal functions as a transcription factor, but also can exhibit new properties distinct from those of wildtype p53. On the one hand, some mutants can bind to the responsive element of genes different from those targeted by wild-type p53, or even form a hetero-oligomer with wide-type p53 in place of wide type tetramer, leading to the abrogation of wt p53 activity in a dominant-negative way. On the other hand, some mutations can provide the p53 protein with oncogenic properties, assigned by the up-regulation of genes that are associated with cell proliferation and tumor progression. Several studies have shown a correlation between hotspot mutations in p53, such as those occurring at codons 175 and 248, and an unfavorable profile for p53 gene therapy efficacy, therefore constituting a barrier for gene therapy based on p53 replacement. Hence, this study aims the generation and characterization of isogenic cell lines, harboring p53 mutants, as model to investigate the replacement of p53 and p16 genes on these mutant H358 cell lines. Our data identified that neither p53R175H nor p53R248Q mutants accelerated cell cycle progression. However, both leads to a 27,5% increased plate efficiency while R248Q leads to a two-fold increases in the number of colonies formed in soft agar. Our data also showed that the mutants did not affect the efficiency of p16 replacement.

Key words: Mutants of p53. p53. Cancer. H358. Cell cycle. Isogenic cell lines.

1 Introdução

Cancer constitui um grande problema de saúde pública, conseqüência do acúmulo de inúmeras alterações genéticas que lhe conferem as características de uma doença heterogênea. Hoje, com o acúmulo de informações acerca dos mecanismos envolvidos na transformação tumoral, sabe-se que o cancer é essencialmente uma doença do ciclo celular. A desorganização dos mecanismos que controlam a proliferação celular é característica comum a todos os tipos de tumores. Isso deve-se em grande parte a desregulação das vias de controle do ciclo celular pRb/p16^{INK4A} e p53/p21.

Em células normais, uma complexa rede de sinalização modula a formação e atividade dos complexos ciclina-CDK. Os complexos ativos por sua vez, são responsáveis pela seqüencial fosforilação da proteína pRb, controlando a liberação de fatores essenciais para o prosseguimento do ciclo celular e que, antes da fosforilação, eram mantidos em forma inativa. As etapas de fosforilação de Rb são, de modo metafórico, o relógio que controla a passagem pelas fases G1, S G2 e M. O descontrole desse relógio é responsável pela ciclo celular descontrolado, um passo essencial para o desenvolvimento do cancer.

Entre os eventos que levam ao descontrole desse processo, as mutações de p53 constituem a alteração genética mais freqüente em todos os tipos de tumores humanos (Soussi e Wiman, 2007). Já tendo sido chamada de "guardiã do genoma", p53 é responsável pelo controle de uma série de respostas a estresses e danos, entre eles danos ao DNA e o descontrole do ciclo celular (Lane, 1992). Diversos dados na literatura mostraram que mutantes de p53 não só perdem a função supressora de tumor, mas também podem adquirir a capacidade de inibir a atividade do p53 selvagem exercendo um efeito dominante negativo. Essa característica de alguns mutantes constitui uma barreira para terapia gênica baseada na remediação de p53 com estratégias de terapia gênica. Além disso, alguns mutantes podem também desempenhar atividades completamente diferentes daquelas realizadas pela molécula selvagem, promovendo o processo oncogênico com suas novas interações.

Devido a importância que as vias pRb/p16^{INK4A} e p53/p21 possuem no desenvolvimento do cancer, nosso laboratório trabalha com a remediação dos principais componentes dessas vias como base para estratégias de terapia gênica. Costanzi-Strauss et al. (1998) demonstraram que, dada a heterogeneidade do cancer, e as múltiplas alterações envolvidas em seu desenvolvimento, a estratégia

baseada na remediação de apenas um supressor de tumor não constitui uma abordagem ampla, capaz de abranger diferentes genótipos e fenótipos tumorais. Assim sendo, nosso laboratório vem trabalhando com a estratégia experimental da remediação de múltiplos supressores de tumor. Nossa hipótese é que a reparação simultânea dos genes p16^{INK4A} e p53, mediada por um único adenovírus Adp16IRESp53 pode repor barreiras proliferativas importantes e essenciais para inibição do crescimento tumoral. Os resultados de tratamento de células NCI-H358, derivadas de adenocarcinoma de pulmão humano (NSCLC: non small cell lung carcinoma) e de tumores de NCI-H358 em modelo xenográfico, mostraram a superioridade do efeito anti-tumoral de Adp16IRESp53 em comparação com os adenovírus Adp16 e Adp53, e mesmo em comparação com a remediação de ambos os genes por vetores distintos. Os dados obtidos até aqui com Adp16IRESp53 são animadores, mas como parte do desenvolvimento de um novo agente anti-cancer precisamos delinear os limites para indicação de Adp16IRESp53. Como meta central desta proposta experimental pretendemos avaliar se a presença de um alelo mutado de p53 interfere na resposta pró-apoptótica induzida por Adp16IRESp53.

Como já mencionado, mutações em p53 constituem um mau prognóstico para estratégias que utilizam remediação de p53. Para permitir a análise do efeito anti-tumoral de Adp16IRESp53 e possibilitar a comparação com os resultados até aqui já obtidos por nosso grupo, de modo a associar o efeito do mutante no tratamento, o presente trabalho tem como objetivo a geração e a caracterização de linhagens isogênicas portadoras dos mutantes *hotspots* p53R175H e p53R248Q, utilizando as células NCI-H358 como linhagem parental. Esperamos caracterizar o possível efeito oncogênico dos mutantes p53R175H e p53R248Q no fenótipo da linhagem NCI-H358, para com esses dados fornecer um modelo que permita a comparação do tratamento com Adp16IRESp53 com nossos dados anteriores, no mesmo background da linhagem H358, tendo apenas o efeito dos mutantes como variável.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Ciclo celular

Proliferação celular é um processo extremamente coordenado onde a progressão pelas fases do ciclo celular é regulada, de modo muito preciso, por uma rede bioquímica muito complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1, S, G2, e M. Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte. (Malumbres e Barbacid, 2009). O mau funcionamento nessas vias leva ao aparecimento e perpetuação de mutações e aberrações cromossômicas que favorecem o aparecimento de diversas patologias, entre elas o cancer (Paulovich et al., 1997; Ogino et al., 2005).

Inicialmente, essas vias respondem a fatores extracelulares que, através de uma cascata de sinalização, fornecem o estímulo para que a célula saia de G1 e se prepare para entrar em S. Desse modo, a célula permanece durante G1 em um estado quiescente, freqüentemente referido como G0, até que ocorra o estímulo mitótico extracelular que sinalize a saída de G1 (Ekholm et al., 2001). Ao fim de G1 após o momento definido como ponto de restrição, o sistema que regula a progressão do ciclo torna-se independente da sinalização extracelular, passando a ser controlado pela por mecanismos intracelulares que envolvem a seqüencial ativação de uma família de proteínas chamadas quinases dependentes de ciclinas – CDKs – (Pardee, 1974). A atividade dessas enzimas é dependente da associação com uma subunidade reguladora positiva pertencente à família das ciclinas, formando um complexo catalítico ciclina-CDK ativo (Sherr e Roberts, 1999). Os complexos ativos de ciclina e CDK por sua vez, atuam sobre uma macromolécula central do sistema de controle do ciclo celular, a proteína Rb.

Nas células que estão em G1 ou quiescentes, Rb encontra-se ativo em sua forma hipofosforilada. Nessa forma ativa Rb seqüestra os fatores de transcrição da família E2F, bloqueando sua atividade sobre os promotores de diversos genes vitais para o prosseguimento de G1 e passagem de G1/S, tais como DNA polimerase e c-myc (Dahiya et al., 2000). Reprimindo a transcrição desses genes através da inativação de E2F a proteína Rb exerce um forte efeito supressor sobre o ciclo celular. O estímulo mitótico extracelular durante G1 implica na expressão de ciclinas D que associar-se-ão às moléculas de CDK4 ou CDK6 já presentes na célula. Uma

vez formados, os complexos seqüestram e associam-se a proteína p21^{CIP1} da família Cip/Kip e a proteína p36, também denominada como PCNA - *proliferating cell nuclear antigen* -, uma proteína envolvida com os mecanismos de reparo e replicação do DNA por associar-se à DNA polimerase. Após formados, esses complexos ternários ciclina-CDK-p21-PCNA são fosforilados pela CAK - CDK-activating kinase - tornando-se ativos, quando então são capazes de iniciar a primeira onda de fosforilação da proteína Rb (Sherr e Roberts, 1999; Ekholm et al., 2001).

A fosforilação de pRb proporcionada por ciclina D-CDK4/6-p21-PCNA durante G1 reduz sua afinidade pelos fatores de transcrição E2Fs. Isso resulta na liberação de uma onda de E2Fs que, agora livres da ação inibitória de Rb, exercem seu papel de ativador da transcrição (Harbour et al., 1999). Além de genes que regulam e participam da replicação do DNA, as proteínas E2Fs também induzem a transcrição dos genes das ciclinas A e E. A ciclina E se associa com CDK2 e colabora com os complexos ciclina D-CDK4/6 para fosforilar pRb durante a transição de G1/S. A auto-suficiência do complexo ciclina E-CDK2 em manter a fosforilação de Rb e a independência da atividade de ciclina D-CDK4/6 no processo caracteriza a passagem pelo ponto de restrição, uma vez que a expressão de ciclina E é regulada positivamente pela presença de E2Fs e não depende da sinalização extracelular como ocorre com ciclina D (Conradie et al., 2010). Posteriormente, a ciclina E é degradada e substituída pelas ciclinas A e B, que formarão complexo com CDK2 e CDK1 e serão responsáveis por manter a fosforilação de Rb durante S, G2 e G2/M (Fang e Newport, 1991) (Figura 01).

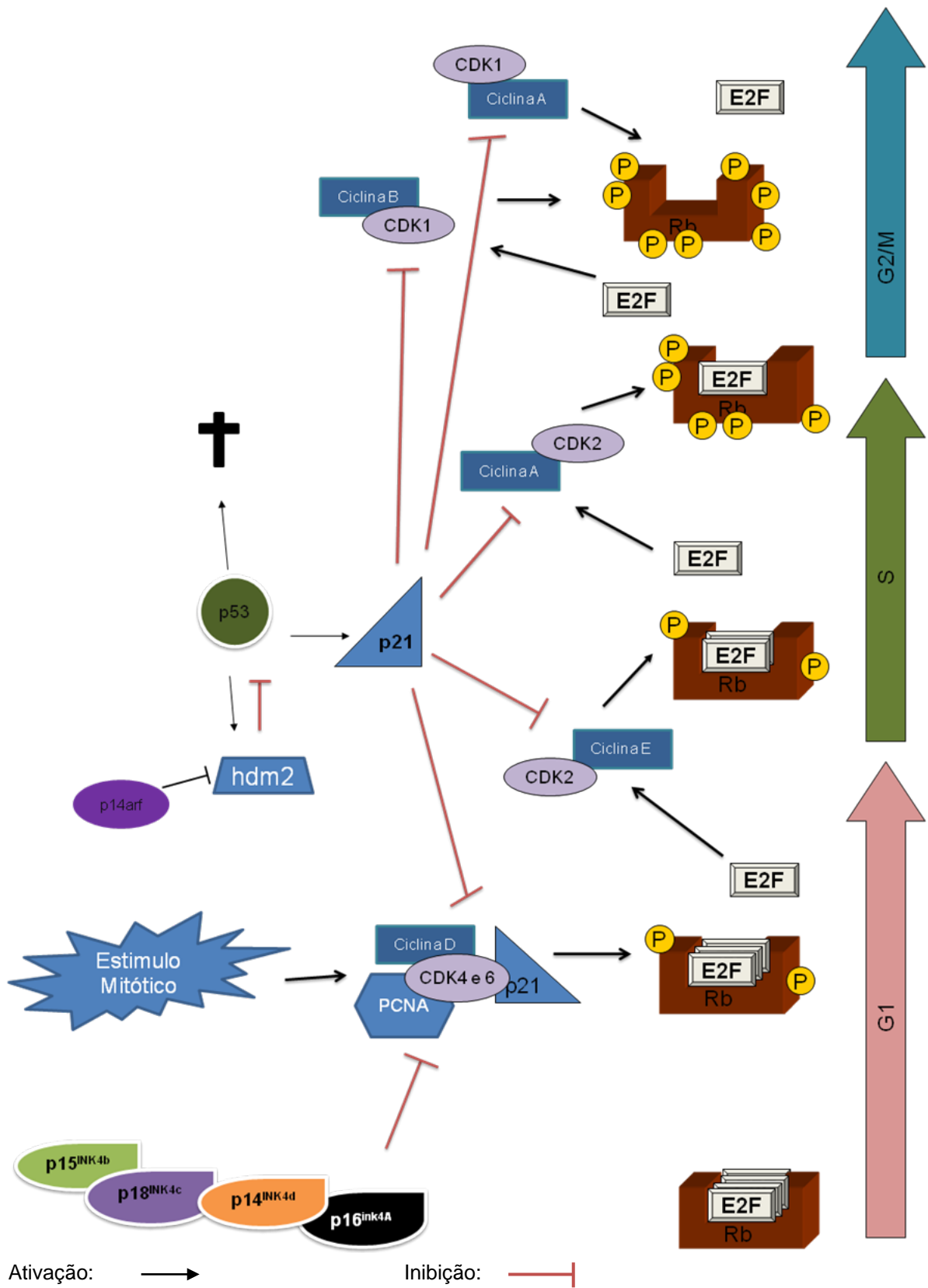
Uma vez adquirida a independência dos fatores extracelulares após a passagem do ponto de restrição, a progressão pelo ciclo será mantida pela formação dos complexos ciclina-CDK e pela conseqüente fosforilação de RB em um sistema de feedback positivo, que independe de qualquer estímulo para continuar. Nessa condição, a parada do processo é realizada pela expressão de inibidores da atividade quinásica das CDKs, os CDKIs. Contrapondo a atividade dos complexos ciclina-CDK, os CDKIs regulam negativamente a continuidade do ciclo celular por impedir a fosforilação de Rb. Os CDKIs são classificados em dois grupos de acordo com os alvos de sua atividade inibitória.

O primeiro grupo, denominado INK4, compreende as proteínas p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}, que inibem especificamente os complexos de ciclina

formados com CDK4 e 6 (Byeon et al., 1998; Vernell et al., 2003). As proteínas INK4 são induzidas quando há necessidade de parada em fases iniciais do ciclo celular, como nos casos de inibição por contato célula-célula, falta de nutrientes e/ou fatores de estímulo mitótico, na presença de TGF- β (*tumor growth factor β*) ou no processo de senescência. Essas proteínas, notadamente p16^{INK4a}, são capazes de associar-se à porção não-catalítica da CDK4 e da CDK6, impedindo a formação de complexos ativos de ciclina D-CDK4/6 e impedindo a fosforilação de Rb durante G1 e G1/S (Byeon, 1998; Serrano, 1993). Os dados disponíveis na literatura levam à interpretação de que alterações na via pRb devido a perda dos supressores de tumor p16^{INK4a}, ou devido a alterações diretas em pRb, ou em função da ativação de CDK4 ou ciclina D, constituem um evento comum em praticamente todos os tipos de tumores humanos (Jarmalaite et al., 2003; Ruas e Peters, 1998; Sherr, 1996).

O segundo grupo de CKIs, o Cip/Kip, é formado pelos CKIs não específicos, capazes de inibir a formação de todos os complexos ciclina-CKI. Nesse grupo inclui-se as proteínas p21^{CIP1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}. Essas proteínas, notavelmente p21^{CIP1}, apresentam importante atividade supressora por antagonizarem a atividade dos complexos formados com CDK 2 em S e G2 e com CDK1 em G2/M impedindo a fosforilação de Rb (Liu et al., 2003). A proteína p21^{CIP1} também é capaz de seqüestrar a molécula de PCNA, impedindo a formação do complexo PCNA-POL δ e bloqueando a replicação do DNA e conseqüentemente o ciclo celular (Cooper et al., 1999; Waga et al., 1994). O papel da família Cip/Kip na regulação positiva dos complexos ciclina-CKI ainda é alvo de discussão. Estudos demonstraram que em fibroblastos embrionários de camundongo com deficiência de p21 e p27, a formação de ciclina D-CDK4/6 é dramaticamente reduzida, levando a atividade catalítica desse complexo a níveis quase indetectáveis (Cheng et al., 1999; Sherr and Roberts, 1999). Essas células deficientes de p21 e p27, contudo, continuam sensíveis ao efeito inibitório de p16^{ink4a}. Isso sugere que indiferente à redução dos níveis de ciclina D-CDK4/6, o prosseguimento do ciclo celular continua dependente da atividade catalítica desse complexo. (Cheng et al., 1999; Sugimoto et al., 2002). Além de modular a atividade de ciclina D-CDK4/6 durante G1, a formação dos complexos ternários ciclina D-CDK4/6-p21-PCNA durante G1 colabora com a manutenção da atividade dos complexos ciclina E-CDK2, ao manter as proteínas Cip/Kip complexadas à CDK4/6-p21-PCNA e garantir a irreversibilidade da transição G1/S (Pei X e Xiong, 2005). Na ausência de estímulos mitógenos, a ciclina D é

Figura 01: Esquema das vias de controle do ciclo celular.



Ativação: →

Inibição: —|

Fonte: Costa-Souza, 2011

rapidamente degradada e as proteínas Cip/Kip ligadas ao complexo ciclina D-CDK são então mobilizadas para inibir o complexo ciclina E-cdk2, bloqueando a progressão do ciclo celular (Sherr, 2000). Paralela as vias dependentes da família Cdkl, a via de p53 descrita adiante compõe outro mecanismo importante no controle da proliferação celular.

2.2 Cancer

Cancer é uma doença multigênica, caracterizada pelo acúmulo de alterações que permitem a células romper uma série de barreiras proliferativas, conferindo a vantagens típicas a todos os tipos de célula tumoral. Hanahan e Weinberg (2000) agruparam as vantagens observadas na maioria dos tipos de tumores em seis principais características: auto-suficiência em sinais de crescimento, ausência de resposta a sinais anti-crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase. A análise de *microarrays* de tumores de mama realizada por Whitfield et al. (2006) aponta 62% dos genes encontrados alterados como genes envolvidos diretamente com a proliferação ou com a regulação de outros processos do ciclo celular. Com dados semelhantes encontrados em outros estudos, essa assinatura típica da carcinogênese corrobora para que o cancer seja cada vez mais visto como uma doença do ciclo celular. Sabe-se que, entre as alterações sofridas na aquisição do fenótipo tumoral, a perda de integridade das vias pRb e p53 de controle do ciclo celular são a característica básica do desenvolvimento do cancer (Bartek et al., 1999; Sherr e McCormick, 2002).

A via pRb está alterada em 90% dos tumores, sendo p16^{INK4a} o principal alvo de mutações (Malumbres e Barbacid, 2009; Swanton, 2004). Deleções em homozigose, mutações pontuais e terminações prematuras no locus p16INK4a são observadas com frequência em diversos tumores humanos, como, cancer de pulmão, melanoma, glioma, pâncreas, carcinoma de ovário esôfago e próstata (Benassi et al., 2001; Caballero et al., 2001; Kamiryo et al., 2002; Konishi et al., 2002; Nobori et al., 1993; Saegusa et al., 2001; Smeds et al., 2002; Wada, 2002).

Sendo p16^{INK4a} o principal inibidor da atividade dos complexos de ciclina D-Cdk 4/6, sua falta implica perda de um importante mecanismo de controle da fosforilação de Rb durante G1/S e de indução de senescência. Embora não

obrigatoriamente, mutações em p16INK4a podem afetar também a atividade de p14^{ARF}, uma vez que ambas as proteínas compartilham o locus CDKN2. A perda da atividade de p14^{ARF} altera o equilíbrio de HDM2, reduzindo a estabilidade de p53 e a expressão de p21.

A alteração nos níveis de p21 é comum em diversos tipos de tumores, a saber: astrocitoma; adenocarcinoma de pulmão; câncer de esôfago, fígado, reto; carcinoma gástrico e lipossarcoma (Adachi et al., 2001; Chapusot et al., 2001; Fukushima et al., 2001; Kirla et al., 2000; Mathew et al., 2002; Noda et al., 2002; Schwandner et al., 2002; Xue et al., 2002). Essas alterações ocorrem, em grande parte, devido à alta frequência de mutação no gene p53 (Soussi e Wiman, 2007). A ausência de p16INK4a ou a amplificação de ciclina D-CDK4/6 aumentam o seqüestro de p21CIP1, e também podem estar envolvidos na perda de sua atividade supressora. Como um dos principais efetores da via p53, p21 está intimamente envolvido na patogênese de todos os tumores com alterações em sua ação.

As mutações em p53 constituem o tipo de alteração genética mais freqüente no desenvolvimento do fenótipo tumoral, sendo encontrada em mais de 50% de todos os tipos de tumores humanos (Soussi e Wiman, 2007). Além da perda da atividade normal, alguns mutantes apresentam um efeito dominante negativo sobre a forma selvagem de p53 e apresentam o efeito oncogênico ganho do ganho de funções (ambos processos descritos no tópico acerca de mutações de p53). O efeito do acúmulo dessa proteína mutante em células tumorais é o aumento do potencial metastático, observado em modelos animais comparado com camundongos p53-null. Outros efeitos estão relacionados com dois genes da família de p53: p63 e p73. São genes que cooperam com p53 na ativação da apoptose e, que podem ser inativados por alguns mutantes de p53, resultando na perda da função supressora tumoral (Soussi e Hjortsber, 2008; Vousden e Lane, 2007).

2.3 p53

Em 1979, Lane e Crawford relataram através da imunoprecipitação do antígeno Large T, a presença de uma proteína de aproximadamente 53 kDa e de origem não viral no soro de animais que desenvolveram tumores induzidos por SV40. O mesmo resultado foi encontrado e confirmado por outros grupos, de modo independente (Kress et al., 1979; Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979;

Melero et al., 1979; Smith et al., 1979). Estudos posteriores demonstraram que níveis elevados dessa proteína de 53 kDa eram encontrados não apenas em células transformadas por SV40, mas também em outros tipos de cancer não relacionados com infecção viral. A partir desses resultados, diversos grupos descreveram o cDNA de p53 como capaz de induzir o processo de transformação em modelos *in vitro* e *in vivo*, conduzindo a classificação de p53 como oncogene. A ideia de p53 como supressor tumoral começou a se desenvolver apenas durante a década de 80, com estudos relatando sua perda em diversos tipos de tumor. Em 1989, outro cDNA de p53 foi isolado, sendo esse capaz de suprimir o processo de transformação tumoral (Baker et al., 1989; Finlay et al., 1989). Posteriormente averiguou-se que muitos dos cDNAs utilizados anteriormente codificavam na realidade versões mutantes de p53, enquanto os utilizados por Finlay et al em 1989 e por outros grupos com resultados semelhantes correspondem a versão selvagem com efeito supressor tumoral. Os trabalhos desde então revelaram p53 como um fator de transcrição extremamente importante no controle e manutenção da integridade do genoma (Lane, 1992).

A funcionalidade de p53 em respostas a uma série de estresses é dada por um conjunto de interações citoplasmáticas e por sua atividade como fator de transcrição no núcleo. Em sua conformação selvagem, possui 393 aminoácidos divididos em três grandes regiões com seus domínios funcionais: A região N-terminal, contendo domínios de ativação transcricional e uma região rica em prolina (resíduos 1-43 e 61-94 respectivamente); O domínio de ligação com DNA (*DNA binding domain - DBD*) na região central da molécula (resíduos 100-300), capaz de reconhecer e se ligar ao DNA nos promotores responsivos a p53; A região C-Terminal, que inclui um domínio de tetramerização e um domínio rico em lisina (resíduos 323-360 e 363-393 respectivamente) (Cho et al., 1994; Joerger e Fersht, 2007; Joerger e Fersht, 2008).

A atividade de p53 é definida principalmente pelo equilíbrio entre duas outras proteínas envolvidas em sua regulação: 1 - A proteína HDM2 (Human Double Minute 2), ativa em situação fisiológica normal, atua como a E3-ligase que sinaliza p53 para ubiquitinação e subsequente degradação no sistema proteassoma. A regulação HDM2-p53 é do tipo retroalimentação negativa, em que atividade aumentada de p53 dirige a expressão de HDM2, seu próprio regulador negativo. Com HDM2 ativo, os níveis de p53 se mantêm baixos devido a alta taxa de degradação no proteassoma; 2 - p14^{ARF}, produto da transcrição de um exon inicial alternativo que provoca

alteração do frame de leitura do p16^{INK4a}, é capaz de inativar HDM2, aumentando a estabilidade de p53 ao reduzir sua taxa de degradação (Weber et al., 2000; Sherr, 2000). A ativação de p53 por sinais oncogênicos, como a superexpressão dos proto-oncogenes Ras e Myc é dependente da proteína p14^{ARF}; A estabilização de p53 também pode ser obtida através de modificações pós-traducionais. Em estresses gerados por danos no DNA incluindo, por exemplo, irradiação por UV ou raios gama e reação com radicais livres oxidativos, a ativação de p53 depende de proteínas quinases, como ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (*Ataxia Telangiectasia Related*) e ChK2, que estabilizam p53 através da fosforilação de resíduos específicos. Independente do mecanismo, todas essas vias de ativação inibem a degradação e permite a estabilização e modificações pós-traducionais da proteína p53, possibilitando sua ação de ativar a transcrição de diversos genes envolvidos em morte, inibição da divisão celular, angiogênese e metástase, senescência, entre outros (Levine et al., 2006; Volgestein et al., 2000).

Para desempenhar sua atividade como fator de transcrição, p53 forma um complexo homotetramérico, formado pela associação de um par de dímeros de p53 através do domínio de tetramerização. Com essa estrutura quaternária, o tetrâmero é capaz de reconhecer e se ligar às seqüências consenso nos elementos responsivos a p53, regulando positiva ou negativamente a expressão de diversos genes que são alvos do controle transcricional (McLure e Lee, 1998; Nagaich et al., 1999; Tidow et al., 2007). Esse controle transcricional pode ocorrer como resposta a uma série de estresses, e o tipo de resposta resultante depende da natureza do estresse que estimulou o processo. Entre as respostas resultantes da atividade de fator transcricional, p53 pode desencadear o programa de apoptose através da indução de fatores das vias intrínsecas e extrínsecas, como Puma, BAX, NOXA e outros, que levam a morte celular (Riley et al., 2008; Zilfou e Lowe, 2009). Alternativamente, p53 responde a estresse como indutor do processo de senescência, ativando fatores como o Cdk1 p21, GADD45 e 14-3-3 σ , atuando como potente bloqueador do ciclo celular (Taylor e Stark, 2001).

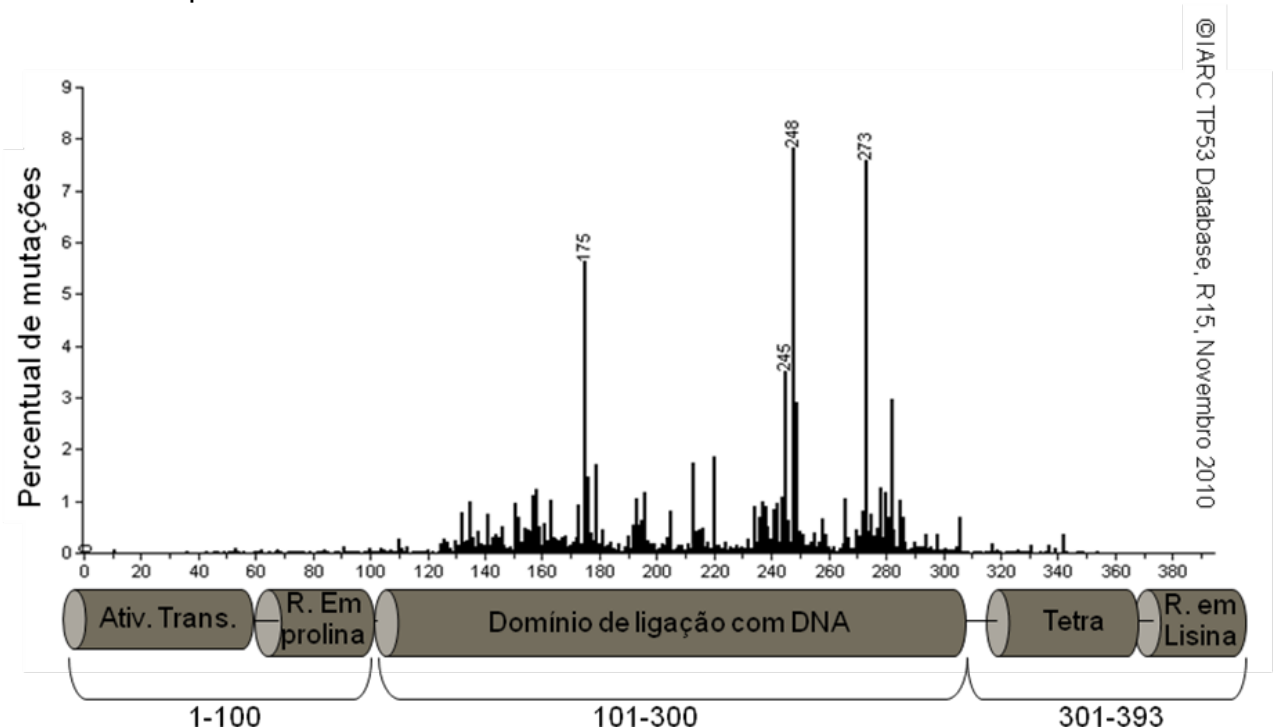
Alem da atividade como fator de transcrição, p53 desempenha atividade citoplasmática através da interação com outras proteínas. No citoplasma, é descrito que p53 pode promover apoptose modulando a permeabilização da membrana mitocondrial externa, ao interagir com proteínas da família BCL-2 (Green e Kroemer,

2009). Também é relatado um papel de p53 no citoplasma modulando o processo de autofagia. (Tasdemir et al., 2008a; b)

2.4 Mutações em p53

Dado seu importante papel na manutenção da estabilidade do ciclo celular, não surpreende que a perda da atividade de p53 seja um evento recorrente em diversos tipos de tumores. Mutações em p53 constituem o tipo de alteração genética mais freqüente no desenvolvimento do fenótipo tumoral, sendo encontrada em mais de 50% de todos os tipos de tumores humanos (Soussi e Wiman, 2007). Os outros 50%, sofrem alterações que afetam a atividade de p53 através de mecanismos indiretos, como por exemplo a amplificação de HDM2 e a perda de atividade de p14^{ARF}. Essas alterações levam a destabilização de p53 e aumentam a probabilidade de formação de tumores (Soussi, 2005).

Figura 02: Gráfico demonstrando a os residuos mais frequentemente mutados em p53.



Abaixo do gráfico a estrutura de p53, comparando seus domínios a distribuição de mutações no gráfico acima.

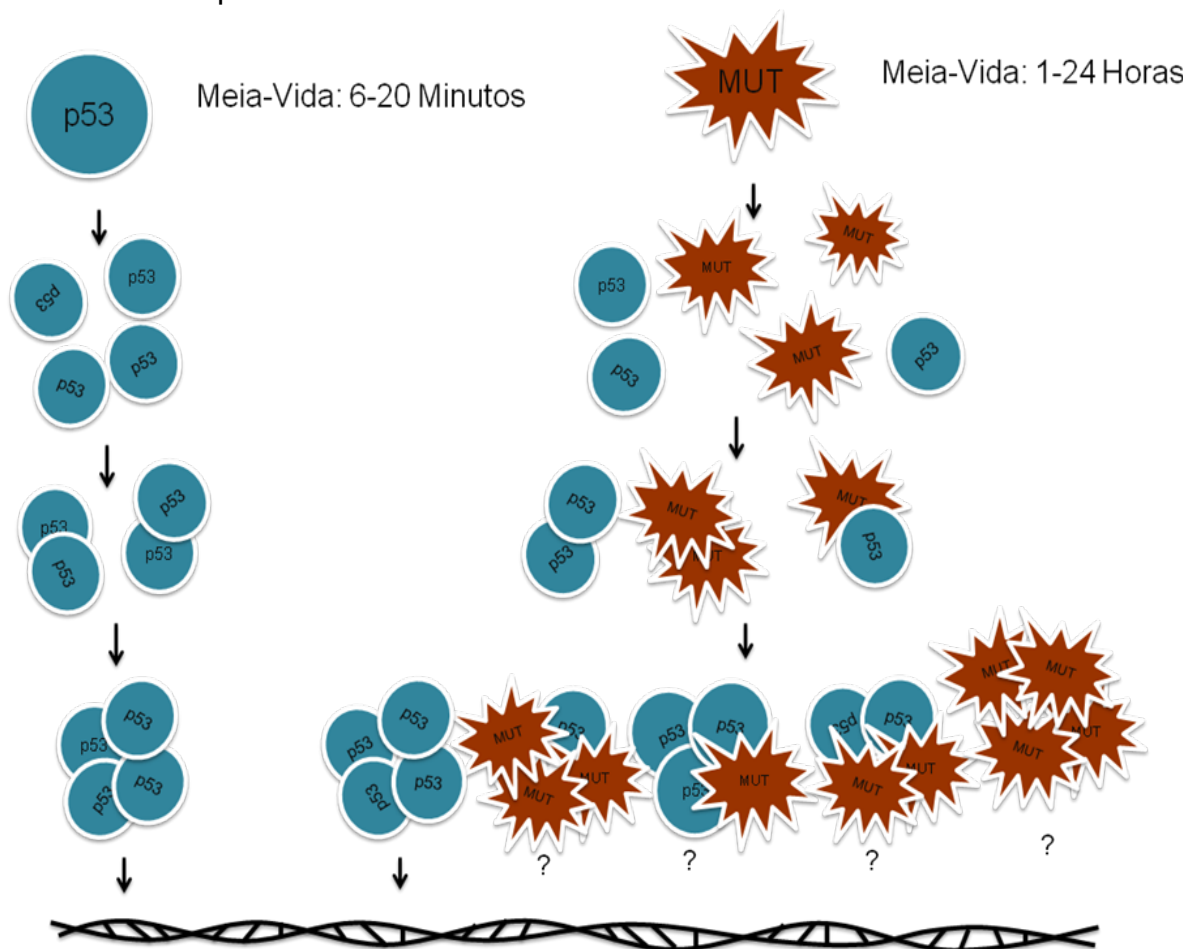
Fonte: Adaptado de IARC, TP53 Database, R15, Novembro 2010

Diferente do que é comumente observado nas mutações de outros supressores de tumor, onde a alteração freqüentemente leva à desestabilização e deleção da proteína, mais de 73% de todas as mutações somáticas de p53 são mutações com perda de sentido, com a substituição de um único aminoácido, que não impede a produção de uma proteína completa e estável (Petitjean et al., 2007). Aproximadamente 90% dessas mutações ocorrem na região de ligação com DNA (Figura 02), sendo classificadas em dois grandes grupos estruturais, de acordo com seu efeito na estabilidade da molécula de p53. Primeiro, as mutações de contato com DNA (*DNA contact mutants*), onde a mutação leva à alteração de algum resíduo diretamente envolvido na interação de p53 com o DNA, porém sem afetar a estrutura da molécula de p53. No segundo grupo, os mutantes conformacionais (*Conformational mutants*), a mutação ocorre em um resíduo que afeta dramaticamente a conformação da região de ligação com DNA da molécula, expondo resíduos que não estão normalmente expostos na conformação selvagem de p53. (Joerger e Fersht, 2007; Joerger e Fersht, 2008, Oren e Rotter, 2010). Em ambos os grupos, independente do tipo de mutação, a proteína resultante perde sua especificidade e capacidade de associar-se aos elementos responsivos de p53. Como resultado, em muitas mutações ocorre uma perda de função, onde a molécula mutante não exerce a atividade transcricional normal de p53, falhando em induzir seus genes alvos. Como a transcrição de HDM2 é alvo da atividade de p53, uma vez que a molécula mutante falha em promover a transcrição de genes alvos ela desregula a atividade de HDM2, escapando da sinalização para degradação no sistema proteassoma, tornando-se mais estável e acumulando-se em altos níveis na célula. Enquanto a meia-vida da molécula selvagem é de 6 a 20 minutos aproximadamente, as moléculas mutantes atingem uma meia-vida entre 1 e 24 horas (Strano, 2007; Soussi e Hjortsber, 2008).

Alem da perda da atividade normal de p53, alguns mutantes, notavelmente os *hotspots* de pior prognóstico, apresentam um efeito dominante negativo sobre a forma selvagem de p53. Na situação onde encontram-se um alelo mutado e um alelo selvagem, a proteína mutante não necessariamente perde sua capacidade de associar-se entre si e de associar-se com moléculas de p53 selvagem para formar dímeros e tetrâmeros. Essa característica torna possível a formação de heterodímeros portando moléculas mutantes e selvagens de p53,

resultando na montagem de heterotetrâmeros que, mesmo contendo moléculas selvagens, não apresentam função transcricional (Chan et al., 2004; Lubin et al., 2010). Sendo as proteínas mutantes mais estáveis, e estando presentes em níveis mais altos que sua versão selvagem, a probabilidade privilegia a formação dos tetrâmeros defeituosos (Soussi e Hjortsber, 2008). O efeito dito como dominante negativo é, então, fruto da capacidade que alguns mutantes apresentam de literalmente seqüestrar a forma selvagem, mantendo-a em heterotetrâmeros defeituosos de p53 (Figura 03).

Figura 03: Esquema das possíveis interações entre moléculas selvagens e mutadas de p53.



Fonte: Costa-Souza, 2011.

Além da perda de função e do efeito dominante negativo, alguns mutantes adquirem nova atividade transcricional e propriedades distintas daquelas observadas na molécula selvagem de p53, conferindo a molécula mutante um ganho de função

(*gain of function*). Esse ganho de função, novamente com ênfase aos *hotspots* de pior prognóstico, confere ao mutante propriedades oncogênicas. Camundongos que apresentam homozigose para mutação em p53, desenvolvem grande predisposição para o surgimento de tumores quando comparado ao fenótipo heterozigoto e p53 selvagem homozigoto. (Jacks et al., 1994). Camundongos com fenótipo de heterozigose para mutação de p53 apresentam uma predisposição semelhante à observada em portadores da síndrome de Li-Fraumeni, uma doença hereditária relativamente rara onde se observa grande predisposição a diversos tipos de sarcoma. Consta-se que mais de 70% dos portadores de Li-Fraumeni apresentam mutação em p53 (Jacks et al., 1994, Kokichi et al., 1999).

É proposto que o efeito oncogênico observado no ganho de função ocorra principalmente através da regulação positiva ou negativa de genes como MAP2K3, c-myc, PCNA, FOS, BCL-2, NFKb2, e diversos outros genes associados à proliferação, migração, invasão, resistência a quimioterápicos e a progressão tumoral (Deb et al., 1992; Frazier et al., 1998; Preuss et al., 2000; Brosh e Rotter, 2009; Dell'Orso et al., 2011). Diversos mutantes de p53 apresentam também a capacidade de interagir com proteínas diferentes das interações observadas na molécula selvagem, modulando os processos acima citados através de interações com outras proteínas, como regulando a atividade de p63 e p73 da família de p53, TGF- β , Ras, ou promovendo a reciclagem de integrinas no processo de migração e invasão (Marine et al., 2009; Muller et al., 2009).

2.5 Vetores adenovirais

Vetores virais compõem um veículo eficiente para o carregamento de genes terapêuticos, e a escolha do vírus é uma etapa importante nas estratégias baseadas em terapia gênica. Vantagens importantes como a habilidade de transduzir células mitóticas e pós-mitóticas em diferentes tipos celulares, e a possibilidade de produção com alto título, os fazem participar de muitos protocolos clínicos, sendo o veículo de entrega dos genes de interesse em muitos estudos para vários tipos de doenças, como o cancer e outras malignidades genéticas. De 1644 estudos clínicos em andamento ao redor do mundo em 2010, 1019 (61,98%) utilizam vetores virais, sendo que destes 400 (39,25%) utilizam vetores adenovirais (www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical. Acesso: 2008 jun 11).

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de tecnologias e a expansão do conhecimento acerca da biologia do adenovírus, particularmente os sorotipos 2 e 5, viabilizou o avanço dos ADv da primeira para a segunda, e então para terceira geração (Russell et al., 2000). Com esses avanços, o genoma do adenovírus selvagem sofreu deleções das porções não essenciais do DNA viral, eliminando o efeito patológico do vírus, atenuando a resposta imunológica contra proteínas virais durante o tratamento, e aumentando a capacidade de carrear transgenes maiores (Dormond et al., 2009; Gojo et al., 2002). De particular importância é a remoção da sequência E1, regulador da replicação viral e responsável pela ativação de outros genes adenovirais (Elizabeth e Mathews, 1987). A deleção de E1 impede a replicação da partícula e a formação do capsídeo viral nas células transduzidas pelo Adv, mas permite a geração de novas partículas em linhagens *helper* empacotadoras, como é o caso da linhagem 293 HEK (*Human Embryonic Kidney*), transformadas com a sequência do gene E1 que fornece o produto do gene de modo *in trans* (Graham et al., 1977; Russell et al., 2000; Walther e Stein, 2000)

Com o aumento na segurança e na eficácia, os ADv vêm sendo extensamente utilizados em ensaios clínicos, devido a um número de vantagens que, nos últimos anos, tornaram-no um dos mais promissores vetores para carrear proteínas e RNA exógeno em terapia gênica e produção de vacinas (Liu et al., 2009). Além de possuir um amplo tropismo celular, o ADv é capaz de infectar tanto células quiescentes quanto em células em divisão, podendo carrear genes de aproximadamente 10 Kb (Kathryn et al., 2010). Por não ser capaz de integrar-se ao genoma leva a expressão transiente do transgene, tornando-o interessante para estratégias onde a expressão do gene terapêutico por um longo período de tempo é indesejada. Além disso, elimina o risco de alterações genéticas devido ao processo de integração no DNA da célula hospedeira (Dormond et al., 2009; Waehler et al., 2007).

Apesar das vantagens, há dois problemas associados com o uso e a produção de ADv. Primeiro, as proteínas virais do capsídeo, essenciais para composição da partícula viral, podem induzir uma resposta imunológica contra o vetor e contra as células transduzidas. A indução da resposta imune limita a expressão e reduz o tempo de atividade do transgene, além de influir em caso onde seja necessária a re-administração do tratamento (Hehir et al., 1996; Walther e Stein, 2000; Waehler et al., 2007). O segundo problema é a geração de partículas

adenovirais competentes de replicação (RCA), que readquiriam a seqüência do gene E1 através de recombinação homologa com a seqüência E1 presente na linhagem *helper* empacotadora. Essas partículas readquirem a capacidade de replicação do vírus selvagem, e constituem um risco a segurança do tratamento (Fallaux et al., 1999; Duigou e Young, 2005).

2.6 Terapia gênica do cancer

Como princípio básico, a terapia gênica visa o tratamento de uma doença através da introdução de um gene (transgene) em uma célula alvo, para que com a remediação de genes ausentes ou defeituosos seja obtido um efeito terapêutico (Gojo et al., 2002). Possível devido aos avanços com tecnologias de DNA recombinante, a terapia gênica representa uma possível alternativa para diversas malignidades que, anteriormente, não possuíam um tratamento eficiente ou simplesmente não apresentavam perspectiva de tratamento.

Esse tipo de estratégia apresenta um histórico clínico relativamente recente, com pouco mais de duas décadas desde o primeiro ensaio clínico. Iniciado em 1990 e publicado em 1995, o estudo realizou, em crianças portadoras de imunodeficiência combinada severa com perda de adenosina deaminase (ADA-SCID), o transplante autólogo de linfócitos T tratados *ex-vivo* com vetores retrovirais carreando uma cópia normal do gene ADA (adenosina deaminase), perdido na ADA-SCID devido mutação (Blaese et al., 1995; Bordignon et al., 1995). Os vetores utilizados nesses primeiros estudos falharam em transduzir células-tronco hematopoiéticas, de modo que, por conseqüência de visar células já diferenciadas como alvo do tratamento, a extensão e a duração do efeito terapêutico obtido foi limitada. Contudo, obteve-se um benefício clínico sem efeitos colaterais associados ao vetor retroviral (Strauss e Costanzi-Strauss, 2007).

Ao longo das duas décadas seguintes, diversos estudos foram conduzidos, culminando com a aprovação de novos protocolos clínicos, visando diferentes tipos de doenças. Apesar de os primeiros ensaios clínicos de terapia gênica visarem o tratamento de desordens monogênicas, ao longo dos 20 anos as estratégias visando o tratamento de tumores tornaram-se predominantes (Figura 04), com 64.6% dos protocolos clínicos em andamento durante 2011 direcionados contra o cancer (www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical. Acesso: 2008 jun 11).

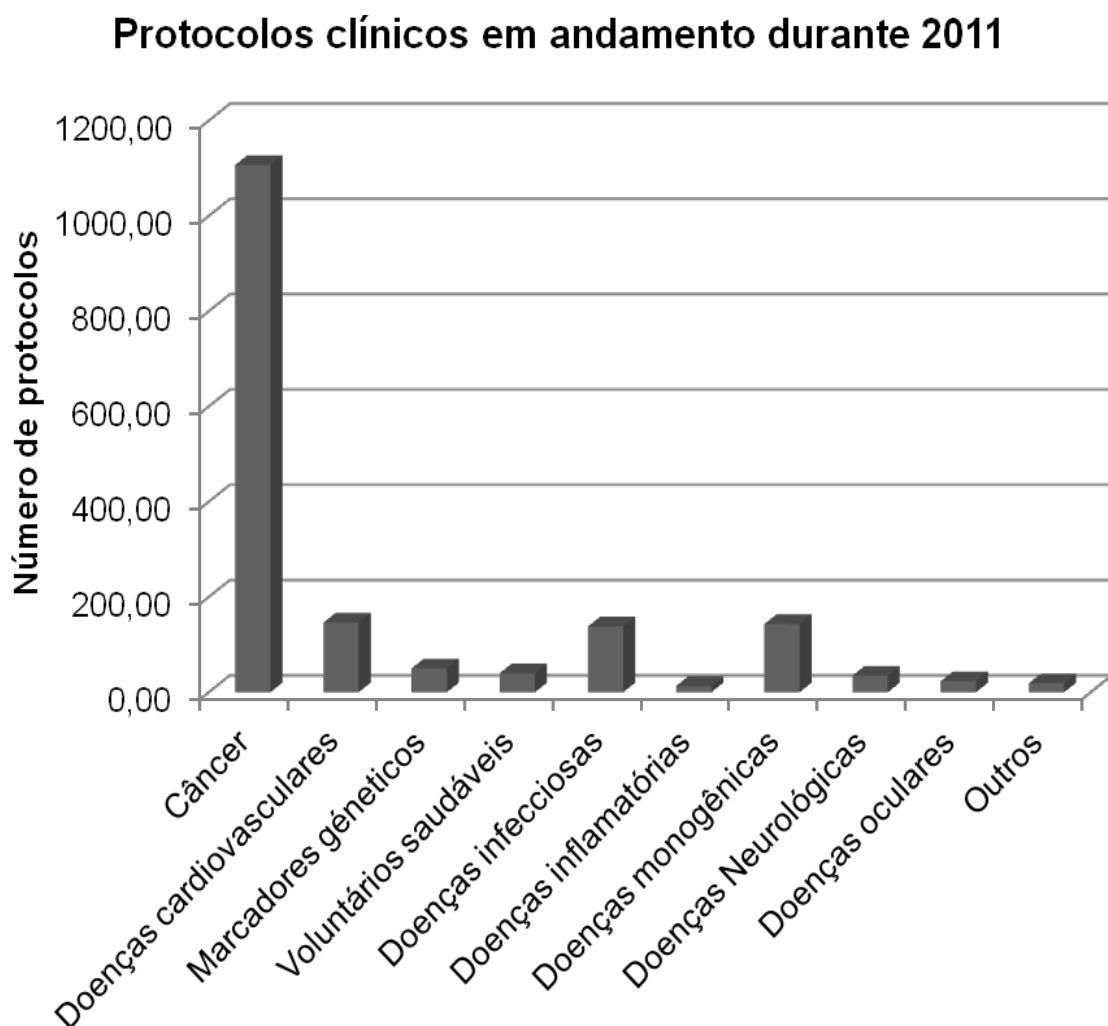
Líder de mortalidade em todo o mundo, o cancer é uma doença multifatorial, com grande complexidade etiológica e complexas interações entre o tumor e seu microambiente (Hanahan e Weinberg, 2000). Atualmente, a remoção cirurgica do tumor e aplicações de radioterapia e/ou quimioterapia, são as opções de tratamento mais utilizadas. Porém, devido ao baixo prognóstico de diversos tumores, aliado a um padrão de sobrevida ruim, têm estimulado pesquisas em busca de terapias alternativas para o cancer. Com tal relevância clínica e sendo o cancer uma doença causada por alterações genéticas, a terapia gênica representa uma possível alternativa de tratamento e uma esperança de cura para casos que falharam nas terapêuticas convencionais. Considerando que tumores apresentam, quase que em totalidade, alterações nas vias p53 e/ou pRb de controle do ciclo celular, o uso da terapia gênica para a introdução de cópias normais destes ou outros supressores de tumor emergiu como promissora estratégia terapêutica.

O efeito da reposição gênica do supressor de tumor p53 em cancer pulmonar (Roth et al., 1996), pancreático (Cascalló et al., 1999; Ghaneh et al., 2001), ovário (Modesitt et al. 2001), próstata, glioblastoma (Buttgereit et al., 2001; Gomez-Mansano et al., 1996), linfomas (Rosenfeld et al., 1995), entre outros, foi objeto de estudo de vários autores (Roth, 2006). A restauração da expressão de p16^{INK4a} também vem sendo alvo de estudos, apresentando a capacidade de inibir o crescimento de células derivadas de diversos tumores, incluindo glioblastoma (Costanzi-Strauss et al., 1998; Hama et al., 2003; Kim et al, 2003), próstata (Gotoh et al., 1997; Steiner et al., 2000), de pâncreas, de cabeça e pescoço (Rocco et al., 1998), cancer cervical (Sanding et al., 1997), de mama (Campbell et al., 2000), de pulmão (Gotoh et al., 1997) e outros.

Apesar de muitas das estratégias baseadas na transferência gênica apresentarem bons resultados, o sucesso dessa restauração obtida com a expressão de um único gene supressor de tumor, é extremamente depende do conjunto de mutações nas vias pRb e p53 que levou a célula ao fenótipo tumoral (Costanzi-Strauss et al. 1998; Strauss e Costanzi-Strauss, 1999). O efeito terapêutico advindo da remediação do supressor de tumor p16^{INK4a}, por exemplo, é em grande parte devido efeito inibitório de p16^{INK4a} sobre o complexo ciclina D-Cdk4/6, mantendo Rb na forma ativa hipofosforilada. Por conseqüência, esse efeito supressor é depende da presença de pRb funcional na célula tumoral (Lukas et al., 1995; Costanzi-Strauss et al., 1998). Do mesmo modo, o efeito da remediação de é

limitado em células com amplificação de HDM2 ou portadoras de mutação de p53 com fenótipo dominante negativo (Zeimet e Marth, 2003). A remediação de Rb pode apresentar-se ineficiente em células com amplificação de ciclina D ou CDK4 (Strauss e Costanzi-Strauss, 1999).

Figura 04: Gráfico demonstrando a utilização dos principais vetores em protocolos de terapia gênica.



Fonte: The Journal of Gene Medicine, www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical. Acesso: 2011 ago 10

Dadas todas as indicações e limitações frente aos diversos fenótipos tumorais, os conhecimentos acerca do gene desregulado e de toda a via regulatória envolvida no controle do ciclo celular, são pré-requisitos necessários para a escolha supressor de tumor mais adequado para uma bem sucedida reposição individual em células transformadas (Costanzi-Strauss et al., 1998; Cascalló et al., 1999). Entretanto, a terapia gênica baseada na remediação de um único supressor de tumor, pode em alguns casos não ser suficiente para agir como um geral e completo inibidor do crescimento celular descontrolado.

7 Conclusão

Mutações em p53 constituem a alteração genética mais freqüente em todos os tipos de tumores. Mesmo quando os eventos que levam a um fenótipo transformado não ocorrem diretamente na proteína p53, eles invariavelmente afetam outros componentes da via, seja afetando os elementos reguladores da atividade de p53 ou desregulando em seus efetores. Desse modo, não é uma generalização considerar que praticamente todos os tumores sofrem alterações que desregulam a via de p53. Com tamanha importância clínica, nos últimos anos inúmeros estudos direcionaram seus esforços para elucidar o papel que as mutações de p53 desempenham na transformação tumoral, entendendo os mecanismos responsáveis por sua oncogenicidade e utilizando esse conhecimento como base para prognósticos e para o direcionamento de terapias. Muitos desses trabalhos, assim como este, avaliaram o efeito da introdução de mutantes de p53 em linhagens tumorais. Os tipos de alterações são diversas, variando em acordo com o tipo celular e origem da célula tumoral utilizada. Aqui, optamos por utilizar os mutantes de p53R175H e p53R248Q com a linhagem NCI-H358 para gerar os modelos isogênicos, que possam ser utilizados para testar nossas abordagens terapêuticas.

As principais conclusões extraídas desse trabalho foram:

1. As linhagens isogênicas foram geradas com sucesso, com a presença e a identidade dos mutantes p53R175H e p53R248Q confirmadas por sequenciamento e imunocitoquímica
2. A curva de crescimento e o tempo de dobramento indicaram que os mutantes p53R175H e p53R248Q não geraram alterações na dinâmica de proliferação *in vitro*, quando compara-se com a linhagem parental H358.
3. Ambos, p53R175H e p53R248Q, levaram a um aumento da eficiência de plaqueamento das linhagens isogênicas, quando compara-se com a linhagem parental H358, sugerindo um fenótipo de maior agressividade.
4. p53R248Q induziu um aumento de quase duas vezes na formação de colônias em agarose, indicando um efeito oncogênico maior que o observado no mutante p53R175H.

5. As características de maior eficiência de plaqueamento por ambos os mutantes, e de maior formação de colônias em agarose por p53R248Q, podem constituir indicio de que as linhagens H358p53¹⁷⁵ e H358p53²⁴⁸ apresentem maior tumorigenicidade quando introduzidas *in vivo*. A análise dessas linhagens em modelo *in vivo* é uma continuidade lógica ao prosseguimento da caracterização dessas linhagens.
6. Os resultados na literatura com a introdução de mutantes de p53 em diversas linhagens tumorais apresentam resultados variados. Comparando-se esses dados juntamente com o que foi observado nesse trabalho, nota-se que, nos casos onde utilizou-se linhagens tumorais para a introdução de mutantes, os tipos de alterações induzidas pelas características de ganho de função e/ou efeito dominante negativo são dependentes do genótipo e fenótipo da linhagem utilizada, que já carregava seu próprio conjunto de alterações para apresentar um fenótipo transformado antes da introdução do mutante.
7. Paralelamente a geração das linhagens derivadas de H358, foram geradas linhagens isogênicas derivadas da linhagem PC-3 de adenocarcinoma de próstata (Anexo B). Essas linhagens não foram utilizadas no projeto, mas fazem parte de nosso banco de linhagens isogênicas portadoras de p53 e sem dúvida serão utilizadas como modelos em nossas estratégias de tratamento.
8. As linhagens isogênicas geradas nesse trabalho podem ser utilizadas como modelos não apenas para estratégias que envolvam terapia gênica, mas também no desenvolvimento de novas drogas e fármacos onde o genótipo de p53 seja relevante.
9. Os resultados com a transdução adenoviral indicaram que o efeito da remediação de p16 não sofreu interferência dos mutantes p53R175H e p53R248Q, conforme indicado nos resultados que apontam acúmulo de células em G1 e alterações morfológicas associadas a senescência.

Referências

Adachi T, Oda Y, Sakamoto A, Saito T, Tamiya S, Masuda K, Tsuneyoshi M. Immunoreactivity of p53, mdm2, and p21WAF1 in dedifferentiated liposarcoma: special emphasis on the distinct immunophenotype of the well-differentiated component. *Int J Surg Pathol.* 2001;9:99-109.

Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B et al. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* 2009;137:87-98.

Bai X, Che F, Li J, Ma Y, Zhou Y, Zhai J, Meng L. Effects of adenovirus-mediated p16 and p53 genes transfer on apoptosis and cell cycle of lung carcinoma cells. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2000;29:354-358.

Baker SJ. et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science.* 1989;244:217-221.

Barrett JC, Crawford BD, Mixer LO, Schechtman LM, Ts'o PO, Pollack R. Correlation of in vitro growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Res.* 1979;39:1504-1510.

Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol.* 1999;187(1):95-9.

Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Magagnoli G, Ragazzini P, Gobbi GA, Sangiorgi L, Pazzaglia L, Asp J, Brantsing C, Picci P. Involvement of INK4A gene products in the pathogenesis and development of human osteosarcoma. *Cancer,* 2001;92:3062-3067.

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsey WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* 1995;270:475-480.

Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science,* 1995;270:470-475.

Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer,* 2009;9:701-713.

Buttgereit P, Schakowski F, Märten A, Brand K, Renoth S, Ziske C, Schöttker B, Ebert O, Schroers R, Schmidt-Wolf IG. Effects of adenoviral wild-type p53 gene transfer in p53-mutated lymphoma cells. *Cancer Gene Ther.* 2001;6:430-439.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22]

Byeon IL, Li J, Ericson K, Selby TL, Tevelev A, Kim H, O'Maille PI, Tsai M. Tumor Suppressor p16INK4A: Determination of Solution Structure and Analyses of Its Interaction with Cyclin-Dependent Kinase 4. *Molecular Cell*, 1998;1:421-431.

Caballero OL, Cohen D, Liu Q, Esteller M, Bonacum J, White P. et al. Loss of chromosome arms 3p and 9p and inactivation of P16 (INK4a) in normal epithelium of patients with primary lung cancer. *Genes and Chromosomes Cancer*. 2001;32:119-125.

Campbell I, Magliocco A, Moyana T, Zheng C, Xiang J. Adenovirus-mediated p16INK4a gene transfer significantly suppresses human breast cancer growth. *Cancer Gene Ther*. 2000;7:1270-1278.

Cascalló M, Mercadé E, Capellà G, Lluís F, Fillat C, Gómez-Foix AM, Mazo A. Genetic background determines the response to adenovirus-mediated wild-type p53 expression in pancreatic tumor cells. *Cancer Gene Ther*. 1999;6:428-436.

Chan KT, Lung ML. Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53:519-526.

Chan WM, Siu WY, Lau A, Poon RYC. How Many Mutant p53 Molecules Are Needed to Inactivate a Tetramer? *Mol Cell Biol*. 2004;24:3536-3551.

Chapusot C, Assem M, Martin L, Chalabreysse L, Benhamiche AM, Lignier MA, Chauffert B, Teyssier JR, Faivre J, Piard F. Expression of p21 WAF1/CIP1 protein in colorectal cancers: study of its relation to p53 mutation and Ki67 antigen expression. *Pathol Biol*. 2001;49:115-123.

Cheng M, Oliver P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM and Sherr CJ. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*. 1999;18:1571-1583.

Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, Park JH, Lee JW, Kim HP, Kim KT, Jang IS, Park SC. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem*. 2004;279:42270-42278.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD., Pavietich NP. Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor - DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science*. 1994;265:346-355.

Gregório JC. Estudo do efeito da remediação simultânea dos genes p16ink4a e p53 mediado pelo adenovírus bicistrônico Adp16IRESp53 em um modelo de carcinoma de pulmão humano. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008

Compagnin C, Mognato M, Celotti L, Canti G, Palumbo G, Reddi E. Cell proliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin in combination with photodynamic therapy. *Cell Prolif*, 2010;43:262-274.

Conradie R, Bruggeman FJ, Ciliberto A, Csika'esz-Nagy A, Novák B, Westerhoff HV, Snoep JL. Restriction point control of the mammalian cell cycle via the cyclin E/Cdk2:p27 complex. *FEBS J.* 2010;277:357-367. Epub 2009 Dec 10.

Cooper MP, Balajee AS, Bohr VA. The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. *Mol Biol Cell.* 1999;10:2119-2129.

Costanzi-Strauss E, Strauss BE, Naviaux RK, Haas M. Restoration of growth arrest by p16INK4, p21WAF1, pRb, and p53 is dependent on the integrity of the endogenous cell-cycle control pathways in human glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res.* 1998;238:51-62.

Dahiya A, Gavin MR, Luo RX, Dean DC. Role of the LXCXE Binding Site in Rb Function. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6799-6805.

Deb S, Jackson CT, Subler MA., Martin DW. Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol.* 1992;66:6164-6170.

Dell'Orso S, Fontemaggi G, Stambolsky P, Goeman F, Voellenkle C, Levrero M et al. ChIP-on-Chip Analysis of In Vivo Mutant p53 Binding To Selected Gene Promoters. *Omics J Int Biol.* 2011;15:1-8.

de Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, Sage J, Jacks T. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:2948-2953.

Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M et al. Gain of function mutation in p53. *Nat Genet.* 1993;4:42-46.

Dormond E, Perrier M, Kamen A. From the first to the third generation adenoviral vector: What parameters are governing the production yield? *Biotechnol Adv.* 2009;27:133-144.

Duigou GJ, Young CSH. Replication-Competent Adenovirus Formation in 293 Cells: the Recombination-Based Rate Is Influenced by Structure and Location of the Transgene Cassette and Not Increased by Overproduction of HsRad51, Rad51-Interacting, or E2F Family Proteins. *J Virol.* 2005;79:5437-5444.

Ekholm SV, Zickert P, Reed SI, Zetterberg A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3256-3265.

Elizabeth M, Mathews M. Multiple Functional Domains in the Adenovirus E1A Gene. *Cell.* 1987;48:177-178.

Elizabeth M, Mathews M. Multiple Functional Domains in the Adenovirus E1A Gene. *Cell.* 1987;48:177-178.

Fallaux FJ, van der Eb AJ, Hoeben RC. Who's afraid of replication-competent adenoviruses? *Gene Ther* . 1999;6:709-712.

Fang F, Newport JW. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell*. 1991;66:731-742.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989;57:1083-1093 .

Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F et al. The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* Oct 2009;16:1086-1093.

Frazier MW et al. Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol. Cell Biol* 1998;18:3735-3743.

Fukushima K, Ueno Y, Yamagiwa Y, Yamakawa M, Iwasaki T, Ishii M, Toyota T, Shimosegawa T. Correlation between p21(waf1) and p16(INK4a) expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2001;20:52-67.

Galmarini CM, Falette N, Tabone E, Levrat C, Britten R, Voorzanger-Rousselot N, Roesch-Gateau O, Vanier-Viornerly A, Puisieux A, Dumontet C. Inactivation of wild-type p53 by a dominant negative mutant renders MCF-7 cells resistant to tubulin-binding agent cytotoxicity. *Br J Cancer*. 2001;85:902-908.

Ghaneh P, Greenhalf W, Humphreys M, Wilson D, Zumstein L, Lemoine NR, Neoptolemos JP. Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16(INK4a) results in pancreatic cancer regression in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 2001;8:199-208.

Gojo S, Yamamoto S, Patience C, LeGuern C, Cooper DKC. Gene therapy its potential in surgery. *Ann R Coll Surg Engl*. 2002;84:297-301.

Gomez-Manzano C, Fueyo J, Kyritsis AP, Steck PA, Roth JA, McDonnell TJ, Steck KD, Levin VA, Yung WK. Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res*. 1996;56:694-699.

Gotoh A, Kao C, Ko SC, Hamada K, Liu TJ, Chung LW. Cytotoxic effect of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes (p21WAF1/CIP1 and p16 INK4a) in human prostata cancers. *J Virol*. 1997;158:636-641.

Gotoh A, Kao C, Ko SC, Hamada K, Liu TJ, Chung LW. Cytotoxic effect of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes (p21WAF1/CIP1 and p16 INK4a) in human prostata cancers. *J Urol*. 1997;158: 636-641.

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Genet Virol*. 1977; 36:59-74.

Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009;458:1127-1130.

Hama S, Matsuura S, Tauchi H, Yamasaki F, Kajiwara Y, Arita K, Yoshioka H, Heike Y, Mandai K, Kurisu K. p16 Gene transfer increases cell killing with abnormal nucleation after ionising radiation in glioma cells. *Br J Cancer*. 2003;89:1802-1811.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999;98:859-869.

Hehir KM et al. Molecular Characterization of Replication-Competent Variants of Adenovirus Vectors and Genome Modifications To Prevent Their Occurrence. *J Viro.* 1996;70:8459-8467.

Hsiao M, Low J, Dorn E, Ku D, Pattengale P, Yeargin J et al. Gain-of-Function Mutations of the p53 Gene Induce Lymphohematopoietic Metastatic Potential and Tissue Invasiveness. *Am J Pathol*. 1994;145:702-714.

Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66:2503-2524.

Jacks T, Remington L, Williams B0, Schmitt EM, Schlomit H, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994;4:1-7

Jarmalaite S, Kannio A, Anttila S, Lazutka JR, Husgafvel-Pursiaine K. Aberrant P16 Promoter Methylation In Smokers And Former Smokers With Non-small Cell Lung Cancer. *Int J Cancer*. 2003;106:913-918.

Joerger AC, Fersht AR. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. 2007;26:2226-2242.

Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:557-582.

Kamiryo T, Tada K, Shiraishi S, Shinojima N, Nakamura H, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y. Analysis of homozygous deletion of the p16 gene and correlation with survival in patients with glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. 2002;96:815-822.

Kirla R, Salminen E, Huhtala S, Nuutinen J, Talve L, Haapasalo H, Kalimo H. Prognostic value of the expression of tumor suppressor genes p53, p21, p16 and pRb, and Ki-67 labelling in high grade astrocytomas treated with radiotherapy. *J Neurooncol*. 2000;46:71-80.

Kim SK, Wang KC, Cho BK, Lim SY, Kim YY, Oh CW, Chung YN, Kim CY, Lee CT, Kim HJ. Adenoviral p16/CDKN2 gene transfer to malignant glioma: role of p16 in growth, invasion, and senescence. *Oncol Rep*. 2003;10:1121-1126.

Kogan-Sakin I, Tabach Y, Buganim Y, Molchadsky A, Solomon H, Madar S et al. Mutant p53R175H upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-

mesenchymal transition in immortalized prostate cells. *Cell Death Differ* 2011;18:271-281.

Kokichi S, Taniguchi T, Saeki M, Tsunematsu V, Tomaru U and Shimoda T. Germline p53 Mutation in a Case of Li-Fraumeni Syndrome Presenting Gastric Cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 1999;29:513-516.

Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Nishimine M, Ishida E, Shimada K. Heterogeneous methylation and deletion patterns of the INK4a/ARF locus within prostate carcinomas. *Am J Pathol*. 2002;160:1207-1214.

Kress M, May E, Cassingena R, May P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*. 1979;31:472-483.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278:261-263.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358:15-26

Léo P, Strauss BE., Muschellack L, Costanzi-Strauss E. Construction, production and characterization of pCLp16IRESp53 polycistronic retrovirus for combined cancer gene therapy. *Virus Rev Res*. 2003;8:219 [Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Virologia; 2003; Aguas de Lindóia].

Levine AJ et al. The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 2006;13:1027-1036.

Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R. Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2003;9(3):1145-1154.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979;17:43-52.

Li Y, Prives C. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 2007;26:2220–2225.

Lubin DJ, Butler JS, Loh SN. Folding of Tetrameric p53: Oligomerization and Tumorigenic Mutations Induce Misfolding and Loss of Function. *J Mol Biol*. 2010;395:705-716.

Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature*. 1995;375:503-506.

Liu DP, Song H, Xu Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene*. 2010;29:949-956.

Liu X, Wang Y, Niu H, Zhang X, Tan W. The improvement of adenovirus vector production by increased expression of coxsackie adenovirus receptor. *Biotechnol Lett.* 2009;31:939-944.

Liu S., Bishop WR; Liu, M Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* 2003;6:183-195.

Liu Y, Dean DC. Tumor initiation via loss of cell contact inhibition versus Ras mutation: do all roads lead to EMT? *Cell Cycle.* 2010;9(5):897-900.

Kathryn H, ZAJDEL MEB, BLAIR GE. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem J.* 2010;431:321-336.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:153-166.

Marine J, Berx G. Transforming growth factor-beta and mutant p53 conspire to induce metastasis by antagonizing p63: a (ternary) complex affair. *Breast Cancer Res.* 2009;11:304.

Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38:832-884.

Maxwell SA. Retinoblastoma protein in non-small cell lung carcinoma, cells arrested for growth by retinoic acid. *Anticancer Res.* 1994;14:1535-1540.

McAteer JA, Davis J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: Davis, JM. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*, New York: Oxford University Press; 1994. p. 93-148

McLure KG, Lee PWK. How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J.* 1998;17:3342-3350.

Modesitt SC, Ramirez P, Zu Z, Bodurka-Bevers D, Gershenson D, Wolf JK. In vitro and in vivo adenovirus-mediated p53 and p16 tumor suppressor therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1765-1772.

Muller PA, Caswell PT, Doyle B, Iwanicki MP, Tan EH, Karim S et al. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell.* 2009;139:1327-1341.

Melero JA, Stitt DT, Mangel WF, Carroll RB. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and transformed cells. *Virology.* 1979;93: 466-480.

Nagaich AK, Zhurkin VB, Durell SR, Jernigan RL., Appella E, Harrington RE et al. p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:1875-1880.

Nakano S, Bruce SA, Ueo H, Ts'o PO. A qualitative and quantitative assay for cells lacking postconfluence inhibition of cell division: characterization of this phenotype in carcinogen-treated Syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Res*. 1982;42:3132-3137.

Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verna IM. The pCL Vector System: Rapid Production of Helper-Free, High-Titer, Recombinant Retroviruses. *J Virol*. 1996;70:5701-5705.

Nobori T, Szinai I, Amox D, Parker B, Olopade OI, Buchhagen DL, Carson DA. Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in human non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 1993;53:1098-1101.

Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21(WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer*. 2002;94:2107-2112.

Ogino A, Yoshino A, Katayama Y, Watanabe T, Ota T, Komine C et al. The p15INK4b/p16INK4a/RB1 Pathway Is Frequently Deregulated in Human Pituitary Adenomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64:398-403.

Oren M and Rotter V. (2010). Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 10.1101/cshperspect.a001107.

Pei X, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene*. 2005;24: 2787-2795

Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Nat Acad Sci*. 1974;71:1286-1290.

Paulovich AG, Toczyski D P, Hartwell LH. When Checkpoints Fail. *Cell*. 1997;88:315-321.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. (). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007;28:622-629.

Preuss U, Kreutzfeld R, Scheidtmann KH. Tumor-derived p53 mutant C174Y is a gain-of-function mutant which activates the fos promoter and enhances colony formation. *Int J Cancer*. 2000;88:162-171.

Riley T, Sontag E , Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:402-412.

Rocco JW, Li D, Liggett WH Jr, Duan L, Saunders JK Jr, Sidransky D, O'Malley BW Jr. p16 INK4a adenovirus mediated gene therapy for human head and neck squamous cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4:1696-1704.

Rosenfeld MR, Meneses P, Dalmau J, Drobnjak M, Cordon-Cardo C, Kaplitt MG. Gene transfer of wild-type p53 results in restoration of tumor-suppressor function in a medulloblastoma cell line. *Neurology.* 1995;45:1533-1539.

Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Ferson DZ, Hong WK, Komaki R, Lee JJ, Nesbitt JC, Pisters KM, Putnam JB, Schea R, Shin DM, Walsh GL, Dolormente MM, Han CI, Martin FD, Yen N, Xu K, Stephens LC, McDonnell TJ, Mukhopadhyay T, Cai D. Retrovirus-mediated wild type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nature Med.* 1996;2:985-991.

Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6:55-61.

Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys Acta rev Cancer* 1998;1378:F115-F177.

Rubin H, Yao A, Chow M. Neoplastic development: paradoxical relation between impaired cell growth at low population density and excessive growth at high density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7734-7738.

Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000;81:2573-2604.

Saegusa M, Machida BD, Okayasu I. Possible associations among expression of p14(ARF), p16(INK4a), p21(WAF1/CIP1), p27(KIP1), and p53 accumulation and the balance of apoptosis and cell proliferation in ovarian carcinomas. *Cancer.* 2001;92:1177-1189.

Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M. Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med.* 1997;3:313-319.

Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M. Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nature Med.* 1997;3:313-319.

Schwandner O, Bruch HP, Broll R. p21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis.* 2002;17:11-19.

Serrano M, Hannon G, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature.* 1993;366:704-707.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science.* 1996;274:1672-1677.

Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research.* 2000;60:3689-3695.

Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002;2:103-112.

Sherr, CJ and Roberts, JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999;13:1501-1512.

Smeds J, Berggren P, Ma X, Xu Z, Hemminki K, Kumar R. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16^{INK4a}) and p14^{ARF}) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis*. 2002;23:645-655.

Smith AE, Smith R, Paucha E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 1979;18:335-346.

Soussi T, Hjortsber L. When mutant p53 plays hide and seek: a new challenge for diagnosis and therapy? *Trends Mol Med*. 2008;15:1-4.

Soussi T, Wiman KG. Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell*. 2007;12:303-312.

Soussi T. The p53 pathway and human cancer . *Brit J Surg*. 2005;92:1331-1332.

Steiner MS, Zhang Y, Farooq F, Lerner J, Wang Y, Lu Y. Adenoviral vector containing wild-type p16 suppresses prostate cancer growth and prolongs survival by inducing cell senescence. *Cancer Gene Ther*. 2000;7:360-372.

Strano S, Dell'Orso S, Di Agostino S, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*. 2007;26: 2212-2219.

Strauss BE, Costanzi-Strauss E. Efficient retrovirus-mediated transfer of cell-cycle control genes to transformed cells. *Braz. J Med Biol Res*. 1999;32(7):905-914.

Sugimoto M, Martin N, Wilks DP, Tamai K, Huot TJ, Pantoja C, Okumura K, Serrano M and Hara E. Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21^{Cip1} and p27^{Kip1}. *Oncogene*. 2002;21:8067-8074.

Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol*. 2004;5(1):27-36.

Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E , Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny, M, Cecconi F, Tavernarakis N, Kroemer G. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy*. 2008a;4:810-814.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*. 2008b;10:676-687.

Taylor WR, Stark JR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001;20:1803-1815.

The Journal of Gene Medicine. The Journal of Gene Medicine Clinical Trial. [database]. Available from: <<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>>. Cited from: 2011 June 2011.

Tidow H, Melero R, Mylonas E, Freund SMV, Grossmann JG, Carazo JM et al. Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:12324-12329.

Vernell R, Helin K, Müller H. Identification of Target Genes of the p16INK4A-pRB-E2F Pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:46124-46137.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408:307-310.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:275-283.

Xue Q, Sano T, Kashiwabara K, Saito M, Oyama T, Nakajima T. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in stage I adenocarcinomas of the lung. *Pathol Int*. 2002;52:103-109.

Wada K. p16 and p53 gene alterations and accumulations in the malignant evolution of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9:76-85.

Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2007;8:573-587.

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994;369:574-578.

Walther W, Stein U. Viral Vectors for Gene Transfer. *Drugs*. 2000;60(2):249-271.

Weber JD et al. p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Development*. 2000;14: 2358-2365.

Whitfield ML, George LK, Grant GD, Perou CM. Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:99-106.

Worlds health organization. Cancer. Fact sheet No. 297. February 2011.

Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene*. 2004;23:2330-2338.

Yoshikawa K, Hamada J, Tada M, Kameyama T, Nakagawa K, Suzuki Y et al. Mutant p53 R248Q but not R248W enhances in vitro invasiveness of human lung cancer NCI-H1299 cells. *Biomed Res*. 2010;31:401-411.

Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24:5764-5774.

Zeimet AG, Marth C. Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *The Lancet Oncology*. 2003;4:415-422 .

Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*. 2009;1:a001883.