

# Genes supresores en el desarrollo del cáncer

Miguel A. Peinado

*Institut de Recerca Oncològica. Hospital Duran i Reynals.  
Autovía, Castelldefels km 2,7. L'Hospitalet, 08907 Barcelona.*

## 1. El cáncer

El cáncer se caracteriza por una elevada proliferación celular, la invasión de tejidos adyacentes y vasos sanguíneos, la capacidad para migrar a órganos distantes (pérdida de adherencia) y crecer allí (proceso metastásico), la apariencia atípica de las células y la alta frecuencia de mitosis. Estas características vienen dadas por alteraciones permanentes en una gran diversidad de genes que controlan la proliferación, la forma y la función de la célula. La progresión del tumor hacia estadios más malignos es un proceso de selección, en el que las células compiten por la dominancia y, por tanto, aquellas que presentan unas características más malignas son las que acabarán por predominar. Ello hace que la mayoría de los cánceres sean enfermedades irreversibles, solamente curables mediante la eliminación física de las células transformadas.

## 2. Progresión tumoral: origen clonal de los tumores y acumulación de alteraciones

Diversos estudios han podido demostrar el origen clonal de los tumores, es decir, que todas las células que componen el tumor proceden de una única

célula madre en la que se produjo el cambio iniciador (teoría clonal de Nowell).

En principio, la progresión tumoral es solo posible mediante la desregulación de múltiples genes, lo que requiere múltiples mutaciones. La célula neoplásica, dada su inestabilidad genética intrínseca, permite el desarrollo de subclones heterogéneos. Estos subclones se seleccionan a lo largo de la progresión tumoral, en función de su capacidad proliferativa y/o su mejor adaptación al microambiente en el que se hallan. Esta inestabilidad genética se refleja en forma de múltiples cambios genéticos (contenido anormal de ADN o aneuploidía, deleciones, translocaciones, amplificaciones y mutaciones puntuales) de los cuales, en muchos casos, no conocemos su origen ni sus interrelaciones, pero es un hecho que se van acumulando a lo largo de la evolución del tumor.

### **3. Causas del cáncer. Factores genéticos**

Se han descrito numerosos factores físicos, químicos y biológicos (virus) que inducen cáncer en animales y humanos. Estos factores pueden provocar cambios genéticos (mutaciones) que desencadenan los mecanismos que permiten la iniciación y la progresión de los tumores, aunque el conocimiento de estos fenómenos es todavía muy limitado.

Las primeras evidencias de la existencia de alteraciones genéticas en el cáncer vienen dadas por los estudios de cariotipo, demostrándose que la mayoría de células tumorales se caracterizan por poseer dotaciones cromosómicas anormales, tanto en lo que se refiere al número como a la disposición del material genético en los mismos (translocaciones, deleciones, amplificaciones, etc.).

La predisposición hereditaria a padecer uno o varios tipos de cáncer es bien conocida. El grado de predisposición puede variar desde familias que presentan una incidencia de cáncer ligeramente mayor a la de la población en general, hasta casos en los que la certeza de desarrollar un tipo específico de tumor es casi absoluta. La predisposición generalizada suele ser consecuencia de enfermedades genéticas que incrementan la tasa de mutación en el genoma y, consiguientemente, la frecuencia de mutaciones en genes relevantes para el proceso tumoral. La predisposición a ciertos tipos concretos de cáncer se suele relacionar con la herencia de un gen mutado e implicado en la proliferación celular. En este caso, se cree que se requiere la mutación de la segunda copia del gen (alelo) para el desarrollo del cáncer.

Las alteraciones genéticas identificadas y claramente asociadas al proceso de malignización conllevan la activación o la inactivación de la función de determinados genes a los que se denomina globalmente oncogenes. En el

caso de los oncogenes clásicos se observa un aumento en la función de las proteínas codificadas por estos, lo que resulta en un incremento del potencial proliferativo de las células portadoras de esta alteración. Un segundo tipo de oncogenes llamados comúnmente genes supresores de tumores se suelen encontrar inactivados en las células cancerosas, produciéndose una pérdida de regulación negativa de la proliferación, que es su función normal.

Las alteraciones pueden ser pequeños cambios que modifican la composición peptídica y la función de la proteína codificada por el gen afectado (por ejemplo: sustitución, deleción o inserción de un sólo nucleótido), o alteraciones mayores que afectan regiones más o menos extensas de un cromosoma (inserción, deleción, translocación, amplificación) y que condicionan la expresión y/o estructura de uno o varios genes. En algunos casos, ciertos virus son portadores de genes que inducen neoplasia (a veces han incorporado en su genoma un oncogén activado proveniente de una célula transformada, mientras que en otras ocasiones el virus dispone de proteínas propias capaces de inactivar uno o varios genes supresores de tumores), por lo que una infección por los mismos puede producir efectos similares a la alteración de genes celulares.

#### **4. Tipos de oncogenes**

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 100 genes que pueden estar implicados en el proceso tumoral. Existen múltiples clasificaciones dependiendo de la función normal del gen, del mecanismo de activación / inactivación o de la forma en que se identificaron. De acuerdo con el papel que juegan en el proceso tumoral, se puede hablar de tres tipos básicos:

##### **4.1. Genes de proliferación y crecimiento**

Son los oncogenes clásicos. La mayoría son factores de transcripción o transductores de señal. Su activación supone, en general, una ganancia de función y se suele producir mediante mutación puntual, amplificación o translocación. Ejemplos: TGF- $\beta$  (factor de crecimiento), neu (receptor de factor de crecimiento), *ras* (transducción de señal), fos (factor de transcripción).

##### **4.2. Genes supresores de tumores**

Inhiben el crecimiento y la proliferación en su forma normal. Durante el proceso tumoral se suelen inactivar por mutación puntual o deleción y, en general, se requiere la inactivación de los dos alelos (son recesivos). Muchos casos de predisposición hereditaria suelen estar ligados a este tipo de genes. Ejemplos: RB y p53 (factores de transcripción).

### **4.3. Genes de muerte celular programada**

La proteína codificada por estos genes está implicada en la inducción o el rescate de la célula de la muerte programada o apoptosis, que es un mecanismo de “suicidio” de la célula frente a determinadas situaciones críticas externas o internas, incluyendo las condiciones en las que se encuentran la mayoría de células neoplásicas. Ejemplo: BCL2 (proteína de membrana mitocondrial).

### **4.4. Genes implicados en la reparación y replicación del ADN**

Deficiencias en la fidelidad de replicación o reparación del ADN producen altas tasas de mutación, lo que, eventualmente, puede dar lugar a la transformación maligna de la célula. Ejemplo: MSH2 (enzima de reparación de apareamientos erróneos).

Cada tipo de cáncer suele presentar alteraciones en unos genes específicos. En la actualidad se considera que el gen supresor de tumores p53 es el más universal, estando inactivado en aproximadamente un 50% de los tumores humanos, aunque la incidencia es muy distinta de un tipo de cáncer a otro (frecuente en tumores de colon y mama; rara en cerebro y algunos tipos de leucemia).

## **5. Genes supresores de tumores**

Hace 20 años, diferentes experimentos en los que se fusionaron células normales con células tumorales demostraron que se revertían las características malignas en las células híbridas. Cuando algunos de los cromosomas aportados por la célula normal se perdían en el híbrido, reaparecía el fenotipo maligno. Todo ello infería la existencia de genes celulares capaces de suprimir el fenotipo transformado de las células cancerosas y que, por tanto, la pérdida o deficiencias de la función de determinados genes se asociaría a la transformación tumoral. En analogía a los conceptos de la teoría mendeliana de la herencia, esto significa que el fenotipo maligno es recesivo con respecto al normal. Estudios de citogenética y de polimorfismos mediante análisis de fragmentos de restricción del ADN confirmaron la naturaleza de estos cambios genéticos en las células tumorales. La terminología aplicada a estos genes incluye denominaciones como genes supresores de tumores, oncogenes recesivos, anti-oncogenes o genes supresores del crecimiento.

A pesar de estas evidencias que indicaban la existencia de genes supresores de tumores, sólo en los últimos años y gracias a las técnicas de biología molecular, ha sido posible aislar algunos de estos genes. Ello permite no sólo adentrarnos en el conocimiento de los mecanismos básicos del cáncer, sino que también facilita el diagnóstico y abre nuevas expectativas para el tratamiento de esta enfermedad.

Numerosos estudios de los últimos cinco años indican que la mayoría de tumores humanos son consecuencia de mutaciones que conllevan una pérdida de función y que por tanto afectan a genes supresores de tumores. Sin embargo, no parece que la función esencial de los productos de estos genes sea la supresión de la malignidad, sino que estaría relacionada con funciones normales de la célula y dentro de ello participarían en la regulación de diversos fenómenos y actividades celulares, incluyendo proliferación y crecimiento.

En la Tabla I se listan algunos de los genes supresores conocidos, aunque existen claras evidencias que indican la existencia de otros genes en varios *loci*.

**TABLA I**

Gen	Función	Cromosoma	Cáncer
P53	Factor de transcripción	17p13.1	Mama, colorrectal, gástrico, pulmón melanoma, ovario, páncreas, etc
NF1	Proteína activadora de GTPasas	17q11.2	Neurofibromatosis
WT1	Factor de transcripción	11p13	Tumor de Wilms
APC	Adhesión celular	5q21	Poliposis cólica familiar, colorrectal esporádico
MCC	?	5q21	colorrectal
DCC	Adhesión intercelular	18q21-qter	colorrectal
BRCA1	Factor de transcripción	17q	mama
BRCA2	Factor de transcripción	13q	mama
RB	Factor de transcripción	13q14.2	Retinoblastoma, pulmón, mama, sarcoma

Algunos de estos genes se asocian de forma preferente con cánceres hereditarios, como es el caso de WT1, NF1, BRCA1 y BRCA2. Otros están implicados tanto en casos familiares como esporádicos. Así por ejemplo, P53 se asocia al síndrome de cáncer hereditario múltiple de Li-Fraumeni y está frecuentemente alterada en tumores esporádicos de varios tipos, mientras que la inactivación de la proteína del gen APC mediante mutaciones puntuales o deleciones se observa tanto en la poliposis cólica familiar como en el cáncer colorrectal esporádico.

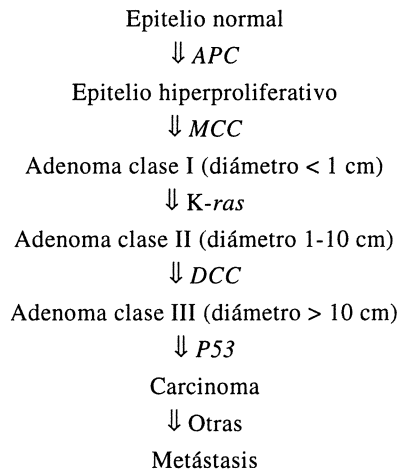
## 6. Genes supresores y cáncer colorrectal

Ante el gran número de genes implicados y la gran variedad que hay entre unos tumores y otros, se describe con mayor detalle y a modo de ejem-

plo el modelo de progresión en el cáncer colorrectal. La mayoría de tumores colorrectales progresa a través de una serie de estadios clínicos claramente reconocibles. Además, este tipo de tumor presenta una elevada incidencia y por su facilidad de acceso y tamaño ofrece ventajas en su estudio con respecto a otros tumores, lo que ha permitido que el avance en el conocimiento de los procesos genéticos que gobiernan la transformación en el cáncer colorrectal sean de los que mejor se conocen.

Basándose en múltiples estudios, en 1989 se propuso un modelo molecular de progresión en el cáncer colorrectal. Según este modelo, se requiere la acumulación de entre 4 y 6 alteraciones genéticas, y que incluyan a un oncogén (gen *c-K-ras*) y varios genes supresores tumorales (*APC* Adenomatous Polyposis Coli, *MCC* Mutated in Colon Cancer, *DCC* Deleted in Colon Cancer y *P53*).

La tumorigénesis suele ir precedida de una gran hiperproliferación celular localizada. Una o varias de estas células inicia el proceso de neoplasia (expansión clonal) formando un pequeño adenoma tubular o pólipo. Este adenoma crece en tamaño y adquiere una morfología de tipo vellosa (forma de dedo). Dentro de los adenomas se distinguen diferentes fases, relacionadas fundamentalmente con el tamaño de este. Aunque el proceso es continuo, cada una de estas fases se puede relacionar con determinadas alteraciones genéticas, tal como se aprecia el siguiente esquema:



El adenoma es un tumor benigno, pero presenta una gran heterogeneidad celular, por lo que aquellas células que tengan mejores posibilidades proliferativas se irán seleccionando y dominarán sobre sus células hermanas de cre-

cimiento más lento. Cuando una de estas células adquiere la capacidad de invadir a través de la membrana basal (traspasa la mucosa de la pared intestinal hacia las capas de tejido muscular) deviene el carcinoma, que es un tumor invasivo y, por tanto, maligno. El grado de invasión (A, B, C, D) que ha alcanzado un carcinoma es el principal parámetro utilizado para su clasificación. De forma muy resumida podemos decir que los de grado A son superficiales, grado B han llegado a la capa de tejido muscular, grado C han invadido nódulos linfáticos y grado D han producido metástasis a distancia, en el hígado preferentemente.

El carcinoma puede progresar adquiriendo la capacidad para invadir otros tejidos en la misma región (los nódulos linfáticos) o lejanos (hígado, fundamentalmente). Las masas de tejido tumoral que se han extendido a otros tejidos diferentes y distantes se conocen con el nombre de metástasis. Todo este proceso puede durar décadas.

El oncogén *c-K-ras* se activa mediante mutaciones puntuales (substitución de un nucleótido por otro que cambia el código genético y, por tanto, la secuencia de aminoácidos que compone la proteína). En el resto de genes (todos estos entran en la categoría de genes supresores de tumores), la inactivación se produce mediante el mismo mecanismo que para el oncogén *c-K-ras* (mutación puntual) o bien, por delección de un fragmento del cromosoma que incluye estos genes. Aunque las alteraciones genéticas mencionadas ocurren preferentemente en las fases indicadas, existen evidencias de que es más importante la acumulación de dichas alteraciones que el orden. Es decir, los tumores en estadios más avanzados presentan más alteraciones que los tempranos, menos invasivos.

Todavía no se conocen bien los mecanismos de acción de las proteínas codificadas por estos genes; pero se sabe que alteraciones en algunos de estos genes son buenos indicadores de mal pronóstico. Es decir, la presencia de una o varias de estas alteraciones en el tumor implica una menor probabilidad de curación para el paciente con respecto a aquellos casos que no la presentan, considerando que el resto de parámetros sean similares.

Más recientemente (en 1993), se ha descrito una segunda vía de progresión tumoral para el cáncer colorrectal y otros. Esta vía se caracteriza porque una de las primeras alteraciones genéticas que ocurre es la pérdida de la función normal de un enzima de reparación del material genético (el ADN). Ello conduce a una acumulación de decenas o cientos de miles de mutaciones en las células deficientes, por lo que múltiples genes se pueden ver afectados. Curiosamente, en estos tumores, los genes citados anteriormente en el modelo no parecen estar implicados de forma habitual. En estos cánceres, la inestabilidad genética juega un papel decisivo en la biología del tumor, que se manifiesta en un comportamiento clínico particular (son menos invasivos que el resto). Un porcentaje importante de los tumores de este tipo se producen

en individuos con predisposición hereditaria, debido a que han heredado una forma no funcional de alguno de los genes que codifican para enzimas de reparación del ADN.

## 7. Estudio molecular del cáncer

Aunque la biología molecular se ha aplicado al estudio del cáncer desde sus inicios, no fue hasta finales de los años 80 cuando se produjo una auténtica revolución en el estudio de los oncogenes. Ello fue posible gracias a la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida generalmente como PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica permite aumentar, en un orden de millones de veces, el número de copias de un fragmento de material genético (esto incluye ADN y ARN mensajero). Una vez se amplifica por PCR este fragmento (que puede corresponder a un oncogén) se puede acceder fácilmente a la información en él contenida. Por lo que la detección de pequeños cambios es posible en un gran número de muestras (por ejemplo, es posible detectar un cambio que afecta a un solo nucleótido a partir de una muestra que contiene una secuencia de 3.000.000.000).

Otros métodos, como el fingerprinting de ADN mediante la amplificación de secuencias arbitrarias por la reacción en cadena de la polimerasa (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction o AP-PCR) posibilitan la detección, en un solo experimento, de múltiples cambios acaecidos en el genoma de la célula tumoral, por lo que presentan un gran potencial en el estudio molecular del cáncer. Con esta técnica se obtiene una “huella” que resulta de la composición y disposición del material genético, por lo que es característica de cada individuo y también del genoma de la célula tumoral.

Estas técnicas solo son un pequeño ejemplo de la infinidad de metodologías empleadas para estudiar la genética del cáncer. Para llegar a resultados concluyentes, en general se requiere la utilización de varias técnicas complementarias, que incluyen estudios genéticos, bioquímicos, morfológicos y biológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

## 8. Utilidad de los estudios genéticos en el cáncer

La detección precoz, la cirugía y la utilización de la radioterapia y la quimioterapia han mejorado considerablemente el índice de curación de numerosos tipos de cáncer. Sin embargo, todavía existe una alta proporción de tumores que provocan la muerte del paciente. Aunque últimamente se han realizado esperanzadores avances, la gran cantidad y variedad de factores implicados en el cáncer hacen difícil mejorar a corto plazo el índice de curación de la mayoría de tumores.



Recientes progresos en el conocimiento de la biología molecular del cáncer, nos permiten la identificación inequívoca de algunos casos en los que existe un componente hereditario importante, con lo cual es posible determinar la predisposición a padecer cáncer en diferentes miembros de la misma familia. Ello implica la posibilidad de incrementar las exploraciones que permitan el diagnóstico precoz en aquellos casos con altas probabilidades de padecer cáncer y reducirlas cuando el riesgo sea mínimo. Diversos grupos trabajan en el desarrollo de técnicas que permitan reemplazar el gen defectivo en los individuos afectados, lo que evitaría la aparición de los tumores o, en el peor de los casos, la probabilidad de desarrollarlo.

El conocimiento de las alteraciones moleculares implicadas en la iniciación y progresión tumoral debe contribuir a comprender la biología de la célula tumoral. Ello facilitará el diagnóstico y mejorará la clasificación de los tumores, por lo que la utilización de nuevos marcadores de pronóstico permitirá una mayor confianza en la aplicación de tratamientos coadyuvantes. Además, será posible diseñar nuevas estrategias terapéuticas más específicas, más eficaces y menos agresivas, ya que estarán únicamente dirigidas hacia aquellas funciones de la célula que son relevantes en el comportamiento biológico de cada tipo de cáncer.

## 9. Bibliografía

1. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH (1993). Apoptosis and necrosis - basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117:1208-1214.
2. Brown DG, Sun XM, Cohen GM (1993). Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J. Biol. Chem.* 268:3037-3039.
3. Oberhammer F, Wilson JW, Dive T et al. (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12:3679-3684.
4. Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
5. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136:593-608.
6. Stewart BW (1994) Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular functions. *J. Natl Cancer Inst.* 86:1286-1296.

7. Golstein P, Ojcius DM, Young JD (1991) Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 121:29-65. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356:494-499.
8. Oppenheim RW (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501.
9. Raff MC (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.
10. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700.
11. Schwartz LM, Kosz L, Kay BK (1990). Gene activation is required for developmentally programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6594-6598.
12. Vaux DL, Haecker G, Strasser A (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76:777-779.
13. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
14. Martin DP, Schmidt RE, DiStefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM (1988). Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell Biol.* 106:829-844.
15. Comella JX, Sanz-Rodriguez C, Aldea M, Esquerda JE (1994). Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program in vitro. *J. Neurosci.* 14:2674-2686.
16. Steller H (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449.
17. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC (1994). Programmed cell death and *bcl-2* protection in absence of a nucleus. *EMBO J.* 13:1899-1910.
18. Klein R (1994). Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J.* 8:738-744.
19. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-698.
20. Ellis HM, Horvitz HR (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 44:817-829.

21. Avery L, Horvitz HR (1987). A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant. *Cell* 51:1071-78.
22. Yuan JBB, Horvitz HR (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev. Biol.* 138:33-41.
23. Hengartner MO, Horvitz HR (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene *bcl-2*, *Cell* 76:665-676.
24. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 75:641-652.
25. Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Coperland NG, Jenkins NA (1994) Induction of apoptosis by the mouse *Nedd2* gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and mammalian IL-1 $\beta$ -converting enzyme. *Genes Dev.* 8:1613-1623.
26. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan JY (1994). *Ich-1*, an ICE/*ced-3* related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78:739-750.
27. Fernandez-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein *Ced-3* and mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme. *J. Biol Chem.* 269:30761-30764.
28. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995). Yama/ CPP32b, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809.
29. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Mollineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding JF, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin T, Lee TD, Shively JE, MacCross MM, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* 356:768-774.
30. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75:653-660.

31. Gagliardini V, Fernandez P-A, Lee RKK, Drexler HCA, Rotello R, Fishman MC, Yuan J (1994). Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* 263:826-828.
32. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan JY (1994). Ich-1, an ICE/ced-3 related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78:739-750.
33. Tewari M, Dixit VM (1995). Fas- and TNF-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 270:3255-3260.
34. Shi L, Nishioka WK, Th'ng J et al. (1994). Premature p34cdc2 activation is required for apoptosis. *Science* 262:1143-1145.
35. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76:977-987.
36. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53:3976-3985.
37. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347.
38. Tsujimoto Y, Cossman E, Jaffe E, Croce CM (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443.
39. Strasser A, Harris AW, Cory S (1991). bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67:889-899.
40. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (1988). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258:1955-1957.
41. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou J-C (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by bcl-2 proto-oncogene. *Science* 258:302-304.
42. Allsop TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM (1993) The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 73:295-307.
43. Cuende E, Ales Martinez JE, Ding LY, Gonzalez Garcia M, Martinez-A C, Nuñez G (1993). Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B-lymphoma cells. *EMBO J* 12:1555-1560.

44. Miyashita T, Reed JC (1992). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Cancer Res.* 52:407-5411.
45. Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, Castle VP (1994). Bcl-2 nhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res.* 54:3253-3259.
46. Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ (1994) bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 120:301-311.
47. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ (1993). bcl-2 -deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229-240.
48. Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Shinkai Y, Louie I, Fields LE, Lucas PJ, Stewart V, Alt FW, Loh DY (1993). Disappearance of the lymphoid system in bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 261:1584-1588.
49. Yin X-M, Oltvai Z, Korsmeyer SJ (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369:321-323.
50. Nuñez G, Clarke MF (1994) The bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends in Cell Biol* 4:399-403.
51. Korsmeyer SJ (1995). Regulators of cell death. *Trends in Genetics* 11:101-105.
52. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Posteme CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB (1993). bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.
53. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, Loh DY (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267:1506-1509.
54. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619.
55. Miyashita T, Reed JC (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299.

56. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* 54:3131-3135.
57. Farrow SN, White JHM, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, Martinou JC, Brown R (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374:731-733.
58. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374:733-736.
59. Klefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ (1995) Modulation of apoptosis by widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374:736-739.
60. Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80:279-284.