

사람 폐암세포주에서 p53 종양억제유전자의 변이

원자력 병원 내과, 임상병리과, * 암 연구부**

홍원선 · 홍석일* · 이동순* · 손영숙** · 이춘택

= Abstract =

Mutations of p53 Tumor Suppressor Gene in Human Lung Cancer Cell Lines

Weon-Seon Hong, M.D., Seok-Il Hong, M.D.,* Dong-Soon Lee, M.D.*

Youngsook Son, Ph.D.** and Choon-Taek Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Clinical Pathology* and Medical Research Division,**
Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Background: Recent advancement of molecular genetics has revealed that malignant transformation of a cell may be a complex multistep process and this process is grouped, in general, into two distinct categories, activation of protooncogenes and inactivation of tumor suppressor genes. This study was focused on the mutation of p53 tumor suppressor gene, because p53 gene mutation is now generally accepted to be one of the most frequent genetic changes in a variety of human cancers. Although lung cancer is one of the common cancers in Korea, the genetic change in the carcinogenesis process is not yet known clearly. To investigate the role of p53 gene mutation in lung cancer, we examined the mutations of exon 4-8 of the p53 gene in human lung cancer cell lines, because most of the mutations of p53 gene have been reported to develop in exon 4-8.

Method: Genomic DNA was obtained by the digestion of proteinase K and the extraction by phenol-chloroform-ethanol method from two human pulmonary adenocarcinoma cell lines, PC-9 and PC-14, and one human small cell lung cancer cell line, H69. To detect the mutations of exon 4-8 of the p53 gene, polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis was performed with the DNA extracted from the cells.

Results: The mutation of p53 gene was present in all three cell lines tested. In PC-9, PC-14 and H69, the altered mobility was detected in exon 7, 7 and 5, respectively.

Conclusion: These results suggest that p53 gene mutation plays an important role in certain steps of the carcinogenesis of human non-small cell and small cell lung cancer.

Key Words: Human lung cancer cell lines, p53 gene mutation, PCR-SSCP

서 론

1985년 Saiki 등¹⁾에 의하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)이 보고된 이래 PCR은 각종 분자유전학(molecular genetics)연구의 핵심적 기술이 되었다. 발암분야에 있어서도 PCR을 응용하여 유전자 차원에서의 연구가 활발히 진행되었는

데, 현재까지 축적된 발암과정에 대한 지식을 종합하면 인간에 발생하는 암의 대부분은 다단계로 발생(multi-step carcinogenesis)하며 각 단계에서의 체세포 변화는 특정 유전자 또는 유전자들의 이상(aberration)에 의하여 일어나는 현상이 점차 명확해 지고 있다. 이러한 발암과정에는 다수의 유전자들의 관여하고 있음이 확인되고 있는데, 발암과정에서의 유전자의 변이는 암유전자(oncogene)의 활성화와 종양억제 유전자(tumor

suppressor gene)의 비활성화로 크게 구분된다. 그런데 최근 발암과정에 있어 종양억제 유전자의 역할이 규명됨에 따라 종양억제 유전자의 비활성화는 대다수의 고형암에서 불가피한 과정으로 인식되게 되었으며, 종양억제 유전자의 비활성화는 유전자의 결손(deletion)이나 변이(mutation) 등의 원인으로 발생됨이 밝혀졌다^{2~5)}.

종양억제 유전자로 현재까지 보고된 유전자로는 Rb 유전자^{6,7)}, p53 유전자^{8~11)}, WT 유전자¹²⁾, DCC 유전자¹³⁾와 Krev-1 유전자¹⁴⁾가 있는데, 이중 정상 p53 단백질은 암으로 형질전환을 억제하는데 반하여, p53 변이 유전자 산물은 다른 암유전자의 변이와 함께 작용하여 정상세포를 암세포로 형질전환시킬 수 있고, 빈도의 차이는 있으나 대부분의 암에서 변이의 존재가 확인되어, p53 유전자의 변이는 현재 인간의 암발생에 가장 중요한 역할을 하고 있는 종양억제 유전자로 인정되고 있다^{5,10~18)}.

근자에 이르러 단시간에 특정 유전자만을 대량 증폭시킬 수 있는 PCR법과 점돌연변이(point mutation)와 같은 미세한 유전자 변이를 극히 예민하고 정확하게 검출할 수 있는 single-strand conformation polymorphism (SSCP) 분석법이 개발되어 이 두 방법을 접목한 PCR-SSCP 분석법을 사용하면 발암에 관계하고 있는 유전자들의 변이를 비교적 단시간내 정확히 측정할 수 있게 되었다^{19,20)}.

폐암은 우리나라에서 흔히 발생하는 암종의 하나로 최근 발생빈도가 증가하여 대책이 요구되는 암이나 폐암 발생에 있어 분자생물학적 과정은 아직 명확히 규명되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 p53 유전자의 변이와 폐암과의 관계를 연구하고자 사람 폐암 세포주를 대상으로 p53 유전자중 돌연변이가 자주 발생하는 영역으로 알려진 exon 4-8 영역의 변이여부를 PCR-SSCP 법으로 연구하였다

대상 및 방법

1. 세포주

본 연구에서는 2종류의 사람 폐선암(pulmonary adenocarcinoma) 세포주인 PC-9와 PC-14 그리고 1종류의 사람 소세포폐암(small cell lung cancer) 세포주인 H69를 대상으로 하였는데 이들 세포는 RPMI-1640 배지(Gibco, USA)에 55°C에서 30분간 열처리한 10%

fetal bovine serum (Gibco), 100 U/ml의 penicillin과 100 µg/ml의 streptomycin이 첨가된 배양액 속에서 37°C, 5% CO₂ 부란기(incubator)에서 배양하였다.

2. DNA 분리

1×10⁸ 세포를 STE (150 mM tris, 1 mM EDTA, pH 7.2) 1.9 ml에 부유시킨 뒤 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) 100 µl를 가하여 혼합하고 실온에서 약 15분간 방치하여 세포를 용해하였다. Proteinase K (Sigma, USA)를 100 µg/ml 농도가 되게 첨가하여 37°C에서 12시간 동안 반응시켜 단백질을 소화시킨 뒤 동량의 phenol을 가하여 5분간 강하게 혼합하고 원침하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 동량의 chloroform: isoamyl alcohol (49:1)을 넣고 5분간 강하게 혼합한 뒤 원침하여 상층액을 취하여 단백질을 제거하였다. 채취한 상층액에 1/10 용량의 2 M sodium acetate (pH 5.5)를 가하여 혼합하고 동량의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 전혀 75% ethanol로 세척하고 2분간 건조한 뒤 TE (Tris 10 mM, 1 mM EDTA, pH 7.2) 용액에 다시 용해하였다. 분리된 DNA는 분광광도계를 사용하여 260 nm와 280 nm에서 측정된 흡광도비(A260/A280)가 1.8 이상임을 확인한 뒤 실험하였다²¹⁾.

3. PCR-SSCP

PCR-SSCP 분석법은 Orita 등이 보고한 방법^{19,20)}을 조금 변형하여 사용하였는데, 분리한 genomic DNA중 p53 유전자의 exon 4에서 8까지의 영역을 Gene Amp Kit (Perkin-Elmer Cetus, USA)를 사용하여 증폭시켰다. 본 실험에서 PCR을 위하여 사용한 exon 4-8까지의 primer의 oligonucleotide sequence는 Table 1에 기술하였다²²⁾. PCR 반응을 위하여 100 ng의 DNA에 1 µg의 DMSO, 4종류의 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 혼합액 4 µl(200 µM), 각 exon에 대한 primer 20 pmol, 0.5 U의 Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus, USA), 10×PCR 반응완충용액 (50 mM KCl, 1, 25 mM MgCl₂, 0, 2 mg/ml, 10 mM Tris, pH 8.4)과 0.1 µCi의 [³²P]-dCTP (3,000 Ci/nmol, Amersham, UK)를 넣고 증류수로 50 µl가 되도록 첨가하여 잘 섞은 뒤 PCR 도중 반응액의 증발방지를 위하여 mineral oil을 한 방울을 증충하고 95°C에서 5분간 전처리 하였다. PCR 반

Table 1. The Oligonucleotide Primers Used to Amplify the Exons of the p53 Gene in Polymerase Chain Reaction

exon	Location	PCR product(bp)	Upstream	Downstream
exon 4	3-125	293	ATCTACAGTCCCCCTTGCCGG	CAACTGACCGTGCAAGTTCA
exon 5	12-201	325	TTCTCTTTCCTGCAGTACTC	GCAAATTTCTTCCACTCGG
exon 6	179-224	236	ACCATGAGCGCTGCTCAGAT	AGTTGCAAACCAGACCTCAG
exon 7	225-261	139	GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC	CAAGTGGCTCCTGACCTGGA
exon 8	262-331	330	CCTATCCTGAGTAGTGGTAA	CCAAGACTTAGTACCTGAAG

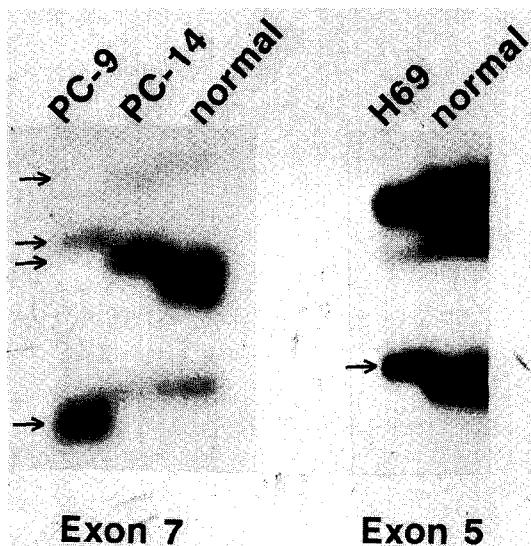


Fig. 1. RCR-SSCP analysis for exon 5 and 7 of the p53 gene which showed the altered mobility in human pulmonary adenocarcinoma cells, PC-9 and PC-14 and human small cell lung cancer cells, H69. Arrows indicate the mobility shifted bands.

용은 DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer, USA)를 사용하였는데, denaturation은 94°C에서, annealing은 62°C에서, extension은 72°C에서 각각 1분간씩 35 cycle을 한 후 extension이 충분하도록 72°C에서 7분간 더 반응을 시켰다. 이렇게 얻어진 PCR 산물의 mineral oil를 제거한 뒤 SSCP 분석을 하였다. PCR 산물 1 μl를 0.1%의 SDS와 10 mM의 EDTA가 포함된 4 μl의 완충액과 5 μg의 Dye 용액을 혼합한 뒤 95°C에서 5분간 가열하고 ice bath에 넣었다. 6% nondenaturing polyacrylamide gel을 1,000 volt에서 20분간 prerun시킨 뒤 lane당 2.5 μl씩 분주하고 1,000 volt에서 약 3시간 동안

전기영동하였는데 전기영동 도중 gel의 온도를 일정하게 하기 위하여 gel판을 선풍기로 냉각하였다. 3M filter paper를 이용하여 gel을 gel판으로부터 분리하여 gel 건조기에서 2시간 동안 건조시켰다. X-ray 필름 카세트에 필름과 건조된 gel을 넣고 -70°C에서 약 24시간 자기방사기록(autoradiography)을 한 뒤 자동현상기로 현상하여 정상 폐조직의 DNA와 비교하여 전기영동 이동변화(electrophoretic mobility shift)를 검사하였다.

결 과

사람 폐선암세포주인 PC-9와 PC-14 그리고 사람 소세포폐암 세포주인 H69를 대상으로 p53 유전자중 exon 4-8에 대한 유전자 변이를 PCR-SSCP로 분석하였다. PC-9와 PC-14에서는 exon 4, 5, 6 및 8에서, H69에서는 exon 4, 6, 7 및 8에서는 변이가 관찰되지 않았다(data not shown). 그런데 PC-9와 PC-14는 exon 7에서 H69는 exon 5에서 전기영동상 이동변화가 관찰되어 이 영역에 유전자 변이가 있음이 인정되었다(Fig. 1).

고 찰

발암은 다단계로 발생하며, 각 단계의 진행은 암유전자의 활성화 또는 종양억제 유전자의 기능소실이 중요한 역할을 하고 있음이 많은 종류의 암세포를 대상으로 수행된 연구에서 강력히 시사되었는데, 현재까지 규명된 종양억제 유전자중에는 염색체(chromosome) 17 p 13.1 영역에서 존재하는 p 53 유전자의 변이가 인간의 암발생에 가장 흔하게 발생하는 유전자 변이중 하나로 밝혀졌다^{5,15,18}. 이러한 p53 유전자는 이 유전자가 code하여 생산하는 p53 단백질이 DNA 바이러스의 일종인

Simian virus 40 (SV 40)의 large tumor (T) 항원과 결합하는 단백질로 발견되었다^{8,9)}. p53 유전자는 처음에는 우성(dominant)으로 작용하는 암유전자로 생각되었으나 정상 p53 유전자 산물은 세포가 암유전자의 활성화에 의하여 암으로 형질전환되는 것을 억제하고, p53 유전자의 변이가 발생하여 p53 단백질이 생산되지 않거나 변이된 단백질이 생산되면 암으로 형질전환이 되는 경우가 보고되어 현재 p53 유전자는 종양억제 유전자임이 명백해졌다^{16,17)}.

정상세포에서의 p53 유전자 기능은 아직 확실히 규명되지는 않았으나 DNA 복제과정중 유전자 전사를 제어하여 세포의 분열과 성장을 억제하는 유전자의 일종으로 추측되고 있다. 이러한 기전에 대하여 Mercer등²³⁾은 G1기 후기부터 S기 전반에 출현하여 DNA polymerase δ 의 cofactor로 작용하는 proliferating-cell nuclear antigen (PCNA)을 억제하여 발생한다고 하였으며 Milner등²⁴⁾은 G1기에 cdc2 kinase에 의하여 유도되는 p53 단백질의 인산화가 PCNA 합성을 자극하여 세포를 G1기에서 S기로 유도하여 세포주기를 조절한다고 보고하였다. 한편으로는 세포내 p53 단백질의 증가는 세포의 apoptosis를 유도하는 방법으로 세포성장에 관여한다는 보고가 있다²⁵⁾.

따라서 이러한 p53 유전자에 변이가 발생하면 세포는 증식억제 기능에 장애를 초래하여 암세포로 형질전환되는 것으로 추측하고 있다. 그런데 p53 유전자는 열성으로 작용하기 때문에 기능이 소실되려면 두 allele에 모두 장애가 일어나야 하는데, p53 유전자의 변이의 전형적인 타입은 한 allele의 소실과 나머지 allele의 돌연변이로 밝혀졌다^{15,18,26)}. 그리고 p53 유전자 변이중 80%는 1염기 치환의 점돌연변이이고 나머지는 수십 염기의 손실이나 삽입인 frameshift 변이다. 점돌연변이중 90%는 아미노산 치환을 수반하는 missense 돌연변이이며 나머지 10%는 정지 codon을 만들던가 splicing에 이상을 가져오는 intron 영역의 변이로 생각되고 있다. 따라서 인간의 암에 있어 p53 유전자 변이중 70%는 아미노산 1개만이 다른 단백질을 만든다. 그런데 이와같이 p53 유전자에 변이가 생기어 p53 단백질이 생산되지 않거나 변이된 단백질이 생산되면 세포주기에 영향을 미쳐 암으로 형질전환을 촉진시키는 것으로 생각된다⁵⁾.

사람의 p53 유전자는 11개의 exon으로 구성되어 있으며 exon 2의 5' 말단부로부터 code하여 393개의 아미

노산으로 구성된 p53 단백질을 생산한다. 그런데 여러 동물에서의 p53 단백질의 아미노산 배열을 비교해보면 아미노산 배열이 고도로 보존되어 있는 domain I-V가 있는데 이중 domain II-V 영역은 exon 4에서 exon 8까지의 영역에 분포되어 있음이 밝혀졌다²⁷⁾. 이렇게 여러 종사이에 고도로 보존되고 이는 영역이 존재하고 있는 것은 이 영역이 기능적 측면에서 매우 중요한 부위임을 시사하고 있는 것이며, 실제로 P53 유전자의 변이는 주로 exon 4-8 부위에 집중적으로 발생하고 있는 것이 밝혀졌다.

Nigro등¹⁶⁾과 Takahashi등¹⁸⁾은 폐암을 포함한 여러 종류의 암에서 p53 유전자의 변이는 주로 exon 5-8 사이에서 발생한다고 보고하였으며, Mitsudomi등²⁸⁾은 77개의 비소세포 폐암 세포주중 57개(74%)에서 p53 유전자의 변이가 발견되었으며, 이러한 염기의 돌연변이는 codon 35-298에 분포되어 있었는데 이부위는 exon 4-8에 해당되는 부위로 exon 4가 9%, exon 5가 23%, exon 6이 16%, exon 7이 16%, exon 8이 25%라고 보고하였다. 이러한 결과를 근거로 본 연구에서는 3개의 사람 폐암 세포주를 대상으로 p53 유전자중 exon 4에서 exon 8까지의 변이를 연구하였는데 저자들이 조사한 바로는 아직까지 PC-9와 PC-14에서의 p53 유전자의 변이는 보고되지 않았다. 소세포폐암 세포주인 H69에서는 p53 유전자의 mRNA가 정상세포에 비하여 감소하였다는 보고가 있는데¹⁸⁾, 본 연구에서는 전기영동상 exon 5에 뚜렷한 이동변화가 관찰되었다.

본 연구에서는 PCR-SSCP 방법을 사용하였는데, PCR-SSCP 방법은 특정 DNA만을 선택적으로 대량 증폭시켜 그 결과 얻어진 DNA를 비변성(nondenaturation) 상태에서 전기영동을 하여 유전자 변이를 검출하는 획기적인 방법이다^{19,20)}. 이 방법은 전기영동시 DNA의 이동은 DNA의 크기, gel 농도, 전기영동시 이온농도, 전압과 영동시간등 요인 이외에 염기 서열에 수반되어 발생하는 유전자의 고차원적 구조(conformation)에 변화가 생기면 전기영동시 DNA의 이동속도에 변화가 생긴다는 특성을 이용하여 DNA 염기 이상을 검출하는 방법으로 유전자중 1개의 염기가 변화하는 것과 같은 미세한 변이도 비교적 짧은 시간내 예민하고 정확하게 검출할 수 있는 방법이다. 본 연구의 결과 대상으로 하였던 3개의 세포주 모두에서 p53 유전자의 변이가 관찰되었는데, 이는 p53 유전자의 변이가 폐암의 발암과정과

관계가 있음을 시사하는 소견이라 사료된다. 그런데 기존의 보고들을 종합할 때 암의 종류와 암세포의 특징에 따라 발현율에 차이가 있는 이유와 p53 유전자의 변이가 세포성장, 전이 및 예후등에 미치는 영향에는 상반된 보고가 많아 이 점을 명확히 규명하려면 좀 더 광범위한 연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

연구배경: 최근 분자유전학의 진보로 인하여 암은 다 단계의 복잡한 과정을 거쳐 발생됨이 밝혀졌으며, 이러한 단계는 크게 암유전자의 활성화와 종양억제 유전자의 비활성화로 구분하게 되었다. 본 연구는 p53 종양억제 유전자에 대하여 연구하였는데, 이는 p53 유전자의 변이는 현재까지 밝혀진 종양억제 유전자중 가장 광범위한 종류의 암에서 변이가 확인되고 있기 때문이다. 폐암은 우리나라에서 비교적 흔한 암이나 분자유전학적 발암기전은 아직 불분명하다. 본 연구에서는 폐암 발생에 있어 p53 유전자의 역할을 연구하고자 사람 폐암세포주를 대상으로 p53 유전자중 변이가 높은 비율로 발생하는 영역으로 알려진 exon 4-8에 대한 유전자 변이를 연구하였다.

방법: 사람 폐선암 세포주인 PC-9와 PC-14 그리고 사람 소세포폐암 세포주인 H69를 대상으로 proteinase K에 의한 소화와 phenol-chloroform-ethanol 방법으로 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 p53 유전자중 exon 4-8 영역에 대한 primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 하여 각 exon에 대한 DNA를 증폭시킨 뒤 single strand conformation polymorphism (SSCP) 방법으로 전기영동과 자기방사 기록을 하여 전기영동상 이동변화를 관찰하여 변이를 연구하였다.

결과: 사람 폐선암세포주인 PC-9와 PC-14에서는 exon 7에, 사람 소세포폐암 세포주인 H69에서는 exon 5에서 전기영동상 이동변화가 관찰되어 이 영역에 p53 유전자 변이가 있음이 인정되었다.

결론: 대상으로 하였던 3종류의 사람 폐암세포주 모두에서 p53 유전자의 변이가 확인된 것은 p53 종양억제 유전자의 변이가 비소세포 및 소세포 폐암 발생에 중요한 역할을 하고 있음을 시사하는 소견으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 원자력 연구 개발 중장기과제 연구비의 보조로 이루어졌음.

REFERENCES

- 1) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Aruhein N: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350, 1985
- 2) Bishop JM: The molecular genetics of cancer. *Science* **235**:305, 1987
- 3) Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759, 1990
- 4) Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogene, antioncogenes. *Cancer Res* **45**:1437, 1985
- 5) Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* **351**:453, 1991
- 6) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**:643, 1986
- 7) 이춘택, 김창민, 조재일, 심영목, 홍원선, 이진오, 강태용: 비소세포암에서의 망막모세포종유전자의 소실, 결핵 및 호흡기질환: **40**:98, 1993
- 8) Linzer DIH, Levine AJ: Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**:43, 1979
- 9) Lane DP, Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**:261, 1979
- 10) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**:1083, 1989
- 11) Kim J-H, Takahashi T, Chiba I, Park J-G, Birrer MJ, Roh JK, Lee HD, Kim J-P, Minna JD, Gazda AF: Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. *J Natl Cancer Inst* **83**:938, 1991
- 12) Rose EA, Glaser T, Jones C, Smith CL, Lewis WH, Call KM, Minden M, Champagne E, Bonetta L, Yeger H, Housman DE: Complete physical map of

- the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* 60:495, 1990
- 13) Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Linzler KW, Vogelstein B: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49, 1990
 - 14) Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki t, Ikawa Y, Noda M: A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56:77, 1989
 - 15) Nigro JM, Baker SJ, Presinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstain B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342:705, 1989
 - 16) Hinds P, Finlay C, Levine AJ: Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation *J Virol* 63:739, 1989
 - 17) Lane DP., Benchimol S: p53: Oncogene or anti-oncogen. *Genes Dev* 4:1, 1190
 - 18) Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246:491, 1989
 - 19) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T and Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874, 1989
 - 20) Orita M, Iwhana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2766, 1989
 - 21) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. pp 9, 17, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
 - 22) Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP: A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* 70:245, 1988
 - 23) Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E, Ullrich SJ: Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. *Proc Natl Acad Sci, USA* 88:1958, 1991
 - 24) Milner J, Cook A, Mason J: p53 is associated with p34cdc2 in transformed cells. *EMBO J* 9:2885, 1990
 - 25) Yonish-Rouach E, Grunwald D, Wilder S, Kimchi A, May E, Lawrence J-J, May P, Oren M: p53-mediated cell death: Relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 13:1415, 1993
 - 26) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup M, VanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217, 1989
 - 27) Soussi T, de Fromental CC, May P: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5:945, 1990
 - 28) Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone DD, Amico D, Bodner S, Oie HK, Linoila RI, Mulshine JL, Minna JD, Gazda AF: p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* 7:171, 1992