

유방암에서 현미 부수체 불안정성(Microsatellite Instability)의 발현이 예후에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 ¹연세암센터, ²연세 암연구소,
³내과학교실, ⁴병리학교실, ⁵외과학교실

이화영^{1,2,3} · 전성실² · 공수정^{1,2,3} · 박준오^{1,2,3} · 안중배^{1,2,3}
심광용^{1,2,3} · 라선영^{1,2,3} · 유내춘^{1,2,3} · 양우익⁴ · 김주항^{1,2,3}
노재경^{1,2,3} · 이경식⁵ · 김병수^{1,2} · 정현철^{1,2,3}

Microsatellite Instability Correlate with a Prognosis in Breast Cancer

Hwa Young Lee, M.D.^{1,2,3}, Chengshi Quan, M.D.², Soo Jung Gong, M.D.^{1,2,3}
Joon Oh Park, M.D.^{1,2,3}, Joong Bae Ahn, M.D.^{1,2,3}, Kwang Yong Shim, M.D.^{1,2,3}
Sun Young Rha, M.D.^{1,2,3}, Nae Choon Yoo, M.D.^{1,2,3}, Woo Ick Yang, M.D.⁴
Joo Hang Kim, M.D.^{1,2,3}, Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2,3}, Kyong Sik Lee, M.D.⁵
Byung Soo Kim, M.D.^{1,2} and Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}

¹Yonsei Cancer Center, ²Yonsei Cancer Research Institute,
³Department of Internal Medicine, ⁴Pathology, ⁵General Surgery,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Microsatellite instability in patients with defects in the mismatch repair system resulting in RER has a high risk of accumulating mutations in oncogene and tumor suppressor gene. In this study, we evaluated the incidence of microsatellite instability in breast cancer by comparing PCR-amplified sequences from frozen samples of normal and tumor tissue from affected patients. We also investigated whether RER was associated with TGF- β RII mutation.

Materials and Methods: Fifty surgically resected breast cancer specimens from Jan. 1996 to June, 1997 were used for study. Microsatellite instability(referred to as replication error, RER) at three loci with BAT 26, BAT 40, TA10 was analyzed by polymerase chain reaction and the results were compared with clinicopathologic characteristics.

Results: Of the 50 breast cancer patients, 14(28%) were RER(+) at one or more microsatellite loci, and 4(8%) showed TGF- β RII mutation. Microsatellite instability was significantly correlated with lymph node involvement(especially in case of 4 or more lymph nodes involvement). But we could not find any correlation between RER and other prognostic factors including tumor size, tumor grade, hormone receptor status and pathology. One of fourteen tumors with RER(+) showed TGF- β RII mutation. There was no significant correlation between RER(+) and TGF- β type II receptor gene mutation.

Conclusion: The findings suggest that microsatellite instability would be useful prognostic factor in unilateral breast cancer patients, and the role of targeting to gene mutation will be explored in future studies.

Key Words: Breast cancer, Microsatellite instability, Replication error, TGF- β , TGF- β RII

책임저자 : 이화영, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 연세 암센터, 120-752
본 연구는 1997년도 연세대학교 의과대학 일반과제(강사) 연구비에 의하여 이루어 졌음.
접수일 : 1998년 4월 9일, 게재승인일 : 1998년 6월 18일

현미부수체 불안정성의 역할을 조사하였다.

서 론

유방암을 비롯한 인체 고형암이 발생하기까지는 다단계 과정을 거친다(1~3). 유방암에서는 유방의 정상 상피 세포가 악성 유방암 세포로 전환되기 위해 수개의 유전적 변화가 요구되어지는 반면(4) 정상 세포에서는 이러한 복합적인 유전자 결합이 소수에서만 관찰된다. 이와 같은 사실은 정상 세포에 존재하는 유전자 결합을 감지하고 교정하는 기능이 저하함으로써 세포가 악성화 하는 암 발생 이론과 일치한다(5).

세포 주기를 조절하는 유전자의 돌연변이나 (6,7) 유전자 결합교정 능력을 갖는 DNA mismatch repair(MMR) 유전자의 돌연변이는 광범위한 유전자 변화를 초래하게 된다(8,9). 즉, DNA 복제 안정성을 유지하려는 MMR 유전자의 돌연변이는 염기의 삽입, 탈락, 치환과 같은 염기 서열의 변화를 초래한다. 한편 MMR 유전자의 결합은 단순 염기 서열의 반복 즉 현미부수체(microsatellite)의 변화로서 표현되기도 하는데 이러한 현상을 현미부수체 불안정성(microsatellite instability : MI) 또는 복제 오류 형태(replication error phenotype : RER)라고 한다(10~12). 현미부수체 불안정성은 가족성 비용종성 대장암(HNPCC) 환자에서 최초로 보고된 이래(13) 유방암을 포함한 여러 악성 종양에서 보고되었다(14~18). 이러한 유전적 불안정성은 세포의 악성화를 촉진시키며 발현된 환자에서 보다 불량한 예후(19,20) 및 무병 생존율의 감소 등이 보고되었다(21). 현미부수체 불안정성은 이차적으로 종양 억제 유전자의 결합을 유도하기도 하며, 이와 같은 DNA 교정 결합이 TGF- β 제 2형 수용체 유전자의 돌연변이와 일정하게 연관되어 있음이 TGF- β 제2형 수용체를 비활성화 시키는 체세포 돌연변이를 발견함으로써 확인되었다(22~24).

본 연구에서는 유방암 환자에서 현미부수체 불안정성의 발현 빈도를 측정하고, 기존의 예후 인자와의 관련성을 분석하여 암의 발생 기전에서

재료 및 방법

1) 유방 조직 채취 및 DNA 추출

1996년 1월부터 1997년 6월까지 연세대학교 의과대학 부속 연세의료원 및 연세 암센터에서 유방암으로 수술받은 환자들 중 수술 후 동결된 정상 유방 및 유방암 조직의 보관 상태가 양호한 50예를 연구 대상으로 하였다. 냉동 보관된 유방암 조직 및 정상 유방 조직으로부터 QIAamp Tissue Kit(QIAGEN, Chertworth, CA)을 사용하여 genomic DNA를 분리하여 실험을 진행하였다.

2) 현미부수체 불안정성 측정

100 ng/ μ l의 genomic DNA는 10 ng의 γ^{32} P]ATP로 label된 BAT 26, BAT 40의 forward primer(BAT 26:5'-TGACTACTTTTGACTTCAGC-3', BAT 40:5'-ACAACCCTGCTTTTGTTCCT-3')와 150 ng의 reverse primer(BAT 26:5'-AACCATTC AACATTTT-AACCC-3', BAT 40:5'-GTAGAGCAAGACCACCTT-3')를 primer set으로 하여 Taq polymerase 존재 하에 95°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 하는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction ; PCR)을 40 cycle시행하였다. 5 μ l의 PCR 산물을 3 μ l의 stop solution과 함께 95°C에서 4분간 가열한 후 8% denatured polyacrylamide gel에서 52°C하에 전기 영동하였고 X-ray 필름에 자가 감작시켜 현미부수체의 삽입이나 결손 여부를 확인하였다.

3) TGF- β 제 2형 수용체유전자의 돌연변이 측정

TGF- β RII gene의 돌연변이를 확인하기 위하여 coding region의 poly A tract의 adenine 염기의 삽입이나 결손에 의한 frameshift mutation 여부를 다음과 같은 실험으로 확인하였다. 100 ng/ μ l의 genomic DNA는 10 ng의 γ^{32} P]ATP로 label된 forward primer인 TA10-F(5'-CTTTATTCTGGAAGA-

TGCTGC-3')와 150 ng의 reverse primer인 TA10-R (5'-GAAGAAAGTCTCACCAGG-3')을 primer set으로 하여 Taq polymerase 존재하에 95°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 40 cycle 동안 증합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 5 µl의 PCR 산물을 3 µl의 stop solution과 함께 95°C에서 4분간 가열한 후 8% denatured polyacrylamide gel에서 52°C하에 전기 영동하여 autoradiography로 확인하였다.

4) 통계학적 처리

각 군간의 비교는 paired t-test를 이용하여 two-sided p-value 0.05 이하를 유의하게 정하였고 상관성은 Pearson's correlation으로 구하였다. 또한 기존 예후 인자들과의 상관성은 Mann-Whitney 검정을 이용하였다.

결 과

1) 유방암 조직에서 현미부수체 불안정성의 발현

50예의 유방암 조직 중 14예(28%)에서 현미부수체 불안정성의 표현형인 replication error(RER)를 관찰할 수 있었다. 또한 50예의 유방암 환자로부터 얻어진 정상 유방 조직중 3예(6%)에서 RER을 관찰할 수 있었으며, 이중 2예는 유방암 조직에서도 동시에 RER이 관찰되었으나 1예는 유방암 조직에서 RER의 발현을 관찰할 수 없었다 (Table 1).

RER을 관찰할 수 있었던 유방암 조직에서 정상 조직과는 달리 염기의 결손이나 삽입을 확인할 수 있었다. 즉, Case 3, 7, 9에서는 한 allele에서

의 염기 결손을 관찰할 수 있으나 Case 4에서는 양쪽 allele에서 각각 염기의 결손 및 삽입을 동시에 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

RER이 관찰된 14예의 유방암 조직 중 BAT 40 marker에 양성 발현을 나타낸 예는 14예였다. BAT 26 marker에 양성 발현을 나타낸 예는 2예로 이 2예는 모두 BAT 40 양성 발현을 동시에 관찰할 수 있어서 유방암에서 감수성이 높은 현미부수체는 BAT 40였다(Table 2).

2) TGF-β 제 2형 수용체(TGF-β RII) 유전자의 돌연변이 측정

50예의 유방암 조직 중 4예(8%)에서 TGF-β RII 유전자의 돌연변이를 관찰할 수 있었으나 주변 정상 조직에서의 TGF-β RII 유전자의 돌연변이는

Fig. 1. Analysis of alterations of microsatellite sequences in breast cancer. 6% polyacrylamide/urea sequencing gels were used to resolve changes in microsatellite size. The results showed changes in the number of microsatellite repeats (arrow) between tumor(T) and normal(N) DNA.

Table 1. Incidence of RER-positive case in breast tissue

Pathology	RER*-positive (%)
Breast cancer tissue(n=50)	14(28%)
Normal breast tissue(n=50)	3(6%)

* Replication Error

Fig. 2. Analysis of mutations in TGF-β RII. Size of wild type(wt) PCR product is indicated, as are +1, -1, and -2 bp frameshifts. The results showed the frameshift mutations within the poly(A) repeat of the TGF-β RII in breast cancer.

관찰되지 않았다(Fig. 2). 현미부수체 불안정성을 나타낸 유방암 조직 14예 중 단 1예(7%)에서만 TGF- β RII 유전자의 돌연변이를 동반하고 있어 (Case 6), 본 실험에서는 RER 양성 발현과 TGF- β RII 유전자 돌연변이와의 상관성을 관찰할 수 없었다(Table 2).

3) 현미부수체 불안정성의 발현과 예후 인자와의 상관성

암의 발생과 진행에서 현미부수체 불안정성이 예후에 미치는 영향을 확인하고자 원발성 유방암 조직의 임상 조직학적 특성과의 상관성을 조사하였다. RER의 발현과 액와 임파절 전이와의 상관성을 관찰한 바, 특히 전이 임파절의 개수가 4개 이상인 경우 전이가 없었던 예에 비해 RER 발현이 높았다($p < 0.05$)(Table 3). 그러나 병기, 종양의

크기, 호르몬 수용체의 유무, 조직학적 유형과 RER 발현과의 상관성은 관찰할 수 없었다.

고찰

유방암은 서양에서 여성 악성 종양 중 가장 많은 빈도를 차지하며(25) 최근에는 우리 나라에서도 발생 빈도가 증가하여 여성 암 중 세번째를 차지하는 중요한 질환으로 모든 암의 5~6%, 여성 암의 12.5%를 차지하고 있다(26). 유방암의 원인 규명은 유방암의 정확한 생물학적 특성을 이해해야만 가능하며 현재까지 많은 연구들이 유방

Table 2. Correlation between RER and mutation of TGF- β type II receptor gene

Breast cancer	Type of RER marker		Mutation of RII gene
	BAT 26	BAT 40	
Case 1	-	-	-1/-2
Case 2	-	+	wt*
Case 3	-	+	wt
Case 4	-	+	wt
Case 5	-	+	wt
Case 6	-	+	-1/wt
Case 7	+	+	wt
Case 8	-	-	-1/-2
Case 9	-	+	wt
Case 10	-	+	wt
Case 11	-	+	wt
Case 12	-	-	-1/wt
Case 13	-	+	wt
Case 14	+	+	wt
Case 15	-	+	wt
Case 16	-	+	wt
Case 17	-	+	wt
Total	2(4%)	14(28%)	4(8%)

* wild type

Table 3. Correlation of RER with clinicopathological features

Category	RER-positive	RER-negative	Significance
Median age(years)	51.8	49.2	NS
Stage			
I	1	8	
II	8	23	NS
III	5	5	
LN involvement			
Negative	6	20	
1~3	1	9	$p < 0.05$
>4	7	7	
Tumor size			
≤5 cm	10	32	NS
>5 cm	4	4	
Estrogen receptor			
Positive	4	9	NS
Negative	10	27	
Progesteron receptor			
Positive	8	8	NS
Negative	6	28	
Pathology			
Infiltrating ductal cancer	14	33	
Infiltrating lobular cancer	0	1	NS
Other	0	2	
Total	14(28%)	36(72%)	

암의 염색체 이상이나 유전자 결함에 주목하여 왔다(27). 즉, 여러 염색체 또는 염색체 부수체의 구조적 결함이 보고되었으며, 종양 유전자 또는 성장 인자의 과발현, p53 종양 억제 유전자의 돌연변이가 높은 빈도로 보고되었다(28). 그러나 이와같은 수많은 연구 결과에도 불구하고 sporadic 유방암의 유전적 결함 및 시점 등은 아직까지도 명확하지 않다.

최근 대장암에서 DNA 복제후 교정 결함이 발생함이 공통적으로 발견되어 이는 현미부수체 불안정성 현상으로 알려졌다. 그리고 현미부수체 불안정성이 TGF- β 제 2형 수용체 유전자 돌연변이와 밀접하게 연관되어 있다는 사실이 밝혀졌다(22~24). 이러한 사실은 TGF- β 제 2형 수용체를 비활성화시키는 체세포 돌연변이(somatic mutation)를 증명함으로써 확인되었고, 이 돌연변이는 TGF- β 제 2형 수용체 유전자의 coding region의 일정 부위에서 집중적으로 관찰되었다. 즉 1~2개의 adenine 염기의 삽입이나 삭제에 의한 frameshift mutation을 일으켜 조기 종료 codon을 초래하고 그 결과 조기에 해독을 중지시킴으로써 TGF- β 제 2형 수용체 단백질이 절단되므로 기능적으로 결함이 있는 수용체를 합성함을 관찰하게 되었다.

본 연구에서는 유방암으로 수술받은 50예의 유방암 환자에서 유방암 조직과 정상 유방 조직을 대상으로 RER로 표현되는 현미부수체 불안정성의 발현을 조사한 바, 유방암 조직에서 28%의 RER 양성 발현을 확인할 수 있었다. 이 결과는 여러개의 다른 marker를 이용한 보고들에(21,25) 비해 낮은 RER 발현율이었으나, 대장암에서 높은 RER 발현을 나타낸(22) BAT 26과 BAT 40과 같은 marker를 인체 유방암에 적용, 확인하는 것은 의미있는 일이라 생각된다. 총 11개의 marker에서 30%의 RER 발현을 보고한 Paulson등(21)의 보고와 비교해볼 때 BAT 26과 BAT 40은 유방암에서도 비교적 유용한 marker로 생각되었다. 또한 현미부수체 불안정성을 측정하는 표지자(marker)에 따라서 RER 발현 차이를 관찰한 바, 이는 유전성 대장암에서와 달리 유방암에서는 BAT 40이

BAT 26에 비해 보다 예민한 표지자임을 확인할 수 있었다.

현미부수체 불안정성의 발현이 부수적인 종양 유전자나 종양 억제 유전자의 변화를 결과하여 급격한 염색체 파괴 및 암의 악성화를 촉진하는 역할을 확인하고자 저자들은 종양 억제 유전자로 알려진 TGF- β 제 2형 수용체 유전자 돌연변이와의 연관성을 조사 하였다. 그러나 대장암에서와는 달리 RER이 관찰된 14예 중 단 1예에서만 TGF- β 제 2형 수용체 유전자의 coding sequence상에서 adenine 염기의 탈락을 관찰할 수 있어, 유방암에서 현미부수체 불안정성과 TGF- β 제 2형 수용체 유전자 돌연변이와의 상관성은 확인할 수 없었다.

이와 같은 현미부수체의 염기 서열의 변화는 많은 인체 고형암에서 보고되었으나 유전적 불안정성이 암의 예후에 직접적으로 미치는 영향에 대한 보고는 드물다. 현미부수체 불안정성과 같은 유전적 불안정성이 종양의 악성화를 촉진시켜 대장암, 위암, 유방암에서는 임상적으로 진행성 암에서 자주 현미부수체 불안정성이 발견되었다(19~21). 유방암의 경우 현미부수체 불안정성이 종양의 크기, 액와 임파절 전이 및 병기와의 관련성이 보고되었으며, RER이 관찰된 환자군의 무병 생존 기간 및 전체 생존 기간이 감소하였다(21,25). 저자들도 RER의 발현과 기존의 예후 인자와의 상관성을 조사한 결과, 임파절 전이와의 상관성을 관찰할 수 있었다. 특히 4개 이상의 액와 임파절 전이가 있는 경우 RER의 발현이 높았으며, 그외 환자의 연령, 종양의 병기, 종양의 크기, 호르몬 수용체 유무와의 상관성은 관찰할 수 없었다. 그러나 RER 발현이 독립적인 예후 인자로서 이용될 수 있는지를 확인하기 위해서는 보다 큰 규모의 sample이 요구된다고 하겠다. 최근에는 RER이 발현될 경우 항암제에 대한 내성이 보고되므로(29,30) 추후 현미부수체 불안정성의 발현과 항암제 감수성과의 관련성에 대한 연구도 필요하다 하겠다.

결 론

유방암 환자에서 암 조직 내의 현미부수체 불안정성의 발현 여부를 측정하고 여러 가지 임상 인자와의 상관성을 조사하였다. 50예의 유방암 조직 중 28%에서 현미부수체 불안정성의 표현형인 RER의 발현을 관찰하였고, 임파절 전이와 상관성을 관찰하였다. 그러나 TGF- β 제 2형 수용체 유전자의 돌연변이와의 상관성은 관찰하지 못하였다.

참 고 문 헌

1. Devilee P, Cornelisse CJ. Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1198: 113-130.
2. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell population. *Science* 1976; 194: 23-28.
3. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-141.
4. Weinberg RA. A tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-1146.
5. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 3075-3079.
6. Kuerbitz SJ, Plunkitt BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle check point determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 7491-7495.
7. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cell with mutant p53 alleles. *Cell* 1992; 70: 937-948.
8. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991; 25: 229-253.
9. Fishel R, Kolondner RD. Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 382-395.
10. Leach FS, Polyak K, Burrell M, Johnson KA, Hill D, Dunlop MG, Wyllie AH, Peltomaki P, Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissue. *Cancer Res* 1996; 56: 235-240.
11. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 371: 75-80.
12. Papadopoulos N, Nicolaides N, Wei YF. Mutation of a MutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-1629.
13. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816.
14. Patel U, Grundfest BS, Gupta M, Banerjee S. Microsatellite instability at five chromosomes in primary breast tumors. *Oncogene* 1994; 9: 3695-3700.
15. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1641-1644.
16. Merlo A, Mabry M, Gabrelson E, Vollmer R, Baylin SB, Sidransky D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 2098-2101.
17. Uchida T, Wada C, Wang C, Egawa S, Ohtani H, Koshiha K. Genomic instability of microsatellite repeats and mutations of H-, K-, and N-ras and p53 genes in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3682-3685.
18. Ionov YM, Peinado A, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *nature* 1995; 363: 558-561.
19. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic carcinoma with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 1-9.
20. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 495-497.
21. Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM. Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 4021-4026.
22. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Wilson JK. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-1338.
23. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Orth K, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, Bang YJ, Lee HY, Park JG, Lynch HT, Roberts

- AB, Vogelstein B, Markowitz SD. A transforming growth factor β receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1995; 55: 5545-5547.
24. Parsons R, Myeroff L, Liu B, Wilson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5548-5550.
25. Elliedge RM, McGuire WL, Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Semin Oncol* 1992; 19: 244.
26. Ministry of Health and Social Affairs, Republic of Korea. One year report for cancer registry programme in Republic of Korea, 1990; 38.
27. Thompson F, Emerson J, Dalton W, Yang JM, McGee D, Villar H, Knox S, Massey K, Weinstein R, Bhattacharyya A, Trent J. Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas: Twenty-eight cases with primary disease. *Genes Chromosomes and Cancer* 1993; 7: 185-193.
28. Runnebaum IB, Nagarajan J, Bowman SD, Sukuma S. Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 10657-10661.
29. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel TA, Boland CR, Koi M. Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 1995; 55: 3721-3725.
30. Branch P, Hampson R, Karran P. DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1995; 55: 2304-2309.