

일차위암세포배양 및 위암세포주에서 암억제유전자 CDKN2의 결손, 변이, 및 발현이상의 검출

영남대학교 의과대학 미생물학교실*, 연세대학교 의과대학 미생물학교실**, 및
연세대학교 원주의과대학 미생물학교실***

이태윤* · 박전한** · 김수기*** · 김성광*

= Abstract =

Detection of CDKN2 Deletions and Mutations in Primary Gastric Cancer Cell Culture and Gastric Cancer Cell Line

Tae-Yoon Lee*, Jeon-Han Park**, Soo-Ki Kim*** and Sung-Kwang Kim*

Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University*,

Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University**,

Department of Microbiology, Yonsei University Wonju College of Medicine***

CDKN2 inhibits cyclin-dependent kinase 4(CDK4) activation by cyclinD, which results in the cell cycle arrest. Recently, the 9p21 region of human chromosome was reported to be deleted in various cancer types, which was revealed to contain the CDKN2 gene. The loss of CDKN2 gene expression, a possible tumor suppressor gene, was analyzed in 20 cancer cell lines, 8 primary cultures of stomach cancers, and 5 primary cultures of laryngeal cancers. The primary cultures were made from Korean patients. Loss of CDKN2 expression was found in 17(52%) out of 33 kinds of cancer cells. The loss of CDKN2 expression was explained by the deletion of the CDKN2 gene in 10(59%) from 17 kinds of cancer cells. The loss of CDKN2 expression was obvious (80%, 4 from 5 cultures) especially in the primary cultures of the laryngeal cancers. The only laryngeal cancer cells which expressed CDKN2 showed about ten-fold less amount of mRNA transcripts than other cancer cells. These results suggested that the loss of CDKN2 gene expression, mainly due to the CDKN2 deletion, might play a role in the tumorigenesis process.

서 론

세포는 성장함에 따라서 세포막과 세포질의 크기와 양이 증가하고 이러한 양적성장이 극에 달하면 두개의 세포로 분열하게 된다. 이를 위하여 유전물질의 복제와 각 progeny에로의 적절한 안배가 일정한 순서에 의하여 일어나게 되는데 이러한 과정은 세포주기라고 불리운다. 세포주기는 G1-S-G2-M의 4가지 phase로 구성된다. G1 phase는 diploid cell의 양이 증가하고 DNA 합성을 준비하는 과정으로 약 10시간이 소요된다.

G1 phase에서 세포는 성장인자들에 의해 자배를 받는다. S phase는 DNA복제가 일어나는 시기로 약 9시간이 소요되며 이때 세포는 성장인자들에 의해 자배를 받지 않는다. 다음에 세포는 G2 phase라는 4시간 가량의 DNA합성후 단계를 거쳐 1시간이 소요되는 mitosis(M) phase에 들어가 2개의 자세포로 분열하게 된다^{1,2)}. 세포주기는 cyclin-dependent kinases(CDK)라는 서로 연관된 효소들이 순차적으로 활성화됨으로써 조절된다³⁾. CDK에는 CDC2와 CDK2, CDK3, CDK4, 및 CDK517등이 있으며 이들은 cyclins⁴⁾라고 불리운 조절 subunits와 결합함으로써 부분적으로 통

Reprint request to: Tae-Yoon Lee, Ph. D., Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, 317-1 Daemyung 5 Dong Nam-Ku, Taegu, Korea

제가 이루어진다. Cyclins은 A, B, C, D, 및 E의 5가지 type이 있으며 transformed cell에서는 CDKs와 함께 multiple binary complexes를 이루어 이러한 cyclin/CDK complexes가 cell cycle progression의 primary effector로 작용함이 알려져 왔다. 또한 이러한 effector로서의 작용은 CDK subunits의 activating phosphorylation 혹은 inhibitory phosphorylation에 의해 조절된다고 보고되었다. 정상세포에서는 이러한 상황은 보다 복잡하여 untransformed human fibroblast의 경우 CDK는 cyclin, proliferating cell nuclear antigen(PCNA), 및 regulatory subunit인 p21등과 quaternary complex의 한 부분으로서 존재한다^{5,6,7}. 반면에 SV40T antigen, adenovirus E1A/E1B, HPV-16 E6/E7등과 같은 종양바이러스들의 oncoprotein들에 의해 fibroblast가 transformation된 경우에는 cyclin-CDK complex는 완전히 재조합된다. 즉, CDK4는 cyclinD, PCNA, 및 p21로부터 완전히 떨어져 나와 p16이라는 polypeptide와만 결합을 하게 된다.

p16은 141개의 아미노산으로 구성된 작은 단백으로 그 cDNA가 cloning되어 염기서열이 밝혀졌다. p16은 CDK4와 결합하여 CDK4/cyclinD complex의 catalytic activity를 방해함으로써 정상세포가 세포주기로 들어가 분열, 증식하는 것을 저지하는 것으로 알려져 있다⁹.

최근 Kamb등은 여러 종류의 암세포주에서 공통적으로 결손되어 있는 부위가 사람의 9번 염색체 short arm의 40kb 구역(9p21)에 집중되어 있음을 보고하였고, 이 부위에 p16 유전자가 존재하는 것을 밝혔다⁹. 이는 p16이 종양억제유전자로 작용하고 있음을 강력히 시사하는 보고이다. 이제까지 보고된 암발생과 연관된 단일 유전자 변이 중에 가장 잘 알려져 있는 것은 HRAS로서 이는 solid tumor의 10내지 15%에서 관찰된다. 종양억제유전자중에서 가장 변이가 빈번하게 발견되는 것은 p53으로서 이변이는 모든 종양의 약 50%에서 관찰되는 것으로 알려져 있다^{10,11,12}. 종양의 성장을 조절하는 기전중의 하나는 세포주기를 직접 조절함으로써 이루어 지는 것을 생각할 수 있을 것이다. 실제로 몇몇 암유전자 혹은 종양억제유전자는 세포주기에 직접 참여하고 있는 것으로 알려졌다. 예를 들면 DNA복제와 mitosis를 증진시키는 cyclin의 oncogene으로 작용하고 있음이 보고되었고, 종양억제유전자인 retinoblastoma(Rb) 단백은 CDK의 기질임이 밝혀

졌다⁹. 종양억제유전자의 가장 큰 특징은 이들이 어떤 종류의 종양에서는 결손되어 있다는 것이다. Kamb등은 p16이 astrocytoma, 방광암, 유방암, glioma, 백혈병, 폐암, melanoma, osteosarcoma, 난소암 및 renal cell carcinoma등의 다양한 암세포주를 대상으로 조사한 결과 평균 46%(25 내지 82%)에서 결손되어 있음을 보고하였고 결손이 의의 chromosomal inversion, translocation, small deletion 및 point mutation등을 포함하면 p16유전자 변이의 빈도는 75%에 이르는 것으로 보고하여 이는 기존에 가장 잘 알려진 p53의 변이보다 더욱 높은 빈도를 보였다. 이러한 결손 및 변이는 암세포주의 종류에 따라 차이를 보여 astrocytoma, glioma, 및 osteosarcoma등에서는 60% 이상의 높은 결손율을 보인 반면 백혈병, 폐암, 및 방광암등에서는 33%이하의 낮은 결손율을 보이는 것으로 보고하였다. p16은 이제까지 MTS1 (multiple tumor suppressor 1) 혹은 p16 superscript^a등으로 불리우던 이름이 최근 개최된 HUGO Nomenclature Committee에서 CDKN2로 통일되었다.

상기한 바와 같은 연구는 암세포주를 대상으로 한 실험결과이므로 in vitro에서 변형된 상태를 관찰한 것으로 in vivo의 상태의 암세포의 경우를 잘 반영해 주지 못한다. 이러한 단점을 극복 하려면 primary culture를 사용하던지 암조직 자체를 사용하여야 할 것이다. 또한 우리나라에서 비교적 흔하게 발생되는 암들이 상기 연구에는 포함되지 않은 것들이 많이 있다. 따라서, 새로이 발견된 암억제유전자인 CDKN2에 관하여는 우리나라에서 흔한 암들을 대상으로 한 적극적인 실험이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 일반적인 여러 암세포주 및 한국에서 비교적 많이 발생하는 위암을 대상으로 CDKN2유전자의 변이 및 발현이상을 관찰하였다. 위암의 경우는 한국에서 확립된 위암세포주 및 한국위암환자 조직으로부터 일차배양된 위암세포를 대상으로 CDKN2 변이 및 발현이상을 DNA 및 RNA 수준에서 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

암세포주는 20주이었고 위암조직의 일차배양세포가 8주이었으며 후두암조직의 일차배양세

LOSS OF CDKN2 EXPRESSION IN CANCER CELLS

Table 1. List and characteristics of the cancer cell lines and primary cultures of cancer cells. Abbreviations, Sloan-Kettering, Memorial Sloan-Kettering Cancer Institute, New York, USA; Gustave-Raussy, Gustave-Raussy Cancer Institute, Ville Juis, France; WUMC, College of Medicine, University of Ulsan; SNU, Seoul National University; YoUMC, College of Medicine, Yonsei University; YeUMC, College of Medicine, Yeungnam University; YUWMC, Yonsei University Wonju College of Medicine; Micro, Department of Microbiology; ENT Department of otolaryngologg

HPBALL	Peripheral blood	Acute lymphocytic leukemia	Sloan-Kettering	JH Park, YoUMC
SKHep1	Liver	Adenocarcinoma	ATCC HTB 52	JH Park, YoUMC
MDAMB-321	Breast	Adenocarcinoma	ATCC HTB 26	JH Park, YoUMC
T24	Bladder	Transitional cell	ATCC HTB 4	JH Park, YoUMC
HeLa	Cervix	Epitheloid carcinoma	ATCC HTB 2	JH Park, YoUMC
B95.8	Peripheral blood	EBV-transformed leukocytes	ATCC CRL 1612	JH Park, YoUMC
U-937	Pleural effusion	Histiocytic lymphoma	ATCC CRL 1593	JH Park, YoUMC
TCCSUP	Bladder	Transitional cell carcinoma	ATCC HTB 5	JH Park, YoUMC
J82	Bladder	Transitional cell carcinoma	ATCC HTB 1	JH Park, YoUMC
SK-Mel-24	Skin	Malignant melanoma	ATCC HTB 71	JH Park, YoUMC
Sk-Mel-28	Skin	Malignant melanoma	ATCC HTB 72	JH Park, YoUMC
IGR3	Skin	Malignant melanoma	Gustave-Raussy	JH Park, YoUMC
Malme3M	Skin	Malignant melanoma	ATCC HTB 64	JH Park, YoUMC
Daudi	Lymphoid tissue	Burkitt's lymphoma	ATCC CCL 213	JH Park, YoUMC
Raji	Lymphoid tissue	Burkitt's lymphoma	ATCC CCL 86	JH Park, YoUMC
RT4	Bladder	Transitinal cell papilloma	ATCC HTB 2	JH Park, YoUMC
MOLT4	Peripheral blood	Acute lymphocytic	ATCC CRL 1582	JH Park, YoUMC
SK-BR3	Breast	Adenocarcinoma	ATCC HTB 30	JH Park, YoUMC
HL-60	Peripheral blood	Promyelocytic leukemia	ATCC CCL 240	JH Park, YoUMC
ENT1	Larynx	Squamous cell carcinoma	WUMC	JS Seo, YeUMC ENT
ENT2	Larynx	Squamous cell carcinoma	WUMC	JS Seo, YeUMC ENT
ENT3	Larynx	Squamous cell carcinoma	WUMC	JS Seo, YeUMC ENT
ENT4	Larynx	Squamous cell carcinoma	WUMC	JS Seo, YeUMC ENT
ENTS	Larynx	Squamous cell carcinoma	WUMC	JS Seo, YeUMC ENT
SNU1	Stomach	Squamous cell carcinoma	SNU	skkim, YUWMC Micro
LJH	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro
KHH	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro
WDK	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro
SHJ	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro
PHB	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro
KMB	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro
JJS	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro
JBH	Stomach	Squamous cell carcinoma	YoUMC	skkim, YUWMC Micro

포가 5주로서 모두 33주의 암세포주 및 일차배양세포를 사용하였다. 각 암세포주 및 일차배양암세포의 이름과 제공처는 표 1에 제시한 바와 같다.

2. 실험방법

A. 정상인 말초혈액으로부터 림프구의 분리
정상인으로부터 채취한 혈액을 phosphate-buffered saline(PBS)로 2배 희석한 후 Ficoll-Hypaque

용액이 든 시험관을 약간 기울여 회석된 혈액을 pasteur 피펫으로 조심스럽게 Ficoll-Hypaque 용액 위에 중첩시켰다. 회석된 혈액의 용적은 Ficoll-Hypaque 용액 용적의 3배가 넘지 않도록 하였다. 실온에서 1000×g로 30분간 원침하면 위로부터 혈장 회석액 혼합층, 림프구층, Ficoll-Hypaque-용액층, 과립구층, 및 적혈구층의 차례로 분리된다. 이중 림프구층을 취하여 PBS로 3회 세척하고 생리식염수에 혼탁하여 -70°C에 보관하였다.

B. 암세포주 및 일차배양 암세포의 배양

실험에 사용된 세포들은 10% 우테아혈청, 폐나실린 100 unit/ml, 스트렙토마이신 100 mg/ml이 함유된 minimal essential medium(MEM) 배지를 사용하여 75cm²의 배양플라스크에서 5% CO₂, 37°C의 조건으로 배양하였다.

C. 암세포주 및 일차배양 암세포로부터 genomic DNA 분리

각 암세포들은 1×10^7 정도의 수를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리방법을 기술하면 우선 배양한 세포를 수집하여 2ml의 PBS로 1회 세척한 후 2ml의 PBS에 잘 혼탁하였다. 여기에 용해완충액 [10mM Tris(pH 7.6), 10mM EDTA (pH 8.0), 50mM NaCl, 0.2% sodium dodecyl sulfate(SDS), proteinase K(200μg/ml)]을 첨가하여 총 용적이 15ml이 되게 한 후 진탕배양기에서 42°C로 16내지 18시간 동안 가볍게 진탕배양하였다. 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol [PCI,(25:24:1, v/v)]를 가하여 잘 혼합한 후 원침후 상등액을 취하였다. 이를 chloroform:isoamylalcohol(24:1, v/v)로 2회 처리한 후 원침하여 얻은 상등액에 0.1 용적의 3M NaCl과 30ml의 isopropylalcohol을 첨가하였다. 실같은 DNA가 생길 때 까지 부드럽게 섞어 주다가 끝이 막힌 유리봉으로 DNA를 걷어 내었다. 걷어낸 DNA는 70% ethanol로 세척하여 염을 제거하고 건조한 후 600μl의 Tris-EDTA(TE, pH8.0) 완충액을 가하여 DNA가 용해될 때까지 4°C에 보관하였다.

고분자량 DNA분리에 어려움을 겪은 일부세포들의 경우는 QIAamp Tissue kit(Qiagen Inc., Chatsworth, Ca)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 간략히 기술하면 1×10^7 의 세포를 200μl의 PBS에 부유시켜 1.7ml 미량원침시험관에 넣는다. Proteinase K 용액을 가하여 잘 혼합한 후 70°C에서 10분간 방치하였다. 210μl의 isopropylalcohol을 가하여 잘 섞었다. QIAamp spin column을 2ml collection tube에 넣고 그 위에 상기한 대로 얻은 혼합액을 가하였다. 뚜껑을 닫고 6,000×g로 1분간 원침하여 tube에 여과액은 제거하였다. DNA가 결합되어 있는 QIAamp spin column에 잔존하는 단백 및 RNA의 제거를 위하여 AW완충액을 500μl 씩 가하여 2회 세척하였다. 6,000×g로 2분간 원침하여 QIAamp spin column에 잔존하는 AW완충액을 제거하였다. QIAamp spin column을 1.7ml 미량원침시험관에

넣고 200μl의 중류수를 가한 후 6,000×g로 1분간 원침하여 DNA를 QIAamp spin column으로부터 용출하였다.

D. PCR을 위한 DNA의 분리

고분자량의 DNA는 오히려 PCR반응에 장해요인을 가지고 있을 수 있다. PCR을 위한 DNA의 분리는 bead-beating방법을 사용하였다. 1mm크기의 glass bead를 중류수에 담아 멀균하여 사용하였다. 말초혈액립프구 혹은 암세포들은 적정수의 세포를 수집하여 100μl의 PBS에 혼탁시켜 1.7ml 미량원침시험관에 넣고 여기에 100μl의 glass bead를 가하고 100μl의 PCI를 가한 후 1분간 bead-beater로 진탕하였다. 16,000×g로 6분간 원침하여 얻은 상등액을 ethanol 침전하여 DNA를 분리하였다.

E. 말초혈액립프구, 암세포주 및 일차배양 암세포로부터 mRNA 분리

각 세포로부터 mRNA의 분리는 Pharmacia의 QuickPrep Micro mRNA Purification Kit를 사용하여 분리하였다. 그 과정을 기술하면 다음과 같다. 2×10^5 내지 1×10^6 의 세포를 1.7ml 미량원침시험관에 넣고 0.4ml의 extraction buffer를 가하여 세포가 균일하게 혼탁되도록 잘 섞어주었다. 0.8ml의 elution buffer를 첨가한 후 잘 섞어주었다. 이 상태에서 너무 오랜 시간이 지체되면 끈끈한 genomic DNA가 많이 추출되어 나중에 어려움을 주므로 적절한 시간후에 다음 단계로 넘어갔다.

(1) 결합단계: 세포추출물과 1ml의 oligo(dT)-cellulose 각각을 원침하여 세포추출물의 상청액을 oligo(dT)-cellulose 침전물에 가하여 잘 섞어주었다. 16,000×g에서 10초간 원침하여 상청액을 제거하였다.

(2) 세척단계: High salt buffer를 1ml 가하여 16000×g에서 10초간 원침하고 상청액을 제거하는 세척과정을 5회 반복실시하였다. 1ml의 Low salt buffer를 1ml 가하여 1회 세척한 후 상청액을 제거하였다. 침전물을 0.3ml의 Low salt buffer에 혼탁시켜 microspin column에 첨가하고 이를 1.7ml 미량원침시험관에 넣고 16,000×g에서 5초간 원침하였다. 1.7ml 미량원침시험관에 빠져 나오는 용액을 제거하고 다시 Low salt buffer를 가하여 세척하는 과정을 2회 반복하였다.

(3) 용출단계: Microspin column에 붙어 있는 mRNA를 용출하기 위하여 미리 65°C에 가온하

Fig. 1. PCR amplification of CDKN2 genomic DNA of the peripheral blood lymphocytes from 5 healthy persons. The genomic DNAs of Epstein-Barr virus-transformed Tol(T) and B95.8(B) cells were used as positive and negative controls, respectively. The (-) lane contains no template DNA in the PCR mixture. The amplified CDKN2 DNA (167bp) was indicated by the arrow. The M lane contains pBR322 DNA digested with *Hinf*I, 1631, 517, 504, 396, 344, 298, 221, 220, 154, 75bps from top to bottom).

Fig. 2. Reverse-transcriptase-PCR amplification of CDKN2 mRNA from normal peropheral blood lymphocytes. The PCR products of the CDKN2 mRNA are indicated by an arrow.

Fig. 3. Reverse-transcriptase-PCR amplification of α -actin mRNA from normal peripheral blood lymphocytes. The PCR products of the α -actin mRNA are indicated by an arrow.

Fig. 4. *SaII* digestion pattern of the reverse-transcriptase-PCR products from CDKN2 mRNA of normal peripheral blood lymphocytes. The digested DNA fragments and their sizes are indicated by arrows.

고 있던 elution buffer를 0.2ml 가하여 16000×g에 서 5초간 원침하였고 이 과정을 1회 반복함으로써 남아있는 mRNA를 용출하였다. 분리된 mRNA는 곧 실험에 사용하지 않을 경우에는 10 μ l의 glycogen용액과 40 μ l의 potassium acetate를 가한 후 1ml의 ethanol을 가하여 잘 섞어준 후 -70°C에 보관하였다.

F. CDKN2의 유전자의 결손조사를 위한 DNA PCR

CDKN2 유전자의 genomic DNA내 존재 여부를 알기 위하여 sequence tagged sites-polymerase chain reaction(STS-PCR)을 실시하여 CDKN2의 결손여부를 조사하였다. 예상되는 PCR산물이 나

타나지 않는 경우 CDKN2가 결손된 것으로 판정하였다. 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다¹³⁾. PCR조건은 94°C 1분, 60°C 1분 72°C 1분의 과정을 30회 반복하였다.

5'-GGAAATTGGAAACTGGAAGC-3'
5'-CTGCCCATCATCATGACCTG-3'

G. CDKN2의 발현조사를 위한 RT-PCR

CDKN2유전자의 mRNA transcripts를 검출하기 위하여는 CDKN2의 제 3 exon에서 3'쪽에 위치하는 sequence를 대상으로 RT-PCR을 시행하였다. mRNA의 분리가 잘 되었는지를 검증하기 위하

Fig. 5. Reverse-transcriptase-PCR amplification of CDKN2 mRNA from malignant cell lines. The α -actin mRNA served as a control(468bp, upper bands), The PCR product from CDKN2 mRNA (355 bp, upper bands) was not found in 13(54%) cell lines out of 24 cell lines, Lane 25 is a cancer cell which does not express CDKN2 as a negative control. M lane is a bacteriophage Φ X174 DNA digested with *Hae*III(1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, ans 72bps from top to bottom).

여는 α -actin 유전자의 염기서열을 대상으로 RT-PCR을 시행하였다. 이때 사용한 CDKN2 및 α -actin primer의 염기서열은 다음과 같았다¹³⁾.

CDKN2: 5'- CCCGCTTCGTAGTTTCAT-3'
5'- TTATTTGAGCTTGGTTCTG-3'
 α -actin: 5'- CACAGAGCCTGCCCTTG-3'
5'- TGGATAGCAACGTACATG-3'

RT-PCR은 reverse transcriptase를 사용한 cDNA의 합성과 cDNA를 사용한 PCR의 두 단계로 나누어 시행하였다.

(1) cDNA의 합성: 분리된 각 mRNA를 사용하여 각 시료당 50 μ l의 용적에서 다음의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 10mM dNTP 2.5 μ l, 5배의 first strand 완충액 10 μ l, 100mM DTT, 10pmol/ μ l 농도의 random hexamer 1.5 μ l, 200U의 Mo-MLV reverse transcriptase 1 μ l, mRNA용액 10 μ l과 DEPC 중류수 20 μ l을 혼합하여 37°C에서 1시간동안 배양하였다.

(2) PCR: 합성된 cDNA를 사용하여 mRNA의 분리가 잘 되었는지는 G3PDH 혹은 α -actin primer를 사용하고 CDKN2의 발현여부는 CDKN2 primer를 사용하여 관찰하였다. 각 PCR은 총 50 μ l의 용적으로 반응을 시행하였다. cDNA는 10 μ l 씩 사용하였고 Perkin-Elmer Cetus사의 10배 반응혼합액 5 μ l, 2mM dNTP 5 μ l, 각 primer 1 μ l씩, Taq DNA polymerase 0.25 μ l, 및 멀균중류수 27.75 μ l를 사용하였다. 반응조건은 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 반응을 30회 시행하였다.

H. RT-PCR산물의 restriction fragment length

polymorphism(RFLP) 분석

RT-PCR산물을 그 크기를 통하여 CDKN2의 발현유무를 판정할 수 있으나 RFLP 분석으로 이를 다시 확인하였다. 제한효소는 355bp의 RT-PCR 산물을 252bp와 103bp의 두 단편으로 절단시키는 *Sall*을 사용하였다.

결 과

정상인의 말초혈액 림프구 DNA를 사용한 CDKN2 DNA PCR

본 실험에서 사용한 DNA PCR을 위한 CDKN2 primer의 염기서열을 검증하기 위하여 정상인의 말초혈액 림프구 DNA를 주형으로 사용하여 PCR을 시행하였다. 그 결과 예상되는 167 bp 크기의 CDKN2 genomic DNA 단편이 증폭됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

정상인의 말초혈액 림프구 mRNA를 사용한 CDKN2 RT-PCR

본 실험에서 사용한 RT-PCR을 위한 CDKN2 및 α -actin primer의 염기서열을 검증하기 위하여 정상인의 말초혈액 림프구로부터 분리한 mRNA를 사용하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 사용하여 PCR을 시행하였다. 그 결과 예상되는 355bp 및 500bp 크기의 CDKN2 및 α -actin의 mRNA transcripts가 발현됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2 및 Fig. 3). 또한 CDKN2의 RT-PCR산물은 *Sall* 제한효소로 절단하여 252bp와 103bp의 두 단편으로 나뉘어짐을 관찰하였다 (Fig. 4).

LOSS OF CDKN2 EXPRESSION IN CANCER CELLS

위암을 제외한 다양한 유형의 암세포들에서 CDKN2의 발현

총 24종의 여러 암세포들에서 CDKN2가 발현되는지를 RT-PCR로 관찰하였다. 각 세포들로부터 mRNA의 분리가 잘 되었는지는 α -actin의 발현을 통하여 RT-PCR로 관찰하였다. 24종의 암세포들에서 모두 α -actin의 발현을 관찰할 수 있었으며 이들의 mRNA를 사용하여 CDKN2 RT-PCR을 시행하였다. 총 13종(54%)의 암세포에서 CDKN2의 발현이 상실되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 5). CDKN2의 발현 정도를 보면 이중 후두암세포인 ENT2세포는 매우 약한 CDKN2의 발현을 보였다 (lane 8, Fig. 5). 대부분의 경우 α -actin의 발현이 CDKN2의 발현과 비슷하거나 보다 강하였으나 J82 암세포주는 α -actin보다 CDKN2의 발현이 보다 강함을 관찰할 수 있었다 (lane 19, Fig. 5).

위암세포에서 CDKN2의 발현

위암세포주 1주 및 일차배양한 위암세포 8개

Fig. 6. Reverse-transcriptase-PCR amplification of CDKN2 mRNA from stomach cancer cell line (SNU1, lane 1) and primary cultures of stomach cancer cells (lanes 4 to 11). The α -actin mRNA served as a control (468bp, upper bands). The PCR product from CDKN2 mRNA (355bp, lower bands) was not found in 4(50%) out of 8 primary cultures of stomach cancer cells. Malignant cell lines (lanes 2, 3, and 12) which do not express CDKN2 mRNA were shown as negative controls. M, bacteriophage Φ X174 DNA digested with *Hae*III (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, and 72bps from top to bottom).

Fig. 7. PCR amplification of CDKN2 genomic DNA from malignant cell lines. The amplified CDKN2 DNAs are indicated by an arrow. M, bacteriophage Φ X174 DNA digested with *Hae*III(1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, and 72bps from top to bottom). Lanes 1 and M are overlapped. Faint CDKN2 band of lane 1 is just below the 194bp DNA of the DNA size marker.

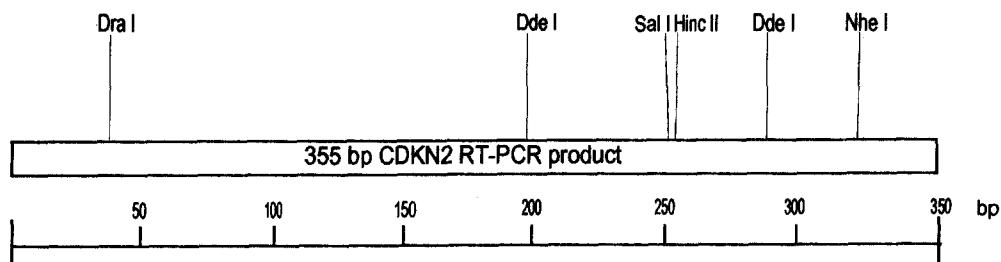


Fig. 8. Restriction map of the 355bp CDKN2 RT-PCR product. *Sal*I digestion cleaves the DNA into 2 fragments of 252bp and 103bp in sizes.

Table 2. Summary of the expression(RT-PCR) and presence(DNA-PCR) of the CDKN2 gene in cancer cell lines(HPBALL to HL-60) and primary cultures(ENT1 to JBH) of cancer cells

Cancer Cells	RT-PCR	DNA-PCR	Interpretation
HPBALL	+	+	Normal CDKN2 expression
SKHepl	-	+	Error in transcription
MDA-MB-231	-	-	CDKN2 deletion
T24	+	+	Error in transcription
HeLa	+	+	Normal CDKN2 expression
B95.8	-	-	CDKN2 deletion
U-937	+	+	Normal CDKN2 expression
TCCSUP	+	+	Normal CDKN2 expression
J82	+	+	Normal CDKN2 expression
SK-Mel-24	-	-	CDKN2 deletion
SK-Mel-28	+	+	Normal CDKN2 expression
IGR3	+	+	Normal CDKN2 expression
Malme3M	-	+	Error in transcription
Daudi	-	-	CDKN2 deletion
Raji	-	-	CDKN2 deletion
RT4	-	+	Error in transcription
MOLT4	-	-	CDKN2 deletion
SK-BR3	+	+	Normal CDKN2 expression
HL-60	+	+	Normal CDKN2 expression
ENT1	-	+	Error in transcription
ENT2	+	+	Normal CDKN2 expression
ENT3	-	+	Error in transcription
ENT4	-	-	CDKN2 deletion
ENT5	-	-	CDKN2 deletion
LJH	-	-	CDKN2 deletion
SNU1	+	+	Normal CDKN2 expression
KHH	-	-	CDKN2 deletion
WDK	-	+	Error in transcription
SHJ	+	+	Normal CDKN2 expression
PHB	+	+	Normal CDKN2 expression
KMB	+	+	Normal CDKN2 expression
JJS	+	+	Normal CDKN2 expression
JBH	-	+	Error in transcription

를 대상으로 CDKN2의 발현을 관찰하였다. 위암 세포주 SNU1에서는 CDKN2가 발현됨을 관찰할 수 있었다. 그러나, 8개의 일차배양한 위암세포 중에서는 4개(50%)에서 CDKN2가 발현되지 않았다 (Fig. 6). 이상을 종합하면 총 33종의 암세포들 중 17종 (52%)에서 CDKN2의 발현이 일어나지 않음을 알 수 있었다.

CDKN2의 발현이상 암세포에서 CDKN2

DNA PCR

CDKN2의 발현이 일어나지 않는 이유를 알아보기 위하여 CDKN2 발현의 이상이 있는 암세포 및 발현이 정상인 암세포 모두에서 CDKN2유전자의 존재를 PCR로 관찰하였다. 총 33종의 암세포 중 10종(30%)에서 CDKN2유전자의 결손을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7). 이들 모두는 CDKN2의 발현이 일어나지 않은 것으로 RT-PCR의 결과와

일치하였다. 그러나, CDKN2의 발현이 일어나지 않은 나머지 8종의 암세포들은 모두 CDKN2유전자를 가지고 있었다. 결과적으로 CDKN2의 발현이 일어나지 않은 17종의 암세포들 중 10종(59%)에서 CDKN2 결손으로 이를 설명할 수 있었다(표 2).

고 칠

암세포는 정상세포와 여러가지 점에서 차이를 보이며 여기에는 잘 분화되지 않는 성질, 주변 조직을 쉽게 침범하는 침습성의 증가 및 항암제 감수성의 저하등이 속한다. 이러한 암세포의 특징은 암세포가 단지 세포증식이 통제되지 않는 성장을 하기 때문이라기 보다는 세포진화의 한 과정으로 이해해야 할 것이다. 노인층에서 암의 발생이 많은 것은 복합적인 다양한 유전적 변화로 인하여 암이 발생할 가능성을 시사해준다. 1976년 Peter Nowell이 암세포가 변이를 가진 유전적으로 불안정하게 되고 세포진화가 촉진된다고 주장한 이래 암발생의 유전적요인이 많이 연구되어 왔으나 대부분 염색체 수준에서의 이상을 규명하는데 그쳤고, 구체적으로 어떤 유전자의 변이가 암발생을 유도하는지를 밝히지 못하였다. 그러나, 최근 들어 변이가 일어날 경우 암의 발생이 증가하는 유전자들이 발견되었고 이들 중에는 세포주기에 관여하는 유전자들이 포함되어 있음이 밝혀졌다. 이들의 역할은 주로 세포주기가 순차적으로 진행되도록 조절하는 유전자들과 세포주기가 가속화될 때 DNA 복구를 담당하는 유전자들이 포함된다¹⁴⁾.

최근 들어 세포주기에 관한 연구가 활발히 진행되면서 정상적으로 세포의 성장 및 증식을 조절하는 단백 및 유전자들이 밝혀지고 있다. 암세포에서 변이가 관찰되는 단백증 많이 연구되어 진 것이 p53이다^{15,16)}. 정상적인 p53을 갖는 세포는 이 단백을 통하여 비정상적인 세포의 증식을 억제할 뿐만 아니라 DNA 손상시에 이를 복구해주는 경로를 자극시켜 세포의 암적 변화를 억제 한다. 즉, p53단백은 DNA가 손상을 받거나 세포가 노화될 때 활성화되는데 다음과 같은 세가지 경로로 그 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. (1) p53단백은 세포주기의 중요한 억제단백인 p21의 발현을 증가시키며 (ii) p21단백은 cyclinE와 CDK2의 결합을 방해하여 세포주기 중 S

phase로의 진입을 방해함으로써 세포주기의 arrest를 유도한다. 한편 (ii) p21은 DNA복제에 관여하는 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)과 결합하여 PCNA와 DNA polymerase δ의 결합을 저지함으로써 S phase중에 세포주기 arrest를 유도 한다¹⁷⁾. (2) 또한 p53 단백이 활성화되면 apoptosis가 유도되어 endonuclease 활성화, chromatin fragmentation 및 condensation에 이어 세포사멸에 이르게 된다¹⁸⁾. (3) 한편 p53이 활성화될 경우에 Gadd(growth-arrest-and-DNA-damage-inducible)45 단백의 생산이 증가하고 (i) Gadd45는 PCNA와 결합함으로써 PCNA를 replication complex로부터 떼어놓는 역할을 함으로써 세포주기 arrest를 유도한다¹⁹⁾. (ii) 또한 Gadd45는 excision repair를 촉진시키는데 여기에도 PCNA가 작용할 가능성성이 있는 것으로 생각되고 있다¹⁹⁾.

한편 여러 종양바이러스들은 p53의 기능을 억제하거나 p53을 파괴시킴으로써 종양의 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, p53단백에 의한 apoptosis의 유도는 Epstein-Barr virus의 late membrane protein 1(LMP1)에 의한 Bcl-2의 upregulation에 의하여 억제되어 EBV의 transformation에 기여하고 있음이 알려져 있다^{18,19)}. 또한 human papilloma virus(HPV)의 E6단백은 p53을 파괴시킴으로써^{20,21,22,23)} 자궁경부암의 발생에 영향을 주는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 이외에도 p53유전자의 변이와 종양발생과의 연관성에 관하여는 여러 유형의 종양들을 대상으로 많은 연구가 이루어져 왔다¹¹⁾.

p53은 DNA손상이나 노화등의 자극에 의해 활성화되어 세포주기 중요조절단백인 p21을 통하여 세포주기를 조절하는 기능을 가지고 있으므로 세포주기의 한 요소라고는 할 수 없다. 세포주기를 담당하는 주된 구성성분들은 여러가지 cyclin들과 각 cyclin들이 결합하는 CDK들 및 여러 조절단백들로서 세포주기 진행에 있어 다양한 역할을 수행하여 세포의 성장과 증식 및 그 조절을 통하여 정상적인 세포의 성장을 가능하게 하고 있다. CDK들은 각각에 결합하는 특이한 cyclin들이 있어 CDK-cyclin복합체의 상태에서 CDK가 활성화되며 이 복합체는 세포성장을 촉진시킨다⁹⁾. 반면에 CDK와 cyclin의 결합을 방해하는 단백들이 있어 세포성장을 통제하고 있는데 이중 대표적인 것이 위에서 기술한 p21이다^{7,25)}. 한편 최근에 발견된 조절단백중 CDK4와 cy-

clinD의 결합을 방해하는 것이 CDKN2라는 16 kDa크기의 단백(p16)이다⁹.

최근에 Kamb등은 염색체 9p21부위의 특정유전자가 많은 암세포들에서 결손되어 있음을 발견하여 이를 multiple tumor suppressor(MTS)라고 명명하였으며 MTS유전자는 세포주기의 조절단백의 하나인 CDKN2를 만드는 유전자와 동일한 것임이 밝혀졌다⁹. p21이 cyclinE와 CDK2의 결합을 방해하여 세포주기의 arrest를 유도하는 반면에 CDKN2는 CDK4와 cyclinD의 결합을 방해함으로써 세포주기의 arrest를 유도한다. Kamb등에 의하면 astrocytoma는 82%, 방광암은 33%, 유방암은 60%, glioma는 71%, 백혈병은 25%, 폐암은 25%, melanoma는 58%, osteosarcoma는 60%, 난소암은 29%, 및 신장암은 56%에서 CDKN2가 결손되어 있음을 보고하였으며 대장암 및 neuroblastoma는 CDKN2의 결손과의 연관성이 낮음을 보고하였다⁹. 그러나, 이들의 연구에는 한국에서 많이 발생하는 위암이나 간암등의 경우에 관한 보고는 없었으며 암억제유전자일 가능성성이 높은 CDKN2에 관하여 이러한 암을 대상으로 하는 연구는 의의가 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 여러 다양한 유형의 암세포주들뿐만 아니라 한국인 위암세포 및 후두암세포들의 일차배양세포들을 대상으로 CDKN2유전자의 mRNA발현 및 DNA의 결손을 조사함으로써 이들 암의 발암기전을 부분적으로나마 설명하고자 하였다.

본 실험에서는 두가지 종류의 CDKN2 primer조합들을 사용하였다. 하나는 mRNA 발현을 보기 위한 primer조합으로서 이는 각 암세포로부터 mRNA를 분리한 후에 역전사를 통하여 cDNA를 합성하고 이 cDNA를 사용하여 PCR을 시행하는데 사용하였다. 또 다른 primer조합은 CDKN2유전자의 결손을 보기 위한 것으로서 각 암세포의 genomic DNA를 주형으로 사용하여 PCR을 시행하는데 사용하였다. 이들 primer조합들의 염기서열을 검증하기 위하여 정상인의 말초혈액 립프구에서 mRNA 및 DNA를 분리하여 RT-PCR 및 DNA-PCR을 시행한 결과 RT-PCR의 경우는 예상되는 355bp의 PCR산물이 관찰되었다. 355bp의 RT-PCR산물을 확인할 수 있는 적절한 제한효소를 찾기 위하여 355 bp의 CDKN2 염기서열의 제한효소 절단부위를 찾은 결과 (Fig. 8) *Sall*이 적절

한 것으로 판단되어 이를 사용하여 RT-PCR산물을 확인하였다. DNA-PCR의 경우는 예상되는 167bp의 PCR산물이 관찰되었으나 너무 크기가 작아 이를 확인할 수 있는 적절한 제한효소는 찾지 못하였다.

여러 암세포들에서의 CDKN2의 mRNA전사는 RT-PCR로 관찰하였다. 우선 암세포들에서 mRNA를 분리하고 mRNA의 분리가 잘되었는지를 알기 위하여 세포내에 정상적으로 존재하는 구조유전자인 α -actin의 발현을 RT-PCR로 관찰하였다. α -actin의 RT-PCR산물이 충분한 경우에 한하여 CDKN2의 RT-PCR을 시행하였다. 총 33종의 암세포들중 52%에 이르는 17종에서 CDKN2가 발현되지 않음을 알 수 있었다. 세포유형별로 특별한 차이를 보이지는 않았으나 단지 EBV와 연관된 세포주들인 B95.8, Daudi, 및 Raji들에서는 모두 CDKN2의 발현이 되지 않았으며 이는 모두 CDKN2유전자의 결손에 기인하였다. EBV감염과 CDKN2의 결손과의 연관성에 관하여는 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

또한 이들중 5종은 1차세포배양 후두암세포로서 이중 4종(80%)에서 CDKN2가 발현되지 않았다. Northern hybridization을 시행하여야 정확한 결과를 얻을 수 있겠지만 CDKN2의 발현이 관찰된 1종의 암세포도 그 mRNA 발현정도가 다른 암세포 및 정상립프구보다 10%이하로서 매우 낮았다. 이는 후두암의 경우 CDKN2의 발현이상이 발암기전과 매우 높은 연관성을 가질 가능성을 시사한다.

한편 8종의 일차배양 위암세포중 4종(50%)의 암세포에서 CDKN2가 발현되지 않았다. CDKN2의 발현이상은 주로 CDKN2유전자의 결손에 기인하는 것으로 알려져 있다. CDKN2의 발현이상이 관찰된 총 17종의 암세포들중 10종(59%)에서 CDKN2유전자의 결손을 관찰할 수 있었다. 위암세포의 경우는 CDKN2의 발현이상이 관찰된 총 4주의 암세포들중 2주(50%)에서 후두암세포의 경우는 CDKN2의 발현이상이 관찰된 총 4주의 암세포들중 2주(50%)에서 CDKN2의 결손이 관찰되어 전반적으로 약 50% 이상의 경우에서 CDKN2유전자의 결손으로 인하여 CDKN2의 발현이 일어나지 않음을 알 수 있었다. 그러나, 본 실험에서 사용한 primer가 CDKN2유전자의 전 염기서열을 모두 조사할 수 있는 primer는 아

LOSS OF CDKN2 EXPRESSION IN CANCER CELLS

니므로 본 실험의 primer가 조사할 수 없는 영역의 DNA 결손도 있을 것으로 생각하면 암세포들에서 CDKN2의 결손율은 실제로는 이보다 높을 것으로 생각된다. 이를 위하여는 CDKN2의 모든 영역을 조사할 수 있는 다양한 primer조합들을 사용하여야 할 것이다. 또한 Southern blot hybridization을 시행하면 보다 정확한 결손여부를 확인할 수 있을 것이다.

결손이 되지 않았으면서 CDKN2의 발현이 되지 않는 경우는 CDKN2의 promoter영역에 이상이 있는 경우를 생각할 수 있을 것이며 CDKN2유전자의 변이로 인하여 정상적인 primer를 사용한 RT-PCR로는 그 발현여부를 관찰할 수 없는 경우가 있을 것이다. 전자의 경우는 northern hybridization으로 확인할 수 있을 것이며 후자의 경우는 CDKN2의 exon들을 중폭할 수 있는 primer조합을 사용하여 PCR을 시행하고 이를 클로닝하여 그 염기서열을 결정함으로써 CDKN2의 변이를 알 수 있을 것이다.

Cairns등에 따르면 이러한 CDKN2의 변이는 매우 드문 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 즉, 폐암(nonsmall cell carcinoma), 방광암(transitional cell carcinoma), 신암(clear cell carcinoma), 두경부암(squamous cell carcinoma), 및 뇌암(glioma) 총 75종의 암세포를 대상으로 CDKN2의 변이를 조사한 결과 5개의 missense 변이와 2개의 nonsense변이를 발견하였다. 이들에 의하면 missense 변이중 4개는 140번째 코돈위치의 436번째 염기의 G A transition이었고 나머지 하나는 52번째 코돈위치의 172번째 염기의 G A transition이었으며 2개의 nonsense변이는 방광암 한 예에서 50번째 코돈이 CGA TGA(Arg stop)으로, 두경부암 한 예에서 25번째 코돈이 GAG TAG(Glu stop)으로의 변이이었다. 이는 발현이상으로 연결되는 nonsense 변이는 2.7% 정도에 불과함을 말해 준다.

결 론

본 연구에서는 여러 암세포주 20주 및 한국에서 분리된 암세포의 일차배양세포들 13주를 대상으로 세포주기의 조절유전자이며 암억제유전자일 것으로 생각되는 CDKN2의 발현 및 결손을 조사하여 보았다. 그 결과 총 33주의 암세포들중 17주(52%)에서 CDKN2의 발현이 일어나지 않았

다. 또한 총 10주(30%)에서 CDKN2의 결손이 관찰되었는데 이는 CDKN2의 발현이 일어나지 않은 17주중에서는 59%에 해당되는 빈도였다. 이는 암유발에 있어 CDKN2의 결손 및 발현이상이 매우 중요함을 암시하는 것이다. 앞으로 Southern hybridization 및 northern hybridization을 통한 본 결과의 확인 및 CDKN2발현정도의 분석 및 CDKN2 유전자 변이를 보기 위한 염기서열분석 등의 실험이 진행되면 CDKN2의 발암기전에 관한 보다 많은 지식을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 전암병변(preneoplastic lesion)에서 CDKN2의 결손 및 발현이상을 조사함으로써 암으로의 진행가능성을 미리 예전하는데에도 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

감사말씀

본 연구는 1994년도 대한 암연구재단-한국암배인삼공사 공의사업단 수탁연구비 지원에 의하여 이루어 졌음.

참 고 문 헌

- 1) Draetta G: Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. TIBS 15:378-383, 1990.
- 2) Pines J: Arresting developments in cell-cycle control, TIBS 19:143-145, 1994.
- 3) Meyerson M, Faha B, Su LK, Harlow E, and Tsai LH: The cyclin-dependent kinase family. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol LVI:177-186, 1991.
- 4) Sherr CJ: Mammalian G1 Cyclins. Cell 73: 1059-1065 1993.
- 5) Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B: Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. Nature 371:534-537, 1994.
- 6) Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. Nature 369:574-578, 1994.
- 7) Xiong Y, Hannon GJ, Zhang Hui, Casso D, Kobayashi R, and Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366:701-704, 1993.
- 8) Serrano M, Hannon GJ, and Beach D: A new

- regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707, 1993.
- 9) Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE, and Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436- 440, 1994.
 - 10) Effert P, McCoy R, Abdel-Hamid M, Flynn K, Zhang Q, Busson P, Tursz T, Liu E, and Raab-Traub N: Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 66:3768-3775, 1992.
 - 11) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53, 1991.
 - 12) Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton SR, Frost P, Vogelstein B: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252:706-709, 1991.
 - 13) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, and Carson DA: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-756, 1994.
 - 14) Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science* 266:1821-1828, 1994.
 - 15) Zambetti GP, Quartin RS, Martinez J, Georgoff I, Momand J, Dittmer D, Finlay CA, and Levine AJ: Regulation of transformation and the cell cycle by p53. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol LVI:219-225* 1991.
 - 16) Collins MKL, Rivas ALR: The control of apoptosis in mammalian cells, *TIBS*18:307-309, 1993.
 - 17) Smith ML, Chen I-T, Zhan Q, Bae I, Chen C-Y, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Forncane Jr AJ: Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266:1376-1379, 1994.
 - 18) Brooks L, Yao Y, Rickinson AB, and Young LS: Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol* 66:2689-2697, 1992.
 - 19) Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, Hardy R, Croom-Carter D, Lundgren E, Rickinson AB: Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF- κ B activation and to induction of cell surface markers. *J Virology*, 1994.
 - 20) Doeberitz MK, Rittmuller C, Aengeneyndt F, Jansen-Durr P, and Spikovsky D: Reversible repression of papilloma virus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. *J Virol* 68:2811-2821, 1994.
 - 21) Howley PM, Scheffner M, Huibregtse J, and Munger K: Oncoproteins encoded by the cancer-associated human papillomaviruses target the products of the retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Vol LVI:149-155*, 1991.
 - 22) Lechner MS, Laimins LA: Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 68:4262-4273, 1994.
 - 23) Scheffner M, Takahashi T, Huibregtse JM, Minna JD, and Howley PM: Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins: *J Virol* 66:5100-5105, 1992.
 - 24) Stoler MH, Rhode CR, Whitley A, Wolinsky SM, Chow LT, and Broker TR: Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 23:117-128, 1992.
 - 25) Toyoshima H, Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-CDK protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78:67-74, 1994.
 - 26) Cairns P, Mao Li, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D: Rates of p16(INK4a) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 265: 415-416, 1994.