

소아 급성 백혈병의 CDKN2 (p16-INK4A/MTS1) 유전자의 돌연변이 양상

연세대학교 의과대학 소아과학교실

양 창 현 · 유 철 주 · 김 길 영

Mutational Analysis of CDKN2 (p16-INK4A/MTS1) Gene in Childhood Acute Leukemia

Chang Hyun Yang, M.D., Chuhi Joo Lyu, M.D. and Kir-Young Kim, M.D.

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The human chromosome 9p21 region that is a frequent site of deletions and rearrangements in many tumor types including leukemias implied the existence of a tumor suppressor gene within 9p21 which is involved in tumor formation. CDKN2 (p16) gene is located in the same chromosomal region. The loss of CDKN2 function is probably one of the most common genetic alterations and is now thought to play a key role in leukemogenesis. We examined the frequency of the point mutation of CDKN2 gene by analyzing the DNA sequence and demonstrated the prognostic implication of mutations of CDKN2 gene in childhood acute leukemia. **Methods:** We investigated the prevalence of the point mutation in thirty patients with 20 cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 10 cases of acute myeloid leukemia (AML). The point mutation of CDKN2 gene was analyzed in a PCR generated DNA sequencing technique. **Results:** There was no point mutation in exon 1 of CDKN2 gene. A missense mutation (G→A transition) at nucleotide 364 of this gene was present in codon 122 in one T-cell ALL patient and resulted in an amino acid change from glycine to arginine. **Conclusion:** The point mutation of CDKN2 gene was a rare event in childhood acute leukemia, but the inactivation of this gene plays an important role in the pathogenesis of T-cell ALL. Further study is needed in more cases of acute leukemia to evaluate the prognostic significance of the alteration of CDKN2 gene in ALL. (*Korean J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 8: 35~41)

Key Words: CDKN2, Point mutation, Acute leukemia

책임저자 : 양창현, 서울시 강남구 도곡동 146-92, 연세의대 영동세브란스병원 소아과, 135-720

Tel: 02-3497-3355, Fax: 02-3461-9473

*본 논문은 1995년도 연세대학교 의과대학 일반교수연구비(1995-46) 지원에 의하여 이루어졌음.

*본 논문은 연세의대 소아과학교실 유한연구비의 지원을 받았음.

서 론

혈액종양질환에서 특징적으로 나타나는 대부분의 유전적 변형은 암유전자(oncogene)의 활성화로 여겨진다. 그러나, 최근에 이르러 암발생과정에서 종양억제인자(tumor suppressor gene)의 활동성 소실(loss of activity)이 중요한 역할을 하리라는 견해가 더 주목을 받고 있다. 최근 여러 암세포주와 암세포에서 종양억제인자의 불활성화(inactivation)¹⁾가 보고되고 있는데 점 돌연변이(point mutation), 골격구조이동(frameshift) 돌연변이, 비분리 현상(non-disjunction), 결손(deletion) 및 기타 염색체 변형 등의 기전을 통하여 발생하게 된다. 가장 전형적인 예로써 retinoblastoma gene (Rb)²⁾은 결실이나 전체 염색체소실과 같은 염색체 변형이 일어나며, p53종양억제인자³⁾는 이형접합소실(heterogenous deletion)이 전체 종양의 50%에서 발생한다.

최근 세포주기(cell cycle)에 대한 형태학적 연구 및 생화학적 기전에 대한 연구들이 진행되고 있고 이런 연구에서 세포주기의 각 단계에 따라 규칙적으로 양적변화를 일으키는 단백질인 cyclin이 발견되었다. 이 cyclin은 CDK (cyclin dependent kinase)와 결합하여 CDK를 활성화시키게 된다. D-cyclin은 CDK4와 cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (CDK4I)유전자 산물인 p16 또는 CDKN2에 의해 조절되므로 CDK4I유전자의 불활성화로 D-cyclin이 과다하게 발현되면 Rb단백의 과인산화(hyperphosphorylation)를 초래하여 G1 phase에서 S phase로의 이행을 과다하게 촉진하게 된다⁴⁾. Cyclin D1과 CDK4의 과다 발현은 림프종과 고형종양 등에 보고되어 암유전자로써의 가능성이 제기되기 시작하였다⁵⁾. 반면에 p16과 같은 CDKIs의 CDK에 대한 억제력의 소실은 Rb단백의 과인산화와 통제력을 잃은 세포증식으로 인하여 CDKIs가 종양억제 유전자의 한 종류로 간주하게 되었다⁶⁾. 흥미있게도 종양배양세포에서 CDKIs의 과다발현은 세포주기의 진행과 종양발생이 억제되었다⁷⁾.

9번 염색체 단완21부위(9p21)는 백혈병을 포함

하여 각종 종양환자에서 결손과 재배열이 빈번히 발생하여 종양발생과정과 연관하여 한 개이상의 암억제인자가 존재할 것으로 여겨지고 있다⁸⁾. p16 유전자는 9p21에 위치하며 악성 흑색종, 폐암, 뇌종양과 백혈병 등 각종 암에서 동형접합결손(homozygous deletion)이 발견되었다^{6,9)}. p16^{INK4A}유전자는 multiple tumor suppressor 1 (MTS1) 혹은 cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (CDK4I)라고도 불리며 공식적인 HUGO명칭은 CDKN2이다¹⁰⁾. CDKN2유전자의 동형접합결손은 종양세포주에서 빈번히 보고되고 있으며, 이들 세포주에서 CDKN2 유전자의 exon 2에서 빈번하게 nonsense, missense, 골격구조이동 돌연변이가 나타나고 있다¹¹⁾. 양 등^{12~14)}은 low-passage와 multiple passage HL60 백혈병 세포주에 대한 CDKN2 유전자의 DNA염기서열 분석결과 multiple passage배양세포주에서 점 돌연변이의 빈도가 더 높았다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 소아 급성 백혈병환자들에서 DNA염기서열분석결과 CDKN2 암 억제유전자의 돌연변이 빈도를 밝힘으로써 이 유전자의 돌연변이가 완해유도 및 장기예후에 미치는 영향을 조사하는 데 그 목적이 있다.

대상 및 방법

1) 대상

연세대학교 의과대학 세브란스병원 소아과에 입원하여 급성백혈병으로 초기 진단받은 30례를 대상으로 하였다. 이들 중 급성 림프구성 백혈병(ALL)은 20례, 급성 골수구성 백혈병(AML)은 10례였으며, HL60 세포주를 대조군으로 이용하였다.

2) 방법

(1) 면역표현형 검사: 백혈병의 정확한 아형을 알아보기 위하여 골수세포에 대해 면역표현형 검사를 다음과 같이 시행하였다. 즉 B 림프구 표지자로 CD10, CD19, CD20, T 림프구 표지자로 CD3, CD5, CD7, 과립구 표지자로 CD13, CD33, 조혈간세포 표지자로 CD34, 단구 표지자로 CD14

단클론 항체를 사용하여 직접 면역형광법으로 염색 후 유세포분석기(Beckton-Dickinson, USA)로 분석하였다.

급성 림프구성 백혈병 20례 중 early Pre-B 표현형이 17례, Pre-B 2례, T세포 1례이었으며, 급성 골수구성 백혈병 10례 중 M2 5례, M4 3례, M5 2례이었다.

(2) DNA 추출: 백혈병환자의 골수도말 slide로부터 genomic DNA를 van Kamp 등¹⁵⁾의 방법으로 추출하였다. 즉 200 μ l의 PCR (Polymerase chain reaction) buffer에 도말slide로부터 세포를 긁어내어 용해시킨다음 37°C에서 overnight incubation한 다음 95°C에서 15분 가열 후 10분 동안 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 그후 phenol/chloroform 추출하여 DNA를 분리하였다. ATCC (American Tissue Culture Collection)으로부터 얻은 HL60 세포주는 genomic DNA isolation kit (TurboGen, Invitrogen, San Diego, USA)를 이용하여 DNA를 분리하였다.

(3) 돌연변이 분석: 추출된 DNA를 5% DMSO (dimethyl sulfoxide)가 포함된 50 μ l 반응에 증합효소 연쇄반응법(PCR)을 이용하여 DNA를 증폭하였다. CDKN2 유전자는 3개의 exon으로 구성되어 있는데 이중 97%를 차지하고 있는 exon 1 (125 bp)과 exon 2 (307 bp)의 두 절편을 증폭하였다. PCR을 위한 시발체는 Kamb 등⁶⁾이 사용한 2F, 1108R (exon 1)와 42F, 551R (exon 2)을 이용하였으며, PCR증폭은 95°C 5분, 60°C 2분간 변성시킨 다음 자동온도변환장치에서 72°C 1분 30초, 94°C 1분, 60°C 1분의 3단계로 구성된 반응을 30~35주기 반복반응시키고 72°C 7분간 그리고 4°C에서 정지시켰다. PCR증폭산물은 pCRII TA cloning vector (Invitrogen, San Diego, USA)에 subclone시켰으며,

transformation한 후 25개의 white colony를 취하여 small-scaled culture를 하였다. DNA template는 Modified mini alkaline lysis/PEG 8000 DNA precipitation procedure를 이용하여 정제하였다. DNA염기서열 분석을 위한 시발체는 exon 1과 exon 2의 original primers와 더불어 다음과 같은 각각의 내부 시발체를 제조하여 분석하였다. Exon 1 (sense 5'-CAG CAT GGA GCC TTC GGC TGA CTG-3' and antisense 5'-CAA ACT TCG TCC TCC AGA GTC-3')과 exon 2 (sense 5'-CTC ACC CGA CCC GTG CAC GCT G-3' and antisense 5'-CTC AGC CAG GTC CAC TTT CAG AC 3')를 사용하였으며, 필요에 따라서 vector 시발체인 T7과 Sp6 시발체도 사용하였다. CDKN2 유전자의 exon 1과 exon 2의 DNA 염기서열 분석은 Amplicycle Sequencing kit (Perkin-Elmer Braunschweig, NJ, USA)를 사용하여 dideoxy chain termination방법을 통한 PCR generated DNA sequencing으로 돌연변이 여부를 분석하였으며 8% long ranger gel (FMC Bioproducts, Rockland, USA)에 전기영동 후 Kodak X-OMAT AR필름(Eastman Kodak, Rochester, USA)에 노출시킨후 현상하여 돌연변이 여부를 확인하였다. 증폭된 exon 1과 exon 2의 DNA염기서열 분석시 sense와 antisense방향에서 모두 DNA염기서열을 분석하여 확인하였다.

결 과

대상환자 30명의 소아 급성 백혈병환자들에서 DNA염기서열 분석결과CDKN2 유전자의 exon 1 절편에서는 점 돌연변이를 발견할 수 없었다. Exon 2 절편에서의 DNA염기서열 분석결과 급성 림프구성 백혈병환자중 T 세포 표현형 환자 1명에서

Table 1. CDKN2 Gene Mutation in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia

	Exon	Nucleotide No. (Codon)	Nucleotide	Change	Codon	Change mutation
T-ALL	2	364 (122)	GGC→CGC	G→C	Gly→Arg	Missense

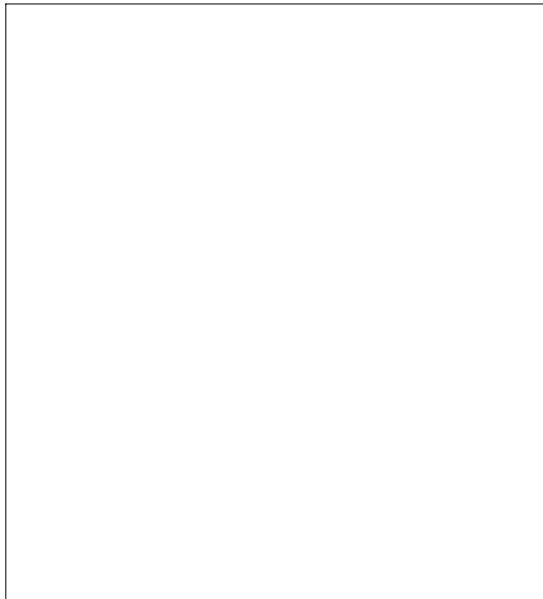


Fig. 1. Mutation of the CDKN2 gene at nucleotide 364, codon 122 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. A G to C transversion which causes an amino acid change from Gly to Arg.

nucleotide 364 (codon 122)에서 1개의 missense 돌연변이(GGC→CGC, Gly→Arg)가 발견되었다(Table 1, Fig. 1). 그 이외의 환자에서는 점 돌연변이를 발견하지 못하였다.

고 찰

최근 Kamb 등⁶⁾과 Nobori 등⁹⁾은 CDK4I유전자를 종양억제유전자로 제안하였으며 종양세포주를 대상으로 한 많은 연구에서 glioma 종양세포주 71~87%, 유방암 종양세포주 60%, 흑색종 종양세포주 57~61%, 백혈병 종양세포주 25~65%에서 동형접합결손을 보고하였고, 혈액종양환자의 일차종양세포에서도 CDK4I 유전자의 불활성화를 보고하고 있다. CDK inhibitor인 CDKN2유전자가 위치하는 염색체 9p21부위에서 새로 진단된 급성 림프구성 백혈병(ALL)환아의 7~13%에서 염색체 결손(deletion)이 발생한다고 한다¹⁶⁾. Okuda 등¹⁷⁾은 9번 염색체이상이 있는 소아 급성 림프구성 백혈

병환자 20명 중 18명에서 p16/MTS1의 결손을 발견하였으나, 9번 염색체가 정상인 환아에는 23명 중 5명에서만 유전자결손을 발견하였다. 다른 종양억제유전자는 점 돌연변이에 의해서 불활성화가 되지만 CDKN2유전자는 동형접합 결손에 의해서 불활성화가 된다. CDKN2유전자의 동형접합 결손은 일차성 방광암, 신경교종, 중피종, T-세포 급성 림프구성 백혈병, 흑색종, 전립선 선암, 육종, 난소 선암에서 주로 발생하며 점 돌연변이는 주로 췌장 선암, 식도암에서 발생하며 드물지만 비소세포 폐암, 두경부 편평세포암에서도 보고되고 있다. 그러나 ALL에서 점돌연변이는 소아환자를 포함하여도 드문 편이다⁴⁾. ALL환자에서 CDKN2유전자의 돌연변이는 조사한 보고¹¹⁾에 의하면 nonsense, missense, frameshift돌연변이가 exon 2 절편에서 대부분 발견되었다. 저자의 경우 20명의 ALL환아 중 단 1례에서 exon 2절편에서 점 돌연변이를 발견하였으며 이 환자는 T세포 면역 표현형환자이었다. 저자의 경우도 T세포 환자의 증례를 늘리고 동시에 동형접합 결손을 같이 연구하였으면 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다는 아쉬움이 남아있다. ALL가운데서 T-ALL이 동형접합 결손의 25~83%를 차지하며 precursor B-ALL은 이보다 빈도가 낮다(10%)¹⁸⁾. 국내에서도 권 등¹⁹⁾이 급성 백혈병환자 21례 중 4례(19%)에서 동형접합 결손을 관찰하였으며, 이중 4례 모두 급성 T림프구성 백혈병에서 관찰되었다.

CDKN2유전자의 존재여부와 ALL환자들의 위험군(risk group)과의 연관성을 살펴보면 대부분 고위험군(high risk) 백혈병환자들에서 CDKN2유전자의 결손이 동반되었다²⁰⁾. 따라서 이 유전자의 소실은 진단당시 연령(1세 미만, 10세 이상), 높은 백혈구치와 T세포 표현형 등과 더불어 예후불량인자(unfavorable prognostic factor)와 연관이 높은 것으로 보고되었다¹⁸⁾. 또한 Kees 등¹⁸⁾은 소아 ALL환자 48명중 9명(18.3%)에서 CDKN2유전자의 동형접합 결손이 동반되었으며 이 환자 중 T-세포형이 62.5%, B세포계열이 10%이었다고 하였다. 유전자 결손이 동반되지 않은 환자군은 4년 무병

생존율이 85.3%인데 비하여 유전자 결손 동반군은 26.7%로써 CDKN2유전자 결손이 동반된 ALL 환자의 생존율은 결손이 동반되지 않은 환자보다 생존율이 낮았다고 보고하였다.

소아 ALL환자에서 유전자의 동형접합 결손과 재발률 및 생존율과의 관계도 같이 조사한 바에 의하면 결손이 동반된 환자들은 재발률(risk factor=14.0)이 높고 사망률(risk factor=15.6)도 높은 등 예후불량과 연관성이 높은 것으로 조사되었다. 성인 T세포 ALL환자에서는 24.6%에서 유전자 결손이 동반되었으며 역시 성인 T-ALL환자에서도 결손 동반 환자군에서 생존율이 낮았으며 예후불량인 자로서 신뢰도가 높은 것으로 보고하였다^{16,21)}. 점 돌연변이가 발견된 본 환자의 경우도 조기 재발되어 사망하였다.

Drexler 등⁸⁾은 그동안 발표된 논문들을 종합한 결과 CDKN2유전자 결손은 ALL환자에서 30% 이상에서 발생하며, T-ALL환자는 50% 이상에서, B cell precursor ALL환자는 20%에서 동반되는 것으로 조사되었다. 급성 골수성 백혈병(Acute myeloid leukemia, AML)환자에서는 CDKN2유전자 결손의 빈도가 646명 중 13명 즉 2% 정도에서만 보고될 정도로 매우 낮은 빈도에서 나타나고 있다. 본 연구에서도 20명의 AML환자에서 결손의 빈도도 낮은데 점 돌연변이는 발견되지 않았다. ALL에 비하여 만성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군에서는 이 유전자의 결손빈도가 매우 낮은 것으로 보고되었다. 동형접합 결손도 세포주(cell line)보다 일차 종양 세포에서 빈도가 낮으며¹²⁾, 일차 종양세포에서 점 돌연변이의 빈도도 악성 흑색종과 췌장암을 제외하고는 매우 낮은 것으로 보고되었다²²⁾.

Qari 등²³⁾은 46명(이중 6명 T-ALL포함)의 ALL 환자에서 multiplex PCR검사법을 통하여 p16유전자의 돌연변이를 조사한 결과 1명에서 nucleotide 273번에서 G→A transition을 발견하여 빈도가 매우 낮았음을 보고하였다. Maloney 등²⁴⁾은 18명의 재발된 소아 ALL환자에서 처음 진단시와 재발시의 골수세포에서 CDKN2유전자의 결손을 조사하

였다. 이중 4명에서 진단당시와 재발시에 유전자 결손이 발견되었으며, 나머지 14명 중 3명에서는 진단시 동형접합 결손, 2명은 재발시에만 결손이 발견되었다. 따라서 소아 ALL환자에서 CDKN2유전자의 기능상실은 재발된 소아 ALL환자에서 병의 진전에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.

그러므로 CDKN2유전자는 세포주기내의 positive regulator인 CDK4와 CDK6를 후기 G1/S이행기때 억제시킴으로써 종양억제 유전자의 역할을 하는 것으로 평가되고 있다. CDKN2유전자의 불활성화는 소아 ALL환자 특히 T 세포 면역형에서 대부분 결손이 발생하여 일차 소아 백혈병환자에서 carcinogenesis를 이해하는 데 도움이 될 것으로 평가하고 있다. 아쉬움은 일차 백혈병세포에서 점 돌연변이의 빈도가 낮은 점인 데 앞으로 더 많은 증례에서 조사가 이루어지고, 결손이 동반된 환자에서 임상적으로 예후와의 연관성을 밝혀서 예후인자로서의 의미도 함께 연구가 되어야 할 것이다.

요 약

목 적: 9번 염색체 단완 21부위(9p21)는 백혈병을 포함하여 각종 종양환자에서 결손과 재배열이 빈번히 발생하여 종양발생과정과 연관하여 한 개 이상의 암억제인자가 존재할 것으로 여겨지고 있다. CDKN2(p16) 유전자는 9p21에 위치하며, 이 유전자의 기능상실은 급성 림프구성 백혈병에서 가장 흔한 유전적 변형중 하나이며 백혈병 발생과정에서 중요한 역할을 하리라 생각되었다. 본 연구에서는 소아 급성 백혈병환자에서 DNA염기서열분석결과 CDKN2유전자의 돌연변이 빈도를 밝힘으로써 이 유전자의 돌연변이가 예후에 미치는 영향을 조사하는 데 목적이 있다.

방 법: 급성 백혈병으로 진단받은 30례를 대상으로 점 돌연변이를 분석하였다. 이들중 급성 림프구성 백혈병은 20례, 급성 골수구성 백혈병은 10례였으며, 염기서열분석은 PCR generated DNA sequencing방법을 이용하였다.

결 과: CDKN2유전자의 exon 1 절편에서는 돌연변이를 발견하지 못하였다. Exon 2 절편에서의 DNA염기서열 분석결과 T세포 급성 림프구성 백혈병환자 1명에서 nucleotide 364 (codon 122)에서 1개의 missense 돌연변이 (GGC→CGC, Gly→Arg)가 발견되었다.

결 론: 소아 급성 백혈병에서는 CDKN2유전자의 점 돌연변이는 매우 드문 편이다. 그러나 이 유전자의 불활성화는 특히 T세포 급성 림프구성 백혈병의 발생과정에서 중요한 역할을 하리라 짐작할 수 있다. 향후 더 많은 급성 백혈병환자에서 이 유전자의 변형에 대한 조사가 이루어져 변형이 동반된 환자에서 예후의 중요성을 평가하는 계기가 되기를 바란다.

참 고 문 헌

- Knudson AG. Mutation and cancer. *Adv Cancer Res* 1995;67:1-23
- Levine AJ. Tumor suppressor genes. *Bioassays* 1990; 12:60-6
- Harris CC. p53; at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993;262: 1980-1
- Liggelt WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998;16: 1197-206
- Rosenberg CL, Wong E, Petty EM, Bale AE, Tsujimoto Y, Harris NL, et al. PRADI, a candidate BCL-1 oncogene; mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;91: 9638-42
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-41
- Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16^{INK4}. *Science* 1995;267: 249-52
- Pollak C, Hagemeyer A. Abnormalities of the short arm of chromosome 9 with partial loss of material in hematological disorders. *Leukemia* 1987;1:541
- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994;368:753-6
- Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 1998;12:845-59
- Hussunssian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet* 1994; 8:15-21
- 양창현, 김길영, Perentesis JP. 장기 및 단기 배양된 HL60 세포주의 CDKN2 (p16^{INK4A}/MTS1) 돌연변이의 양상. *대한소아혈액종양학회지* 1995;2:259-65
- Yang CH, Perentesis JP. Novel CDKN2 (p16-INK4A) mutation in hematologic malignancies: Potential insight into the structural basis of cell cycle regulation. *Blood* 1995;86(suppl 1):748a
- Yang CH, Perentesis JP. Novel mutations of the CDKN2 gene in leukemia: potential insight into the structural basis of the CDKN2 action. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1996;37:590
- Van Kamp H, de Pijper C, Verlaan-de Vries M. Longitudinal analysis of point mutations of the N-ras proto-oncogene in patients with myelodysplasia using archived blood smears. *Blood* 1992;79:1266-70
- Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 1999;50: 401-23
- Qkuda T, Sharleff SA, Valentine MB. Frequent deletion of p16^{INK4A}/MTS1 and p15^{INK4B}/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995;85: 2321-30
- Kees UR, Burton PR, Lu C, Baker DL. Homozygous deletion of the p16/MTS1 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavorable clinical outcome. *Blood* 1997;89:4161-66
- 권정아, 이갑노. 급성 백혈병에서 CDK4I유전자의 동형 집합소실. *대한혈액학회지* 1998;33:322-33
- Cayuela JM, Hebert J, Signeux F. Homozygous MTS1 (p16^{INK4A}) deletion in primary tumor cells of 163 leukemic patients. *Blood* 1995;85:854
- Yamada Y, Hatta Y, Murata K, Sugawara K, Ikeda S, Mine M, et al. Deletions of p15 and/or p16 genes as a poor prognosis factor adult T-cell leukemia. *J Clin Oncol* 1997;15:1778-85
- Spruck CH, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, Simoneua AR, Lin MF, Gonzales F, et al. p16 gene in

- uncultured tumours. *Nature* 1994;370:183-4
23. Qari MH, Khalil SH, Kambouris M, Meza BF. Mutation of p16, p21 or cyclin dependent kinase 4 is rare in acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1998; 103:467-72
24. Maloney KW, McGavran L, Odom LF, Hunger SP. Acquisition of p16INK4A and p15INK B gene abnormalities between initial diagnosis and relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;93:2380-85
-