

癌症研究的新前沿——肿瘤形成的遗传抑制

Ruth Sager

DNA 损伤可引起染色体的异常，癌症就是从这一细胞病态过程开始的^[1-3]。绝大多数细胞对这一病态过程抗性很高，而大多数癌变起源于单个转化细胞，是单克隆性质的^[4]。因此，是否存在一类基因，其产物对细胞有保护作用，起维持基因组的稳定，维持细胞、特别是人类细胞正常行为的功能呢^[4a]倘若这类基因存在得以证实的话，便可利用它们去抑制畸变的细胞。

不少证据表明，对肿瘤生长有抑制作用的基因是存在的。此文旨在总结这些事实，对证实及克隆这类基因的实验途径加以讨论，并对其作用机制作一解释。首先，应重新评价那种认为单个或两个能促进肿瘤生长的癌基因的活化足以使正常细胞成瘤的看法^[5,6]，及应重新考虑所谓癌基因遗传上呈显性的含义。

癌形成的多阶段性

人体成癌过程是多阶段的观点已被公认^[7]，证据很多。最令人信服的证据有以下几个方面：1. 首先被临床医师观察到，而后由病理学家仔细研究过的癌发生的长时性^[8]；2. 对于人上皮细胞癌形成的年龄-发病率资料的统计学分析提示该过程包括几个相互独立的事件^[9]；3. 细胞遗传学证据表明大多数肿瘤细胞有多种染色体异常，并在肿瘤生长及演进(*progression*)过程中染色体畸变加剧^[1-3]。在某些癌症中，癌基因位于染色体易位的断裂处，由此可见染色体重排在成癌过程中起决定性作用是可信的。以染色体不稳定为特征的遗传病患者伴有癌高发的倾向^[2]，提示 DNA 损伤在癌变过程中起决定作用。

癌发生的“单癌基因”的观点^[11]是以肿瘤或 RNA 肿瘤病毒的癌基因使非整倍体的啮齿类细胞株得以转化的结果为基础的。然而，正象以往众多的批评所指责的，该受体细胞已低程度地转化了。其基因组不仅是非整倍体的，且已广泛地重排了。由此，要确定染色体变化是实验过程中所产生的还是与细胞转化有关的是不可能的。

以新近分离出的啮齿类细胞代替建株的细胞所进

行的研究的结果使人们提出了癌发生的“双癌基因学说”^[5]。*ras* 基因转染不足以使早期传代的小鼠胚胎纤维母细胞转化，但当其加上其他几种癌基因中任一种时则可使该细胞转化，且导致肿瘤发生^[5]。在实验中，人们或许已对染色体进行研究，去寻找集落形成以及成瘤过程中基因组所发生的附加变化。但这类结果从未被报道过。从而已有的证据并未肯定两个癌基因的参予即是细胞转化或肿瘤生成瘤中基因组改变的全部。对于那些用突变型 *ras* 基因引起早期传代的啮齿类细胞恶性转化的报道^[6]也可以提出同样的质疑。

Oshimura 等^[12]对刚分离出的叙利亚仓鼠胚胎纤维母细胞进行研究，观察到与由 *c-H-ras* 及 *c-myc* 引起的转化相关的染色体变化：染色体重排发生在几个位点上，提示在基因表达上还有一些其它的变化。令人瞩目的是 6 株由 *ras/myc* 转化的细胞株均丢失一条 15 号染色体。以多瘤病毒转化的此类细胞为材料的研究结果为：5 株中 4 株细胞有假双倍体(其染色体为正常双倍体数 44 的异常核型)。

本实验室工作表明，由包括用变异型 *c-H-ras* 转化在内的任一方式转化的原为双倍体的中国仓鼠胚胎纤维母细胞株中，均有染色体的重排^[13-16]。此外，用带有选择性标记基因而无癌基因的质粒 DNA 转染该种细胞亦可导致所谓“一击即发性”(hit and run)集落的形成及肿瘤生成^[17]。这类转化细胞株均有染色体的重排。上述结果以及其它相关结果均表明染色体变化在实验系统中的重要性。这些染色体畸变可能并不表明专一的遗传上的改变，而仅是基因组进一步变化的早期指征。

癌基因是否呈显性?

癌基因呈显性的观点是以转染实验，即将克隆的基因导入到适合的受体细胞，引起细胞转化的事实为根据的。与经典遗传学上杂交(*cross*)不同：导入的基因可以多拷贝的形式整合于宿主细胞中，或由于外源的启动子或增强子而使其转录水平较其在正常细胞内环境中的为高。这不仅与遗传学上的杂交不同，甚至与体细胞融合的情形也不同。因而用经典遗传学的术

语来讨论癌基因是否显性是不恰当的,且可引起误解。事实上,细胞融合实验(下面将要进行讨论)证据表明癌基因呈隐性。正常细胞与肿瘤细胞融合而成的杂种细胞并无转化细胞的表型和成瘤能力。

对肿瘤形成能力的抑制

在本节中打算按照目前对生长控制及癌发生的看法,重新对肿瘤抑制基因的有关事实进行评价。并阐述在癌发生中抑制基因与促进生长基因作用同等的观点。

鉴定抑制基因的重要性首先有助于理解这类基因在生长控制和分化中的作用,以及与癌基因所起的相反的作用。这些基因的活性必须受抑,肿瘤方可发生,这种受抑是癌发生的遗传脚本的部分内容。另一个意义在于,抑制基因用之于临床的潜在前景,原则上,该类基因可提供一种阻止肿瘤形成的无毒害的方法。

杂交细胞的肿瘤抑制

Boris Ephrussi^[19]、Henry Harris 和 Gorge Klein 及其合作者^[19]的早期工作为采用体细胞遗传学方法分析肿瘤发生奠定了基础。其基本方法是将正常细胞与成瘤性的或源于肿瘤细胞(NXTu)融合,借助亲代细胞的遗传标记将杂交细胞选出,扩大培养后注入到免疫性适合的动物体内,观察肿瘤形成的情况。

Harris 与 Klein 报道,多株小鼠肿瘤细胞与刚分离出的正常小鼠细胞或从 L-细胞衍生的细胞株融合所产生的杂交细胞的成瘤性受到了抑制^[20]。他们注意到传代后期的杂交细胞恢复成瘤性的倾向与其染色体丢失频率的增高相吻合。作者认为正常细胞有一个或几个呈显性的抑制基因,随染色体消减而丢失,由此杂种细胞的成瘤性恢复。当时尚未应用染色体分带技术,因而无法鉴定出与抑制基因有关的染色体。

Ephrussi 等的工作得出了相反的结论,杂交细胞有成瘤能力,肿瘤基因呈显性^[18]。不过,他们是用长期传代的杂交细胞进行动物实验的。Harris 等采用杂交细胞速选法而得到了仅传几代的杂交细胞群,及时地将它们用于实验。结果是该杂交细胞群的成瘤性受抑,由此推理,肿瘤基因呈隐性^[20]。

采用染色体分带技术,Harris 检查了上述由正常纤维母细胞与 4 种可移植性肿瘤间的融合细胞^[21]。以着丝粒作为标志,他们将源于恶性亲代细胞 4 号染色体与被认为带有抑制基因的正常纤维母细胞的 4 号染色体区别开。得出了小鼠的第 4 号染色体存在一个抑制基因的结论。

与过去十五年中不少工作者所显示的肿瘤抑制现象相反,其他工作者在类似研究中得出相反的结果。其中一些实验受累于实验本身的缺陷^[22]。不过,即使在设计完善的研究中,也未解决染色体丢失及不稳定的问题。检出成瘤性与否往往取决于是否一旦有足够的细胞即进行动物实验。在种间细胞融合实验中,染色体丢失迅速且广泛,这亦见之于种内细胞间的融合实验。带有抑制基因的染色体均可在上述实验系统中丢失。某些细胞对之间的融合较其它对更容易确立对成瘤性的抑制。此外,在没有成瘤性的大细胞群体中几个有成瘤性的细胞即可在实验动物中产生肿瘤,而要观察到成瘤性的受抑则需要所有细胞均无成瘤性。因此,在染色体不稳定的杂交细胞的一对亲代细胞之间证实成瘤性受抑是不大可能的。这样,证实肿瘤抑制远比否定肿瘤抑制的结果有说服力。

对成瘤性有抑制作用的杂交细胞染色体的丢失有助于对抑制基因在特定染色体上进行定位。小鼠 4 号染色体载有一个抑制基因的结论就是以该染色体的存在与抑瘤能力的相关现象为依据的^[21]。

Stanbridge 等在由 HeLa 细胞与正常纤维母细胞融合而成的人的杂交细胞实验中,表明一条 11 号及 14 号染色体丢失与成瘤能力的恢复相关^[23,24]。HeLa 细胞与人纤维母细胞的杂交细胞大都无成瘤性而且很稳定,从而上述研究仅限于 4 株有成瘤性的细胞。Klinger 及 Shows^[25]将有成瘤性的中国仓鼠细胞(CHO)与正常的人成纤维母细胞进行融合,以确定成瘤性受抑的杂交细胞在成瘤过程中丢失的染色体,发现人的 2 号染色体在成瘤过程中丢失,9, 10, 11 与 17 号染色体的出现率极低。11 号染色体上的片段在 Wilm's 瘤中也丢失了^[26]。而且其长臂与短臂上其它位点也被证实与其它一些癌症相关^[27]。

这些是一些有关种间肿瘤抑制以及带有肿瘤抑制基因的染色体性质的范例。然而,某些基因可能仅在种间而不在种内杂交细胞中起抑制肿瘤的作用。例如在人-中国仓鼠杂种细胞中,人的 2 号染色体有肿瘤抑制活性^[25],而在人-人杂交细胞中则否^[23]。

此外,在正常的人纤维母细胞与无锚着依赖性(anchorage-independent)BHK 细胞(一种叙利亚仓鼠细胞株)的杂交细胞中,人的 1 号染色体对锚着不依赖性有抑制作用^[28]。而在 Stanbridge 及 Klinger 的 HeLa 杂交细胞的实验中,以成瘤性而不是锚着不依赖性作为指标,1 号染色体就没有抑制作用。不过,锚着不依赖性与成瘤性的相关也仅见于某些肿瘤细胞株中。

对病毒转化基因的抑制

病毒或癌基因诱发的以及自发的成瘤性均可在杂交细胞中受到抑制。笔者在用经 SV-40 病毒转化的有成瘤性的 Balb/c 3T3 细胞与无成瘤性的同类细胞杂交所得的杂交细胞的研究表明, 一些杂交细胞虽有 SV-40 DNA 与 T 抗原的存在, 但无成瘤性^[29-31]。从中克隆到了一些稳定的成瘤性受抑的亚株。这说明了 3T3 细胞带有抑制基因, 能够阻断 SV-40 病毒诱发的成瘤性。

正常的、无成瘤性的中国仓鼠胚胎纤维母细胞 (CHEF/18) 和由变异的 *c-Ha-ras* 基因转化的同一细胞间的杂交实验得出了类似的结论^[32]。大多数杂交细胞虽有 *c-Ha-ras* 基因的存在及 p21 蛋白水平增高, 但并无成瘤性。看来, 这一对成瘤性的抑制是在突变的癌基因产物蛋白存在下作用于转译后的水平上^[33]。另一例子是, *c-Ha-ras* 基因转染的正常的人二倍体纤维母细胞, 虽有转染的基因存在和 p21 蛋白水平的提高, 细胞表型仍为正常^[40]。

Gee 和 Harris 发现, 刚被 SV-40 病毒感染, 形态上已转化的小鼠胚胎细胞有抑制成瘤的能力^[34]。尽管根据低血清生长以及悬浮生长的细胞培养指标, 可判断这些细胞已被转化了, 但经多次传代或与刚分离出的小鼠成纤维母细胞融合后, 该细胞均不能在裸鼠中形成肿瘤。将其与黑色素瘤 PG 19 细胞融合所形成的杂种细胞亦无成瘤性。

细胞融合实验确实提供了间接而令人信服的证据, 证明有抑瘤能力基因是存在的。但在结果的解释上仍有困难, 主要由于实验方法上的两个局限性。一是杂交细胞染色体的不稳定会使抑瘤基因失活或使带有该基因的染色体丢失。二是从正常细胞大群体中检出单个肿瘤细胞不难, 但反之则不易, 要表明一细胞群体无成瘤性, 需要细胞在遗传上相当稳定, 但杂交细胞则大都不稳定。不过, 现已能对遗传上足够稳定的杂交细胞进行核型分析, 确定单个染色体是否带有抑制基因。

如果染色体丢失是轻度的, 肿瘤抑制可见之于种间和种内杂交细胞。这表明在 DNA 与蛋白质水平上, 抑制基因在进化中是高度保守的, 而且其抑制效应可发生在基因表达的从转录^[35]到转译后之间任一环节上^[29-33]。

与癌症相关的染色体缺失

家谱分析已证实一类在遗传上呈显性的癌症, 典型例子之一为视网膜母细胞瘤 (Rb)。Knudson 首先对

该瘤的遗传基础进行研究^[36,37], 最近他在一篇“展望性”评述中做了全面而且最新的总结^[38]。大多数遗传性 Rb 基因携带者会患一个或多个视网膜瘤。在所有二倍体的体细胞中, 位于第 13 号染色体 (13q14) 上的 Rb 基因的缺失或局部失活, 仅限于一条染色体上 (杂合状态)。肿瘤形成则需要失活的 Rb 基因的纯合化。这一纯合化见于视网膜发育过程中单个或几个细胞中, 结果在婴儿或幼儿时发生肿瘤。纯合化可通过下列几种中任何一机制来实现, 这包括染色体不分离及随之而来的染色体缺失、重组以及突变^[39]。染色体不分离看来是远为频繁的异常的有丝分裂过程。利用限制性内切酶多态性进行染色体图谱分析, 显著地提高了对这一异常过程的检出率^[40,41]。

引起失活 Rb 基因纯合化的事件可能不仅仅局限于视网膜细胞, 也可见于其它体细胞中。在那些曾患有儿童期 Rb 的人群中, 不同来源的次发性肿瘤, 最常见的为骨肉瘤的发生频率远较正常人群为高^[42]。目前所研究的 Rb 病人的骨肉瘤结果表明, 与 Rb 细胞情况相似, 骨肉瘤细胞的 Rb 区也纯合化了^[43]。幼儿期 Rb 以及成年期次发性肿瘤的时间特征, 以及 Rb 基因纯合的组织特异性, 均提示 Rb 位点的表达受分化过程的控制。在这一意义上, Rb 是与分化有关的基因, 它的失活阻断了已决定其分化途径的 (Committed) 细胞的终末分化, 引起细胞增殖。

正常的 Rb 基因的两个拷贝均丢失或失活是该肿瘤形成的必要条件。这表明 Rb 是一个肿瘤抑制基因。在细胞水平上, 它是个显性的肿瘤抑制基因。该基因的纯合隐性状态是肿瘤形成的前提。Rb 及其他类似的基因已被称为“隐性癌基因”^[38]。

在一些有关 Rb 的讨论中, 认为正常 Rb 基因的丢失是成瘤必需的遗传上的变化。不过, Murphree 与 Benedict 发现从切除的肿瘤中获得的 Rb 细胞还有其他非随机性的染色体畸变^[44]。Chaum 等 (1983) 总结说: 41 个 Rb 肿瘤中均有某种染色体畸变^[45]。常见的有, 染色体 1q 的三体化, i(6p) 染色体出现 (两个额外 6p 染色体出现), 6q 的丢失和 Rb 位点的缺失及 del(13) 即 (q12→14)。Benedict 对另 20 个 Rb 细胞株进行研究得到类似的结果^[46]。一些非随机性染色体的改变包括, 1q 的三体化; i(6p) 染色体的出现以及一条 13 号染色体的丢失。这些累及 1 和 6 号染色体的畸变也见于其他癌症^[47], 而且含有可能参于促进癌症形成的基因的染色体片段均有所增加。

就 Rb 而言, 成瘤可能不仅仅是 Rb 基因失活的

结果,且需要癌基因的增多或活化。肾 Wilm's 肿瘤是另一与染色体缺失相联系的有遗传发癌倾向的肿瘤。家谱分析,细胞遗传学与分子生物学定位研究证实有关的染色体变化为染色体 11p13 区域的突变或缺失并纯合化^[46-50]。

患 Beckwith-Wiedemann 综合症的儿童易患 Wilm's 肿瘤及其它包括肝母细胞瘤和横纹肌肉瘤在内的胚胎肿瘤^[51]。这些罕见的肿瘤均有杂合性的 11 号染色体的纯合化,而在其它无关的胚胎肿瘤中,则无此现象。Koufos 等认为 Wilm's 肿瘤的染色体位点或与其相关的大基因群编码着分化因子,该因子的丢失导致与 Beckwith-Wiedemann 综合症相关的发育畸型及肿瘤发生^[52]。有广泛分化功能的遗传位点也可在象神经纤维母细胞增生症那样的它种综合症中找到——分化缺陷伴有特定的肿瘤。许多发育上的异常与其相关肿瘤相互伴随而遗传^[38]。

神经纤维母细胞增多症是一类神经外胚层异常的病变,它是显性的,常易恶变。细胞的染色体不稳定,表现为对 X 光诱导的染色体畸变的敏感性提高^[52]。在对对照仅引起轻微变化的条件下,来自神经母细胞增多症患者的淋巴细胞则出现依赖于 X-射线剂量的缺口染色体,断裂、双着丝粒的环状染色体以及染色体断片。

业已明确的某些肿瘤的遗传倾向涉及在单个染色体位点上正常的和缺失的或突变的等位基因的杂合化,以及从其突变的等位基因纯合了的单个细胞产生出肿瘤。不过,在研究最多的 Rb 中,那些见于它种肿瘤的一些非随机性遗传变化也有出现。看来,与分化的控制有关的基因的丢失是否足以引起癌症仍有待于探讨。所谓的癌发生的遗传倾向很可能不仅涉及单个基因的丢失,而且还涉及基因组的不稳定性的加强,以致进一步改变基因表达的状态。(待续)

中国科学院上海细胞生物学研究所 朱景德 译

参 考 文 献

- [1] German, J. (ed.), 1974, *Chromosomes and Cancer*, 756 pp. New York: John Wiley & Sons.
- [2] German, J. (ed.), 1983, *Chromosome Mutation and Neoplasia*, 451 pp. New York: Alan R. Liss, Inc.
- [3] Rowley, J. D., and Ulmann, J. E. (ed.), 1983, *Chromosomes and Cancer: From Molecules to Man*, 357 pp. New

York: Academic Press.

- [4] Nowell, P. C. 1976, *Science*, 194: 23-28.
- [4a] Sager, R. 1984, *Cancer Cell* 2: 487-493
- [5] Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. 1983, *Nature*, 304: 596-602.
- [6] Spandidos, D. A., and Wilkie, N. M. 1984, *Nature*, 310: 469-475.
- [7] Klein, G., and Klein, E., 1985, *Nature*, 315: 190-195.
- [8] Foulds, L., Ed. 1975, *Neoplastic Development*, 746 pp. New York: Academic Press.
- [9] Peto, R. Epidemiology, multistage models, and shortterm mutagenicity tests. In: H. H. Hiatt, J. D. Watson, and J. A. Winsten (eds.), 1977, *Origins of Human Cancer*, pp. 1403-1428. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [10] Rowley, J. D. 1984, *Cancer Res.* 44: 3159-3168.
- [11] Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., and Weinberg, R. A. 1982, *Nature*, 297: 474-478.
- [12] Oshimura, M., Gilmer, T. M., and Barrett, J. C., 1985, *Nature*, 316: 636-639.
- [13] Kitchin, R. M., and Sager, R., 1980, *Somatic Cell Genet.* 6: 615-629.
- [14] Kitchin, R. M., Gadi, I. K., Smith, B. L., and Sager, R. 1982, *Somatic Cell Genet.* 8: 677-689.
- [15] Gadi, I. K., Harrison, J. J., and Sager, R. 1985, *Somatic Cell Mol. Genet.* 10: 521-529.
- [16] Sager, R. 1984, *Harvey Lectures* 78: 173-190.
- [17] Lau, C. C., Gadi, I. K., Kalvonjian, S., Anisowicz, A., and Sager, R. 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 2839-2843.
- [18] Ephrussi, B. *Hybridization of Somatic Cell*. New Jersey: Princeton University Press, 1972.
- [19] Harris, H., Miller, O. J., Klein, G., Worst, P., and Tachibana, T. 1969, *Nature* 223: 363-368.
- [20] Harris, H., *proc. R. Soc. Lond. B.* 179: 1-20, 1971.
- [21] Evans, E. P., Burtenshaw, M. D., Brown, B. B., Hennion, R. and Harris, H., 1982, *J. Cell Sci.* 56: 113-130.
- [22] Sager, 1985, *Adv. Cancer Res.*, 44: 43-68.

- [23] Stanbridge, E. J., Flandermeyer, R. R., Daniels, D. W., and Nelson-Rees, W. A., 1981, *Somatic Cell Genet.* 7: 699-712.
- [24] Stanbridge, E. J., Dekker, C. J., Doeden, C. -J., Nishimi, R. Y., Peehl, D. M., Weissman, B. E., and Wilkinson, J. E., 1982, *Science* 215: 252-259.
- [25] Klinger, H. P., and Show, T. B., 1983, *J. Natl. Cancer Inst.* 71: 559-569.
- [26] Francke, U. Specific Chromosome Changes in the human heritable tumous retinoblastoma and nephroblastoma. In: J. D. Rowley and J. E. Ulmann (eds.), *Chromosomes and Cancer: From Molecules to Man*, pp. 99-115. New York: Academic Press, 1983
- [27] Yunis, J. J., 1983, *Science*. 221: 227-236.
- [28] Stoler, A. and Bouck, N., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 570-574.
- [29] Howell, N., and Sager, R., 1979, *Somatic Cell Genet.* 5: 129-143.
- [30] Howell, N., and Sager, R., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 2844-2847.
- [31] Howell, N., and Sager, R., 1981, *Cytogenet. Cell Genet.*, 31: 214-227.
- [32] Craig, R., and Sager, R., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 2062-2066.
- [33] Sager, R., and Craig, R., 1985, *Cancer Cell*, 3: 95-100.
- [34] Gee, C. J., and Harris, H., 1979, *J. Cell Sci.* 36: 223-240.
- [35] Dyson, P. J., Quade, K., and Wyke, J. A., 1982, *Cell* 30: 491-498.
- [36] Knudson, A. G., Jr., 1978, *Seminars in Oncology* 5: 57-60.
- [37] Knudson, A. G., Jr., 1983, *Prog. Nucl. Acids. Res. Mol. Biol.* 29: 17-25.
- [38] Knudson, A. G., Jr., 1985, *Cancer Res.* 45: 1437-1443.
- [39] Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., and White, R. L. 1983, *Nature*, 305: 779-784.
- [40] Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W., 1980, *Am. J. Human Genet.* 32: 314-331.
- [41] Cavenee, W., Leach, R., Mohandas, T., Pearson, P., and White, R., 1984, *Am. J. Human Genet.* 36: 10-24.
- [42] Abramson, D. H., Ellsworth, R. M., Kitchin, F. D., and Tung, G. 1984, *Opt-hamology* 91: 1351-1355.
- [43] Hansen, M. F., Koufos, A., Gallie, B. L., Phillips, R. A., Fodstad, O., Brogger, A., Gedde-Dahl, T., and Cavenee, W. K. 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 6216-6220.
- [44] Murphree, A. L., and Benedict, W. F. 1984, *Science*, 223: 1028-1033.
- [45] Chaum, E., Ellsworth, R. M., Abramson, D. H., Haik, B. G., Kitchin, F. D., and Chaganti, R. S. K., 1984, *Cytogenet. Cell Genet.* 38: 82-91.
- [46] Benedict, W. F., Banerjee, A., mark C., and Murphree, A. L. 1983, *Cancer Genet. Cytogenet.* 10: 311-333.
- [47] Shee, D., Spurr, N. K., and Solomon, E. 1984, *Cancer Surveys* 3: 543-566.
- [48] Koufos, A., Hansen, M. F., Lampkin, B. C., Workman, M. L., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Cavenee, W. K., 1984, *Nature*, 309: 171-172.
- [49] Orkin, S. H., Goldman, D. S., and Sallan, S. E. 1984, *Nature*, 309: n 172-174.
- [50] Reeve, A. E., Housiaux, P. J., Gardner, R. J. M., Chewings, W. E., Grindley R. M., and Millow, L. J. 1984, *Nature*, 309: 174-176.
- [51] Koufos, A., Hansen, M. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Lampkin, B. C., and Cavenee, W. K. 1985, *Nature*, 316: 330-334.
- [52] Hafez, M., Sharaf, L., El-Nabi, S. M. A., and El-Wehedy, G. 1985, *Cancer*, 55: 2434-2436.