

방광암의 c-myc 및 c-Ha-ras 암유전자의 유전표현

계명대학교 의과대학 비뇨기과학교실, 미생물학교실*

박철희 · 서민호* · 이성준

=Abstract=

Expression of c-myc and c-Ha-ras Oncogenes in Human Bladder Cancer

Choal Hee Park, Min Ho Suh* and Sung Choon Lee

From the Departments of Urology and Microbiology*, Keimyung University,
School of Medicine, Taegu, Korea

In order to elucidate the c-myc and c-Ha-ras oncogenes expressions in human bladder cancers, we examined twelve bladder cancer tissues, two normal bladder tissues and two blood specimens with Southern, Northern and Slot blot hybridizations. In Southern blot, all of the specimens showed 14 kilobase(Kb) c-myc band and 6.6kb c-Ha-ras band. No significant amplifications were observed in the levels of c-myc and c-Ha-ras DNA in cancer tissues. In Northern and slot blot, four bladder cancer tissues showed increased expression of c-myc RNA. No significant differences were observed in the levels of c-Ha-ras RNA expression between cancer tissues and normals. In conclusion, these findings support that quantitative increase in c-myc expression plays its role in the development of bladder cancers. Further studies about c-Ha-ras point mutation analysis and P21 ras protein analysis should be done to identify the role of c-Ha-ras in bladder tumorigenesis.

Key Words:Bladder cancer, c-myc, c-Ha-ras, Oncogene.

서 론

최근에 들어 분자생물학의 급속한 발달로 인해 과거에는 접근하기 어려웠던 암의 원인규명과 암화과정연구가 깊이있게 다루어지기 시작했다^{1~3)}.

암이란 세포분화 및 성장에 영향을 주는 환경적, 유전적, 기타 많은 원인에 의해 정상 조절기능에 변화가 초래되어 세포의 성장 및 분화의 규형이 깨어져서 발생하며, 분자생물학의 발달로 인해 암유전자가 깊이 관여함이 밝혀졌다^{4~5)}. 암유전자는 1969년 미국 NCI(National Cancer Institute)의 Huebner와 Todaro가 처음 기술하였으며, 암화과정에 관계되는 많은 단백질의 규명과, 이들을 자령하는 유전자 DNA의 규명 및 유전자 발현과정에 관여하는 많은 인자들의

본 논문은 1991년도 계명대학교 갑종연구비로 이루어졌음.

접수일자 1991년 10월 2일

연구를 통해, 세포의 분화 및 증식에 중요한 역할을 하는 유전자임이 알려졌다^{6~9)}. 정상적 세포성 암유전자가 암유전자로 활성화되는 분자생물학적 기전으로는 암유전자의 증폭, 점들연변이, 염색체 전위, promoter의 변화 등으로 인한 RNA 합성증가, 암단백질의 과발현 등이 보고되어 있다^{10~12)}.

암유전자의 발현연구는 암화과정의 이해뿐만 아니라 암의 감별진단 및 예후추정, 치료효과판정 등에도 큰 의미를 가진다.^{1,8,13~16)} 그중에서 c-myc 암유전자는 avian myeloblastosis virus에서 처음 발견되었는데, 소세포 폐암, 대장암, 유방암 및 자궁경부암 등에서 과발현이나 증폭이 보고되었으며, c-Ha-ras는 폐암, 대장암, 방광암, 전립선암 등에서 P21 ras 단백질을 통해 발암과정에 깊이 관여한다고 보고되어 있다.^{10,11,17~22)}

요로 상피세포의 변화로 초래되는 방광암은 임상적으로 흔히 볼 수 있는 비뇨기과 영역의 가장 중요한 암의 하나로서, 이에 대한 분자유

전적 연구가 전세계적으로 다각도로 진행되고 있으나 국내에서는 이에 대한 분자생물학적 분석이 흔치 않은 설정이다.^{10,11,20~23)} 저자들은 방광암 발생의 분자유전적 기전의 일부를 이해하고 방광암에 있어서의 c-myc 및 c-Ha-ras 암유전자의 증폭여부와 발현양상을 조사하여 방광암에 있어서의 암유전자의 역할을 파악하기 위해 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 조직 채취

계명대학교 동산의료원 비뇨기과에서 방광암으로 확진된 환자 12명으로 부터 경효도방광 절제술 및 방광전적출술을 통해서 신선한 방광암조직 12례를 얻었으며 그외에 2명의 정상인으로 부터 정상방광조직과 정상혈액을 각각 채취하여 실험하였다.

2. DNA 분리

암 조직 300mg정도를 잘라내어 Blin 및 Staf-ford의 방법으로 DNA를 분리하였다²⁴⁾. 즉 조직 100mg당 1ml의 Tris-EDTA buffer를 넣고 homogenator로 15,000rpm으로 3분간 조직을 분쇄하였다. 여기에 RNase 20μg/ml와 SDS(0.5%)를 넣어 섞고 37°C에서 1시간 전탕시킨후 proteinase K(100μg/ml)를 넣고 섞은 후 50°C에서 3시간 전탕시켰다. 이것을 Tris-saturated phenol로 1회, phenol-chloroform-isoamyl alcohol로 1회, chloroform-isoamyl alcohol로 1회 처리시켜 체단백 시킨후 0.2 volume의 10M ammonium acetate와 2 volume의 ethanol을 넣고 섞어서 DNA를 침전시켰다. 구부린 유리봉으로 DNA를 건져내어 70% ethanol로 세척후 500μl의 Tris-EDTA액에 녹인후 UV spectrophotometer에서 DNA의 순도측정과 정량검사를 실시한 후 4°C에 보관하였다.

3. 제한효소처리

분리된 DNA 10μg에 제한효소 30unit를 넣어 37°C에서 overnight 처리 시켰는데 c-myc을 위하여는 EcoRI, c-Ha-ras를 위하여는 BamHI를 각각 사용하였다.

4. DNA전기영동

제한효소로 절단된 DNA를 0.8% agarose gel과 Tris-borate-EDTA buffer를 사용하여 수평형 영

동장치로 10 Volt에서 24시간 영동하였다. 매 영동시마다 Hind III로 처리된 λ DNA를 size marker로 사용하였고 영동이 끝난후 gel을 ethidium bromide(0.5μg/ml)로 염색하고 UV transilluminator와 Polaroid camera로 촬영하였다.

5. Southern blot

사진촬영이 끝난 gel을 0.2N HCl 용액에 담그고 실온에서 10분간 진탕후 중류수로 잠시 씻고, 1.5M NaCl-0.5M NaOH 용액에 담그고 실온에서 1시간 전탕후 중류수로 잠시 씻고, 1.5M NaCl 1M Tris-hydrochloride액에 담그고 실온에서 1시간 전탕하였다. 그후 gel을 20×SSC (sodium chloride-sodium citrate)를 이용하여 nitrocellulose filter(0.45μm pore size)에 실온에서 약 15시간 blotting시킨 후 80°C 전공 oven에서 90분간 가열하여 고정시킨 후 비닐봉투에 넣어 밀봉하여 전공건조기에 보관하다가 hybridization을 실시하였다²⁵⁾.

6. RNA분리

암조직 300mg정도를 잘라내어 Chomczynski 및 Sacchi의 방법으로 RNA를 분리하였다²⁶⁾. 즉 4M guanidium thiocyanate buffer를 넣고 homogenator로 15,000rpm으로 3분간 조직을 분쇄후 phenol-chloroform-isoamyl alcohol로 처리후 원심분리하여 상청액을 새 tube에 옮기고, 동량의 2-propanol을 넣고 -20°C에 2시간 방치후 원심분리하여 RNA침사를 얻었다. RNA를 ethanol로 세척후 speed vac 건조기로 5분간 건조시킨후 300μl의 diethylpyrocarbonate로 처리된 중류수로 녹인 후 UV spectrophotometer에서 순도측정 및 정량검사를 실시한 후 -70°C에 보관하였다.

7. RNA 전기영동 및 Northern blot

Formaldehyde가 함유된 0.9% agarose gel을 제작하고 1×MOPS(3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) buffer를 사용하여, 한 lane당 RNA를 20μg씩 접종하여 30 Volt로 18시간 전기영동하여, nitro-cellulose filter(0.45μm pore size)에 4°C에서 약 15시간 blotting시킨후 80°C에서 90분 가열하고 비닐봉투에 넣어 밀봉하여 전공건조기에 보관하다가 hybridization을 실시하였다.

8. Slot blot

RNA를 formaldehyde로 변성시킨 뒤 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 μ g의 4단계로 희석한 뒤 Slot blot 장치를 사용하여 nitrocellulose filter에 vacuum blotting 시킨 후 80°C에서 90분간 가열하여 비닐봉투에 넣고 밀봉하여 진공건조기에 보관하

다가 hybridization을 실시하였다.

9. c-myc 및 c-Ha-ras probe 제조

Rigby등의 방법에 의해 hybridization용 probe를 제작하였다²⁷⁾. 즉, c-myc DNA와 c-Ha-ras DNA를 각각 nick translation에 의해 alpha-³²P-dCTP로 labeling시킨 후 sephadex G-50 spun

Table 1. Correlation between clinical data and oncogene expression of bladder tumor

Specimen	Age(yrs.)/Sex	Dx.	Stage/Grade	c-myc		c-Ha-ras	
				DNA	RNA	DNA	RNA
Pt. No. 1	68/M	T.C.C.	T3a/G2	N		N	-
2	51/F	T.C.C.	Ta/G3	N		N	-
3	74/F	T.C.C.	T1/G2	N		N(E)	-
4	67/M	T.C.C.	T1/G3	N		N	-
5	69/M	T.C.C.	T1/G2	N		N(E)	-
6	63/M	T.C.C.	T1/G3	N		N	-
7	63/F	T.C.C.	T3b/G3	N		N(E)	-
8	61/F	Adenoca.	T3b/-	N		N	-
9	64/M	Adenoca.	T4/-	N		N	-
10	62/F	T.C.C.	T2/G3	N		N(E)	-
11	65/M	T.C.C.	T3b/G3	N	I	N	N
12	57/M	T.C.C.	T1/G1	N	I	N	N
Control 1	63/M	-	-	N	N	N	N
2	61/M	-	-	N	N	N	N

N: not increased. I: increased. N(E): the extraband was observed.

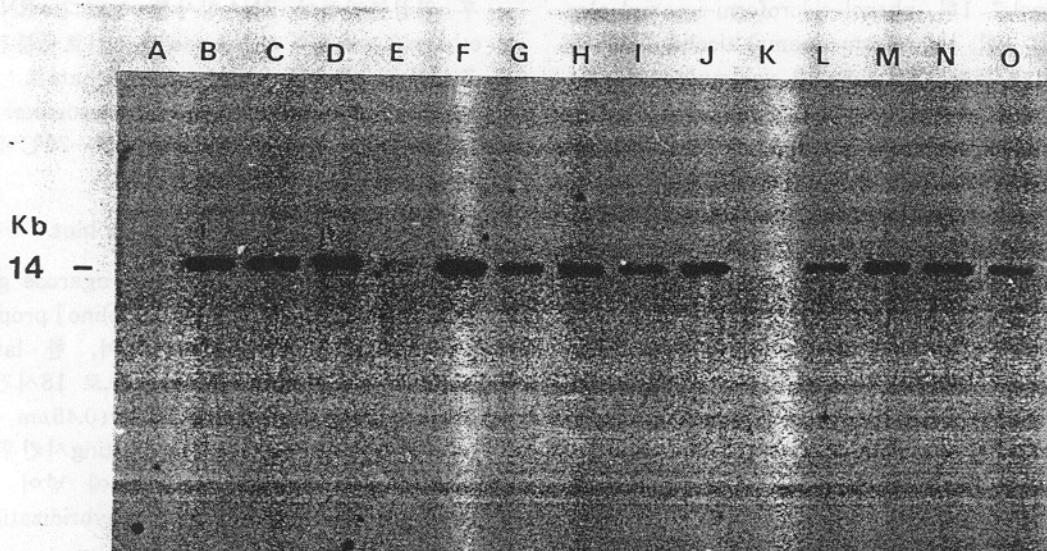


Fig. 1. Southern blot analysis of representative genomic DNAs from bladder cancer tissues digested with EcoRI and probed with the α -³²P-dCTP labelled c-myc third exon gene. Lanes A and K, λ DNA; lanes B and C, genomic DNAs from normal bloods; lanes D-J, and L-O, genomic DNAs from bladder cancer tissues.

column chromatography를 실시하여 순수한 DNA probe를 분리하여 사용하였다.

10. Hybridization 및 Autoradiography

Blot된 nitrocellulose filter에 0.75M sodium chloride, 0.075M sodium citrate, 0.1% SDS, 0.02% polyvinyl pyrrolidone, 0.02% Ficoll 400, 0.02% bovine serum albumin, 5% salmon sperm DNA 및 50% formamide를 함유한 용액을 넣고 42°C에서 16시간 prehybridization을 실시한 후 각각의 oncogene probe를 넣고 42°C에서 40시간 hybridization을 실시하였다. 그후 filter를 2×SSC와 0.5% SDS액으로 실온에서 5분, 2×

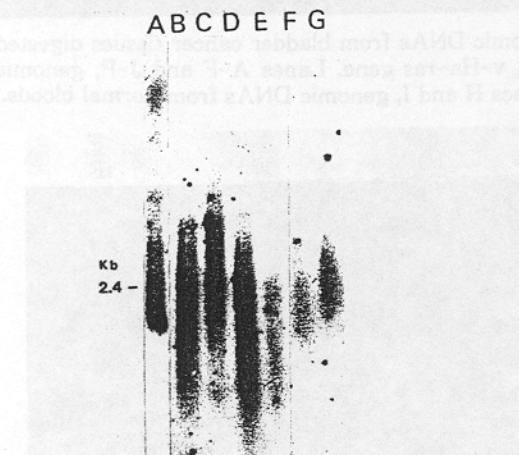


Fig. 2. Northern blot analysis of representative mRNAs from bladder cancer tissues probed with α - 32 P-dCTP labelled c-myc third exon gene. Lanes A-E, mRNAs from bladder cancer tissues; lanes F-G, mRNAs from normal bladder tissues.

SSC와 0.1% SDS액으로 실온에서 15분, 0.1×SSC와 0.5% SDS액으로 37°C에서 30분, 0.1×SSC와 0.5% SDS액으로 60°C에서 30분, 0.1×SSC액으로 실온에서 2분 세척후, 공기중에서 10분 건조시켰다. 그후 증감지가 장착된 X-ray 카세트 안에 X-ray 필름과 함께 넣고 -70°C에서 3-7일간 노출시킨 다음, 필름을 현상하여 판독하였다.

결 과

각 환자에 대한 기본적인 임상학적 특징과 함께 암유전자의 유전표현의 상호관계를 Table 1에 표시하였다. Fig. 1은 방광암조직 및 정상 혈액에서 분리한 DNA의 c-myc probe에 대한 Southern blot 결과를 나타낸 것이다. 14 Kilobase(Kb)에서 c-myc 유전자가 관찰되었으며 대조군에 비하여 뚜렷한 DNA의 증폭은 없었다. 방광암 RNA의 c-myc probe에 대한 Northern blot 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 2.4Kb에서 c-myc RNA가 관찰되었으며 방광암조직 4례에서 대조군에 비해 4-8배 정도의 c-myc RNA 발현 증가가 관찰되었다. Fig. 3은 c-myc probe에 대한 slot blot 결과를 나타낸 것으로, 역시 대조군에 비해 4-8배 정도의 RNA 발현 증가를 관찰할 수 있었다. Fig. 4는 c-Ha-ras probe에 대한 Southern blot 결과를 나타낸 것인데 6.6Kb에서 c-Ha-ras 유전자가 관찰되었으며 대조군에 비해 DNA의 증폭은 관찰되지 않았다. Fig. 5는 c-Ha-ras probe에 대한 Slot blot 결과를 나타낸 것으로, 역시 대조군에 비해 RNA의 증가는 관찰되지 않았다.

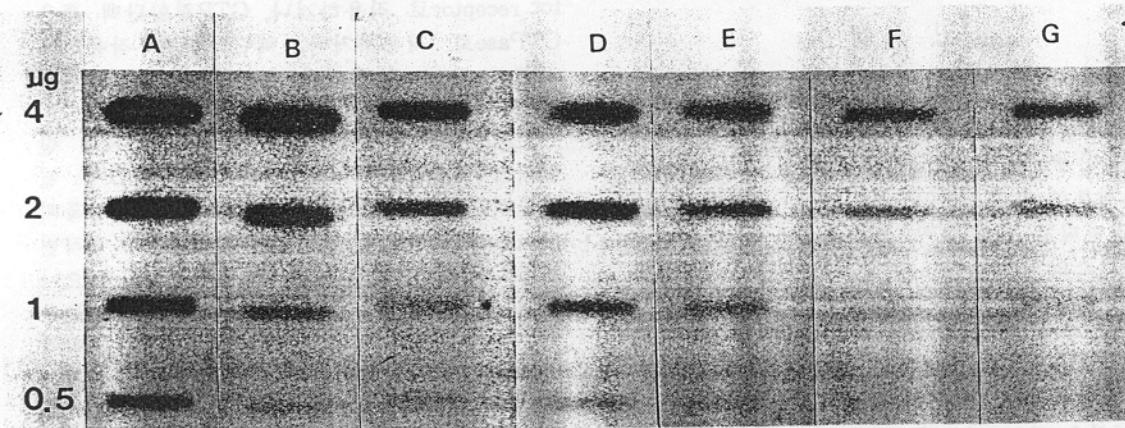


Fig. 3. Slot blot analysis of mRNAs from bladder cancer tissues probed with the α - 32 P-dCTP labeled c-myc genes. A-E, mRNAs from bladder cancer tissues; F and G, mRNAs from normal bladder tissues.

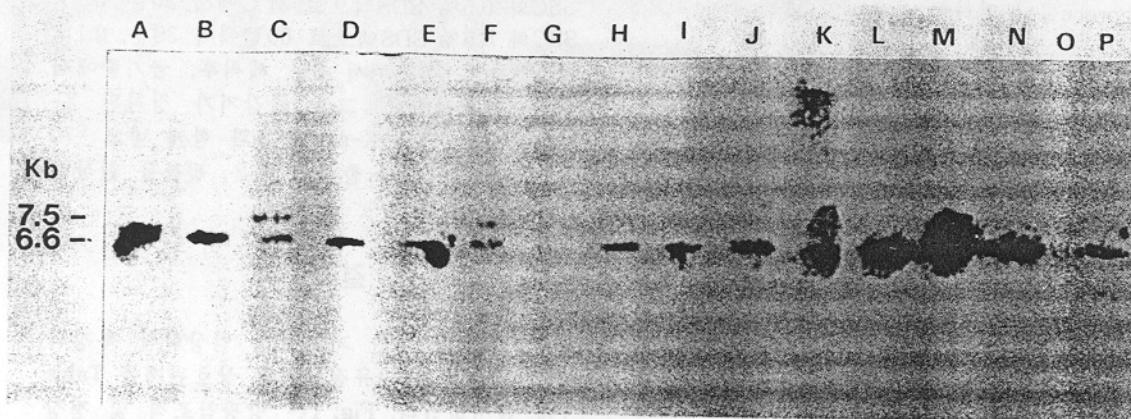


Fig. 4. Southern blot analysis of representative genomic DNAs from bladder cancer tissues digested with *Bam*HI and probed with the $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP labelled *v-Ha-ras* gene. Lanes A-F and J-P, genomic DNAs from bladder cancer tissues; lane G, λ DNAs; lanes H and I, genomic DNAs from normal bloods.

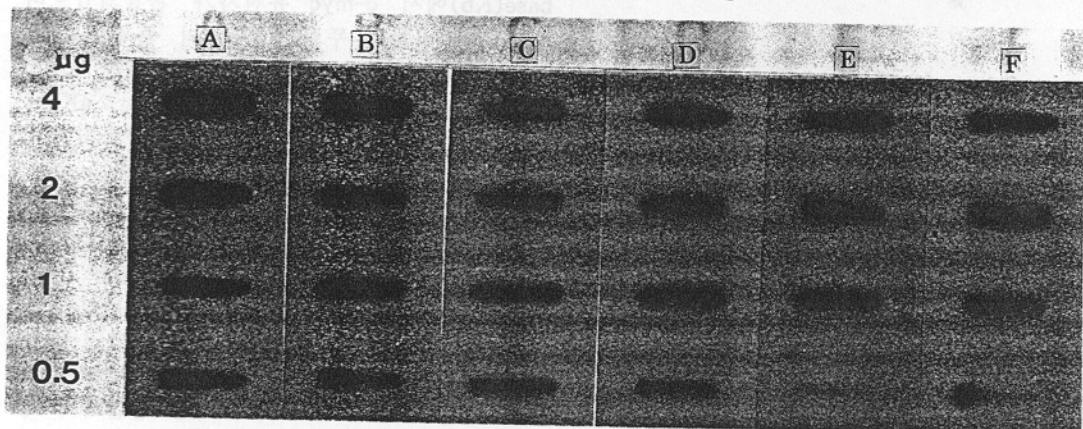


Fig. 5. Slot blot analysis of mRNAs from bladder cancer tissues probed with the $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP labelled *v-Ha-ras* gene. A-D, mRNAs from bladder tissues; E and F, mRNAs from normal bladder tissues.

고 찰

환경적 요인, 유전적 요인, 기타 많은 원인에 의해 세포분화 및 증식의 조절기능소실이 야기되어 발생된다고 추정되는 암은, 유전공학과 분자생물학의 급속한 발달에 의해 그 발생기전이 규명되고 있다^{1~3,28)}. 암유전자는 원래 RNA 바이러스의 일종인 retrovirus에서 발견되어 바이러스성 암유전자라고 불렸으나 그후 정상세포에도 존재한다는 것이 밝혀져 이를 세포성 암유전자라 부르게 되었다.^{1,4,13,29)} 암유전자는 세포의 분화 및 증식등의 고유한 기능에 중요한 역할을 하는 필수적 유전자로서 tyrosine kinase, serine-threonine kinase등의 protein kinase로 작용하거나, growth factor 혹은 growth fac-

tor receptor로 작용하거나, GTP결합단백 혹은 GTPase로 작용하거나, 핵단백질로 작용하여 세포의 분화 및 증식을 조절하는 기능을 가진다.^{2,5,8,9)}

소세포 폐암, 유방암, 자궁경부암 등에서 발현이상이 관찰되는 c-myc 암유전자는 DNA 결합단백을 지령하며, c-myc DNA 자체의 증폭이나 transcription 증가에 의한 mRNA의 양적변화가 종양발생에 관계된다고 보고되어 있으나 아직 자세히 규명된 바는 없다^{17~19)}. 저자들은 방광암에 있어서의 암유전자의 분자생물학적 역할을 파악하고자 방광암조직에서의 c-myc 및 c-Ha-ras 암유전자의 증폭여부와 유전자 발현양상을 조사하였다. Southern blot상에서 c-myc 암유전자의 증폭은 관찰되지 않아서 DNA 차원에서의 양적인 변화는 없음을 알 수 있었

다. 그러나 Northern blot과 Slot blot상에서 4-8배의 유전자 발현증가를 나타내어, 방광암발생의 한 원인으로서 c-myc 암유전자의 과발현이 관여함을 알 수 있었다. c-myc의 과발현이 viral promoter의 삽입으로 인한 것인지, gene translocation에 의한 것인지, 혹은 기타 원인인지를 밝히기 위해서는 추후 세포유전학적 검사, CAT(chloramphenicol acetyl transferase) assay, site directed mutagenesis등의 연구가 뒤따라야 하리라고 생각된다^{10,15,30)}.

그리고 c-Ha-ras 암유전자의 활성기전으로는 12번 혹은 61번 codon에 점들연변이가 생겨 그 결과 비정상적 ras 단백질이 산생되므로써 GTP결합단백 혹은 GTPase의 기능변화가 초래되어 세포의 신호전달체계에 변화를 일으키게 되는 것이라고 알려져 있다^{20~23)}. 본 연구에서도 c-Ha-ras 암유전자는 Southern 및 Slot blot상에서 대조군에 비하여 DNA증폭이나 유전자 발현증가(RNA합성 증가)가 관찰되지 않아서 간접적으로 외국보고자들의 견해와 일치하였다^{20~22)}. 그러나 방광암에서의 c-Ha-ras 유전자의 기능을 깊이 이해하기 위해서는 향후 c-Ha-ras DNA의 염기서열 분석을 실시하거나, oligonucleotide probe와 Southern blot 및 polymerase chain reaction(PCR)을 통한 점들연변이 여부를 조사해야 하겠고, Western blot이나 Immunohistochemistry를 통한 P21 ras단백질의 발현양상을 조사해야 할 것으로 사료된다^{23,31~33)}.

결 론

방광암에 있어서 c-myc 및 c-Ha-ras 암유전자의 유전자 발현양상을 조사하고자 계명대학교 동산의료원에 내원하여 방광암으로 확인된 12례의 암조직을 채취하고, 대조군으로는 정상방광조직 2례 및 정상 성인의 혈액 2례를 채취하여 실험을 실시하였다.

Southern blot상에서 14 kilobase(Kb)의 c-myc DNA가 관찰되었으며, 대조군에 비하여 양적인 차이는 보이지 않았다. Northern blot상에서 2.4Kb의 c-myc RNA가 관찰되었고, 방광암조직 4례에서 대조군에 비하여 4-8배의 양적인 증가를 보였다. Slot blot상에서도 역시 4-8배의 c-myc RNA의 양적 증가를 보여 c-myc 유전자의 과발현으로 인한 c-myc RNA의 증기가 방광암 발생의 중요한 부분을 차지할 것으로 생각되었다. 그리고 모든 방광암 조직에서

6.6Kb의 c-Ha-ras DNA가 관찰되었으며 대조군에 비하여 양적인 차이는 보이지 않았고, Slot blot분석에서도 대조군과 RNA의 양적인 차이를 관찰할 수 없어서, 방광암에서의 c-Ha-ras 유전자의 기능을 정확히 규명하기 위해서는 c-Ha-ras DNA의 염기서열 분석과 ras단백질의 발현 양상 분석이 필요하다고 사료된다.

REFERENCES

- 1) Bishop, J.M.: *The molecular genetics of cancer*. *Science*, 235:305-311, 1987.
- 2) Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A.: *Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis*. *Science*, 222:771-778, 1983.
- 3) Griffin, J.A.: *Recombinant DNA-potential for gene therapy*. *Am. J. Med. Science*, 289:98-106, 1985.
- 4) Cooper, G.M.: *Cellular transforming genes*. *Science*, 218:801-806, 1982.
- 5) Slamon, D.J., deKernion, J.B., Verma, I.M. and Cline, M.J.: *Expression of cellular oncogenes in human malignancies*. *Science*, 224:256-262, 1984.
- 6) Huebner, R.J. and Todaro, G.J.: *Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 64:1087-1094, 1969.
- 7) Weinberg, R.A.: *The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus*. *Science*, 230:770-776, 1985.
- 8) Ponten, J.: *Oncogenes for the oncologist*. *Acta Oncologica*, 1:3-12, 1987.
- 9) Friend, S.H., Dryja, T.P. and Weinberg, R.A.: *Oncogenes and tumor-suppressing genes*. *N. Engl. J. Med.*, 318:618-622, 1988.
- 10) Klein, E.A., Fair, W.R. and Chaganti, R.S. K.: *Molecular and cytogenetic events in urologic tumors*. *Seminars Urol.*, 6:2-21, 1988.
- 11) Olumi, A.F., Skinner, E.C., Tsai, Y.C. and Peter, A.J.: *Molecular analysis of human bladder cancer*. *Seminars Urol.*, 8:270-277, 1990.
- 12) Nowell, P.C.: *Molecular events in tumor development*. *N. Engl. J. Med.*, 319:575-577, 1988.
- 13) Knudson, A.G., Jr.: *Heredity cancer*, on-

- cogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.*, 45: 1437-1443, 1985.
- 14) Henry, J.A., Nicholson, S., Hennessy, C., Lennard, T.W.J., May, F.E.B. and Westley, B.R.: *Expression of the oestrogen regulated pNR-2 mRNA in human breast cancer: relation to oestrogen receptor mRNA levels and response to tamoxifen therapy.* *Br. J. Cancer*, 51: 32-38, 1989.
 - 15) Deisseroth, A.B.: *Newer methods of cancer treatment.* In: *Cancer*, 3rd ed. Edited by DeVita, V.T., Hellman, S. and Rosenberg, S.A. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., chapter 66, pp. 2413-2426, 1989.
 - 16) Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y. and Hammond, D.: *Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas.* *N. Engl. J. Med.*, 313: 1111-1116, 1985.
 - 17) Sheiness, D. and Bishop, J.M.: *DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus.* *J. Virol.*, 31: 514-521, 1979.
 - 18) Saksela, K., Bergh, J., Lehto, V.P., Nilsson, K. and Alitalo, K.: *Amplification of the c-myc oncogene in a subpopulation of human small cell lung cancer.* *Cancer Res.*, 45: 1823-1827, 1985.
 - 19) Alitalo, K. and Schwab, M.: *Oncogene amplification in tumor cells.* *Advances in Cancer Res.*, 47: 235-281, 1986.
 - 20) Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M.: *A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene.* *Nature*, 300: 149-152, 1982.
 - 21) Taparowsky, E., Suard, Y., Fasano, O., Shimizu, K., Goldfarb, M. and Wigler, M.: *Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change.* *Nature*, 300: 762-765, 1982.
 - 22) Fujita, J., Yoshida, O., Yuasa, Y., Rhim, J.S., Hatanaka, M. and Aaronson, S.A.: *Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours.* *Nature*, 309: 464-466, 1984.
 - 23) Viola, M.V., Fromowitz, F., Oravez, S., Deb, S. and Schlom, J.: *ras oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma.* *J. Exp. Med.*, 161: 1213-1218, 1985.
 - 24) Blin, N. and Stafford, D.W.: *A general methods for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes.* *Nucleic Acids Res.*, 3: 2303-2306, 1976.
 - 25) Southern, E.M.: *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517, 1975.
 - 26) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* *Ann. Biochem.*, 162: 156-159, 1987.
 - 27) Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.: *Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.* *J. Mol. Biol.*, 113: 237-251, 1977.
 - 28) Rupp, G.M.: *Molecular biology and medical Science.* *N. Engl. J. Med.*, 319: 449-450, 1988.
 - 29) Bishop, J.M.: *Cellular oncogenes and retro-viruses.* *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 301-354, 1983.
 - 30) Dryja, T.P., Rapaport, J.M., Joyce, J.M. and Petersen, R.A.: *Molecular detection of deletions involving band p14 of chromosome 13 in retinoblastomas.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7391-7394, 1986.
 - 31) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467, 1979.
 - 32) Mueller, P.R. and Wold, B.: *In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR.* *Science*, 246: 780-786, 1989.
 - 33) Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Mueller, P.R., Wold, B. and Riggs, A.D.: *Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR.* *Science*, 246: 810-813, 1989.