

肺癌患者雙微染色體 (mdm2) 短小變異之探討

Alternative splicing of MDM2 in lung cancer

計畫編號：NSC89-2314-B-040-035

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：柯俊良 中山醫學院毒理所

一、中文摘要

MDM2 為人類的致癌基因，在一些腫瘤組織中經常可以發現MDM2基因的異常表現。而台灣肺癌中也發現，男性MDM2發生缺失的比例較女性高，同時在透過對肺癌組織的分析，經由篩選後選用6種不同短小缺失的MDM2，依其長度命名，分別為MDM2-1181、MDM2-1026、MDM2-1025、MDM2-891、MDM2-657、MDM2-259，並利用基因選殖的方式將上述短小缺失的MDM2與表現載體pCDNA3.0或pCDNA-HA進行接合反應，再利用DNA轉染的方式和MDM2 p53-dependent promoter一起表現於H1299/p53wt肺癌細胞株中，觀察這些短小缺失的MDM2在細胞中調控p53的情形，來分析其對於肺癌細胞可能造成的影響。結果顯示MDM2-891的luciferase表現情形與MDM2-1476相差無幾，而其它形式的MDM2則普遍低下。再進一步轉染MDM2-891、MDM2-1476及p19^{ARF}質體DNA至H1299/p53wt肺癌細胞中並以西方轉漬法去分析p53wt表現的情形，結果顯示在單獨轉染MDM2-1476的情況下，細胞內p53蛋白明顯的減少；而在單獨轉染MDM2-891的情況下，p53的量並無明顯減少；接下來更進一步選用MDM2-657、MDM2-891與MDM2-1476質體DNA，並利用*in vitro* translation方式得到其所轉譯出的蛋白，其蛋白大小依序為24.4 kDa、24 kDa與55.2 kDa，再與使用大腸桿菌所表現純化而得到的p53蛋白去進行免疫沉澱分析，發現三者對於p53蛋白均有結合反應，顯示在此兩類缺失型的胺基酸序列中尚有一未發現的部位仍具有與p53結合的能力。

關鍵詞：MDM2、p19ARF、p53

Abstract

The mdm2 is an oncogene that is activated by overexpression in several human tumors. In Taiwan, some distinct MDM2 mRNA transcripts including full-length RNA, splicing MDM2 forms, were detected in lung carcinomas by Nested-PCR and the ratio of MDM2 deletion mutants in male were higher than in female. To understand the biological function of the splicing MDM2 forms that may play the role in tumorigenesis, We had also cloned several splicing MDM2 protein translations(MDM2-1181,MDM2-1026,MDM2-1025,MDM2-891,MDM2-657,MDM2-259), and H1299/p53wt cell were transfected with these splicing MDM2 plasmids and MDM2 p53-dependent promoter. We analyzed the characterization with its ability to regulate p53 via luciferase activity assay. The result show, MDM2-891 exhibited the luciferase activity similar with MDM2-1476, but others was not. We present evidence to show if the MDM2-1476 and MDM2-891 expressed from their respective cDNA could degrade the wt p53. H1299/p53wt cells were transfected with MDM2-1476, MDM2-891 and p19^{ARF} plasmids and analyzed the expression of p53 protein by Western Blotting. These result show, p53 protein was degraded by MDM2-1476, but not degraded by MDM2-891. We analyzed the molecular weight of MDM2 truncated forms by *in vitro* translation and use the products to immunoprecipitate with p53 protein which is amplified from E.coli expression system and purified from Glutathione-Sepharose 4B affinity column. Our findings indicated the presence of the splicing MDM2 forms which

could bind to p53 protein. It showed that MDM2-891 and MDM2-657 might keep a series of unknown sequences which could bind to p53 protein. These observations suggest that MDM2 expression is altered in lung carcinomas and the cellular roles of these truncated MDM2 isoforms remains not to be clarified.

Keywords: MDM2、p19ARF、p53

二、緣由與目的

近年來，台灣地區的肺癌發生率已較 30 年前增加了近八倍，是增加最快的癌症之一，就其增加的速率估計，在二十一世紀初已成為國人發生率最高且預後相當差的癌症。而在近代分子醫學的分析中也發現，癌症的發生似乎與一些致癌基因的表現有關，其中過度表現的致癌基因 MDM2 也常被發現於肺癌病患的組織中，其重要的危險因子有待探討，因此要如何預防及延緩癌症的發生是現今最刻不容緩的事。

有鑒於肺癌對於國人所造成的傷害，因此本實驗室致力於探討分子致瘤機轉在癌症發生時所扮演的角色，希望對於癌症的治療與預防能有所助益。先前的研究以 Nested PCR 的方式分析肺癌病人的組織，發現肺癌病患的致癌基因 MDM2 有短小缺失的情形發生，因此本實驗進一步以此為依據構築質體 DNA 並送入細胞內，來探討短小缺失的 MDM2 對於抑癌基因 p53 轉錄活化功能及肺癌細胞生長週期的影響。

在本篇論文中，經由中山醫學院毒理所李輝教授實驗室，針對 117 位台灣地區非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者組織所做的分析得知，其中有 31 位患者發現其組織中除了有完整片段的 MDM2 mRNA 表現之外，尚有不同大小的 splicing form 表現，而 31 位患者當中有 26 位為 MDM2-657 的表現，其中男性病患發生 MDM2 短小缺失的頻率是女性的四倍。

本篇論文中決定選用 6 種短小缺失的 MDM2，依其大小命名為 MDM2-1181、MDM2-1026、MDM2-1025、MDM2-891、

MDM2-657、MDM2-259 等 6 種 MDM2 短小缺失的型態，來作為研究與分析短小缺失 MDM2 蛋白生理功能的標的。

由文獻得知，MDM2 為 p53 的下游基因而兩者之間存在著相互調節的關係，所以特地選用 MDM2 p53-dependent promoter 來觀察短小缺失的 MDM2 調控 p53 的情形，來探討其生理功能與完整 MDM2 有何差異？並以細胞群落形成效率來分析短小缺失 MDM2 對於細胞生長的影響，是否因為缺少了和 p53 的結合部位而導致調控 p53 的能力降低使得細胞發生癌化的機率提高？

三、材料與方法

1. *In Vitro* Translation

本實驗是採用由 Promega 所推出的一套 TNT[®] Quick Coupled Transcription / Translation System 來進行蛋白的轉譯，其實驗的步驟如下：

將實驗所需的 reagents 至零下 70°C 的冰箱中拿出，置於冰上待其退冰。

TNT Quick Master Mix 40 μ l, [³⁵S] methionine (1,000Ci/mmol at 10mCi/ml) 2 μ l, plasmid DNA template (1 μ g/ μ l) 1 μ l, Nuclease-Free Water to a final volume of 50 μ l。於 30°C 下反應 60 分鐘，當反應完成後可以用 SDS-PAGE 分析，待分析完畢後，可將膠抽乾，直接壓片 12 小時即可觀察到新合成的蛋白。

2. Luciferase 活性測定

由於在進行細胞轉染實驗時，轉染的效能並不會完全一樣，所以在測定 Luciferase 活性前要先將 β -galactosidase 的濃度體積定成一樣，再取細胞萃取液 20 μ l，經由 TD-20/20 Luminometer 冷光儀器進行分析，所使用的 Luciferase substrate 乃購自 Promega 公司。首先，將細胞萃取液 20 μ l 放入冷光儀後，經由儀器自動注入 80 μ l 的 substrate，反應 3 秒鐘後，自動偵測 10 秒內所放出的螢光，之後將所得之數值經由統計分析，本實驗結果皆經由三次以上個別的實驗得到平均差及標準差，而量化的結果經由統計分析法加以分析，並檢測其差異性。

3. 免疫沉澱法分析

在實驗進行前，我們先將 *in vitro translation* 的產物以 12.5% 的 SDS-PAGE 分析，再以數位顯影系統去分析其蛋白的表現量，並以此來作為蛋白定量的依據，而在進行免疫沉澱之前，我們先取 50 mg 的 protein A 並以 wash buffer I (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl PH 8.0, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.05% SDS) 清洗 3 次，最後溶成 100mg/ml；接著加入 2 μ g/ml 的 p53 一次抗體 (DO7) 於室溫下和 protein A 反應一小時，而在此同時我們取 1/5 體積之 protein inhibitor 加至 *in vitro translation* 的產物中並於室溫下反應 10 分鐘，再取 5 μ g 的 p53 蛋白 (由大腸桿菌純化所得) 與 *in vitro translation* 的產物於 30°C 下進行結合反應 30 分鐘；接著將反應完之 protein A 取 40 μ l 加至上述的反應中並於 4°C 下進行結合反應 5 小時，待反應結束後以 wash buffer II (0.7 M NaCl, 0.5% NP-40, 5mM EDTA, PH 8, Tris-HCl PH 8) 清洗 3 次，離心後將上清液丟掉，並加入 sample buffer 20 μ l 於 95°C 下 denature 5 分鐘，最後以 12.5% SDS-PAGE 分析，並將膠抽乾直接進行自動放射顯影約 3-5 天，即可觀測 MDM2 與 p53 結合的情形。

4. Western blot

首先製備凝膠 12.5%，以每個 well loading 20 μ g 蛋白樣品，先用 90 volt 跑 10 分鐘，再用 110 volt 跑 80 分鐘，直到樣品接近底部即可停止。在膠快跑完前 10 分鐘，可先準備一張大小恰當的 PVDF membrane amersham pharmacia biotech，先用甲醇洗一下 (約 15 秒)，再換成清水振盪 1 分鐘之後泡於 transfer buffer 中。將膠卸下後，同時與 PVDF membrane 及兩片大小相同的 3M 濾紙一起浸在 transfer 緩衝溶液中。利用濕式轉漬法以 100 V、120 分鐘，將膠上的蛋白以負往正極的方式轉移到 PVDF membrane 上。將 transfer 好的 PVDF membrane 浸在含 2% 脫脂奶粉 (skim milk) 的 1xTTBS 緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.2% Tween 20, 150mM NaCl, PH 7.5) 中，振盪 60 分鐘。接著加入可辨識欲觀察蛋白

的一次抗體 anti-mouse (IF2 或 SMP14 或 HA-prob)，以 250 倍含 1% 脫脂奶粉 (skim milk) 的 1xTTBS 緩衝溶液稀釋，於 4°C 經過一夜振盪或室溫振盪 1.5 小時。Anti- β -actin mouse 以一萬倍稀釋，作用條件同上 (抗體加入 1/100 的 2% sodium azide 可回收在利用)。將處理完一次抗體之 PVDF membrane 用含 2% 脫脂奶粉 (skim milk) 的 1x TTBS 緩衝溶液清洗兩次 (5 分鐘/次)。接著在室溫下用 anti-mouse IgG 之二次抗體反應 1 小時。將處理完二次抗體之 PVDF membrane 用含 2% 脫脂奶粉 (skim milk) 的 1x TTBS 緩衝溶液清洗兩次 (10 分鐘/次)，再用不含脫脂奶粉的 1x TTBS 緩衝溶液清洗兩次。利用 E.C.L 呈色劑 (Amersham RPN 2106)，將經過抗體作用之蛋白影像呈現在 X-光底片 (Kodak Science Imaging Film) 上，約 15~30 分鐘。

四、結果與討論

選殖 mdm2 短小變異基因

將從菌中抽出 MDM2-isoforms 接合於 pCDNA3.0 表現載體的 DNA，經由 BamHI 和 EcoRI 限制酶同時於 37°C 作用 2 小時後，以 1.5% Agarose gel 電泳分析所得之結果 (圖一)。本實驗進一步以 *in vitro translation* 的方式來說明所構築的 MDM2 質體 DNA 確實能轉譯出其所相對應的蛋白大小，以便能與免疫細胞染色法及序列定序的結果相互對照，因此採用以 ³⁵S 標記的甲硫胺酸與所構築的 MDM2 質體 DNA 及 reticular lysate 於 30°C 下反應 60 分鐘來進行 *in vitro* 的蛋白合成，最後以 SDS-PAGE 來分析結果，其轉譯出的蛋白大小分別為 MDM2-1476 : 90 kDa ; MDM2-1181 : 8.5 kDa ; MDM2-1026 : 11.5 kDa ; MDM2-1025 : 14.6 kDa ; MDM2-891 : 24 kDa ; MDM2-657 : 24.4 kDa ; MDM2-259 : 10 kDa (圖二)。

分析短小變異的 MDM2 對於 p53 蛋白轉錄活化能力之調控

為了要了解短小缺失的 MDM2 是否會因為喪失了和 p53 的結合位置，而影響到由 p53 所調控的 MDM2-P2 promoter 表現能

力，因此我們分別將 MDM2-1476 或 splicing MDM2 forms 和 MDM2-p53RE-luc. 和 β -gal 一起送到 p53wt/H1299 細胞中，經由 48 小時培養後，將細胞破碎並萃取其中的蛋白，先進行蛋白定量分析將蛋白定量成 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，之後再取 $20\mu\text{l}$ 的蛋白進行 β -galactosidase 活性測定，最後將 β -galactosidase 活性測定結果之吸光值定量成一樣，同時也把有轉染 β -gal 的細胞進行 *In Situ Staining of cells for β -galactosidase activity*，其轉染效率約為 5~10% (data not shown)，來證實我們確實有轉染成功，如此才能說明 luciferase 的活性分析結果是具有可信度的，之後我們再取 $20\mu\text{l}$ 蛋白進行 Luciferase 活性測定，之後將所得之數值與 β -galactosidase 活性分析數據做相互的比較，再經由統計分析，而本實驗皆經由三次以上個別的實驗結果得到平均值及標準差，而量化的結果都經由統計軟體加以分析並檢測其中的差異性。以轉染 pCDNA 3.0 (empty vector) 的 Luciferase 活性表現視為對照組，其它 MDM2 所影響之 Luciferase 活性表現則與 pCDNA 3.0 (empty vector) 的 Luciferase 活性表現做相對比較，結果顯示在有轉染短小缺失 MDM2 的細胞中，除了轉染 MDM2-891 與 MDM2-1476 的細胞之外，其它 MDM2 P2 promoter 轉錄活化的程度顯著地降低，其中 MDM2-1025、MDM2-657、MDM2-259 更是只有轉染 pCDNA 3.0 vector 之細胞的 luciferase 活性的大約 20%，顯示出不同短小缺失形式的 MDM2 對於細胞內 p53 的調控程度有所不同 (圖三)。

探討短小缺失的 MDM2-891 對於 p53 的影響

構築好短小缺失的 MDM2-891 質體 DNA 後，我們先將質體 DNA 送入 H1299/p53wt 細胞內，以鑑定其對於細胞內 p53 蛋白表現情形的影響，因此利用 DNA 轉染 (Transfection) 的方式，將短小缺失的 MDM2-891 質體 DNA 與 β -gal 質體 DNA 和 Lipofectamine 混合，作用 30 分鐘後，送

入 H1299/p53wt 細胞中繼續培養 6 小時，待 6 小時後以含有血清的培養液繼續培養 42 小時。最後以 Reporter-Lysis Buffer $200\mu\text{l}$ 把細胞收下來，先進行蛋白定量分析，同時也取 $20\mu\text{l}$ 的蛋白進行 β -galactosidase 活性測定及 $20\mu\text{l}$ 的蛋白進行西方轉漬法 (Western Blot)，以 p53(Ab-1)(oncogene) 一次抗體去辨識 p53 蛋白，結果顯示在單獨轉染 MDM2-1476 的細胞中，其 p53 蛋白的表現量明顯的減少；而在單獨轉染 MDM2-891 的細胞中，其 p53 蛋白的量與沒有轉染的細胞相差不大，表示 MDM2-891 並不具有分解 p53 的能力，而 β -actin 為蛋白的 loading control (圖四)。此外，Mary Ellen 等人於 2000 年時也發現有一段比 p90 少了 N 端的 46 個胺基酸的蛋白 (p76)，當我們以短暫轉染的方式讓 p76 大量表現於 p90 有表現的 MEFs 細胞中，發現 p76 具有與 p90 不同的功能，當它於細胞中大量表現的時候，p76 具有穩定 p53 的功能，據推測可能是因為 p76 和 p90 競爭了與 p53 結合的輔因子，雖然 p76 喪失了與 p53 結合的區域，但是卻使得 p76 和 p90 競爭了 p300, L5 等輔因子，造成 p90 無法和 p53 結合，而無法將 p53 帶到細胞質進行 ubiquitination，使得 p53 堆積在細胞核中。

Manuela 等人也於 2000 年發現，MDM2 的 RING finger domain 除了有 ubiquitin 的功能外，在它的序列區域內尚有一段核輸入序列，據推測這段 NLS 序列可以讓 MDM2 不透過 p53 而去調控細胞週期的進行，而綜合以上的假設或許可以去解釋為何 MDM2-657 對於 luciferase 活性分析值偏低的原因了，根據我們的比對可以發現，MDM2-657 基因的大部分主要的功能區都發生缺失的情形，僅剩下 C 端的 RING finger domain；同時，我們根據 1998 年 Zhang, Y. 等人的研究也可以提出一個假設，MDM2-657 是不是可能和 MDM2-1476 競爭和 p19^{ARF} 的結合位置而使得 MDM2-1476 在細胞中的量反而增加了，因為 p19^{ARF} 可以結合到 MDM2 C 端的位置，進而使得 MDM2 無法進行核輸出的動作，

MDM2-657 的量比原來細胞中 MDM2-1476 的量還多，那麼當 MDM2-657 和 p19^{ARF} 大量的結合時，就會使得 MDM2-1476 的量增加，間接的也使得 p53 被大量的 MDM2 所帶到細胞核外進行 ubiquitination，或許可以說明我們自肺癌病人分析所得到的結果。

以免疫沉澱法分析得只有 mdm2-full length 具有與 p53 結合能力(圖五)，在 MDM2 的早期研究中，已經有五種不同形式的 MDM2 發表，其命名分別為 MDM2-a、MDM2-b、MDM2-c、MDM2-d、MDM2-e 等 (Sigalas et al., 1996)，而在本實驗中我們也發現了 4 種尚未被發表的 MDM2 片段，其大小分別為 1181 bp、1025 bp、1026 bp、259 bp，而這些短小變異的 MDM2 到底是透過 P1 p53-independent promoter 或者是透過 P2 p53-dependent promoter 所調控，目前則尚未被定義清楚。

而在一些乳癌的研究報告中則提到，在乳癌的組織中可以分析到多種 MDM2 蛋白的表現，但是卻無法分辨其表現量到底是正常還是異常 (Gudas et al., 1995) (Bueso-Ramos et al. 1996)，但也有學者提出可在正常及異常的乳房組織中偵測到 multiple mRNA 的表現 (Pinkas et al., 1999)，而也有一些分子量較小的 MDM2 蛋白會大量表現在 benign epithelium (Gudas et al., 1995)，事實上在 benign epithelium 及 breast cancer 的組織分析中，MDM2 的相對應的分子量應該是 57 kDa，因此可能是 MDM2 在細胞 progression 時發生改變所造成 (Bueso-Ramos et al., 1996)。到底短小變異的 MDM2 表現是正常還是異常？"Alternative"splicing 的發生可能是透過先天的 mRNA intron-exon 缺失，使得 splicing mRNA 轉譯出多種蛋白產物；事實上 Alternative splicing 都會發生在一般的基因上，是一種正常的機制，可使得單一的基因表現出不同的產物且具有不同的功能。例如：adenomatous polyposis coli gene，是一種腫瘤的抑制基因，它會在 colon carcinogenesis 的早期藉由透過 exon 1 或是不透過 exon 1 來達到不同的表現情形，而

這種情形也常見於人類或老鼠的腦、心臟及骨骼肌；換句話說 adenomatous polyposis coli gene 會透過不同的 tissue-dependent signal 來產生不同的產物。因此不同型式之短小變異的 MDM2 表現或許可解釋為受到不同訊號所引發的轉譯模式。

此外，一些大小相近的 MDM2 產物的產生也有可能是因為 DNA polymerase 發生突變所造成 (Tran et al., 1996)，因為突變的 DNA polymerase δ (called pol 3-t) 可能是藉由 replication slippage 機制來造成序列重複時發生約 1000 倍之 7~61 bp 的 deletion (Lambert et al., 1999)；而這也或許可以說明在本實驗中所提到之兩種大小相近的 MDM2 是藉由此機轉所造成。

近來的研究指出，MDM2 的 RING finger domain 具有和 RNA binding 的能力 (Elenbaas et al., 1996)，同時在 polyguanylic acid RNAs 有表現的情況下，MDM2 可以和突變的 p53 蛋白結合，並增強對於突變 p53 的分解作用而使得正常的 p53 被保留下來；而 MDM2 也可以藉由對於 p53 的調控進而影響細胞週期。在我們分析所之 6 種 MDM2 forms 有的具有完整的 RING domain，有的則是部分缺失，或許這也可以解釋為何肺癌患者預後極差的原因了。

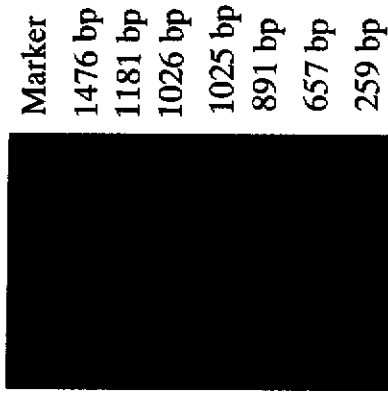
在 MDM2 的序列中有兩段序列與細胞週期抑制有關，這兩段序列稱為 growth-inhibitory domain，會使得尚未轉型的細胞發生細胞週期停留在 G0/G1 phase (Doris et al., 1998)；同時也有研究指出，如果將這兩段 growth-inhibitory domain 移除，會使得 MDM2 蛋白轉變為具有致癌性的形式。此外，proto-oncoprotein (在正常細胞中相當於 oncoprotein) 對於正常細胞的生長調節是必須的，但如果這些 proto-oncoprotein 有異常的表現時，就會轉變成 oncoprotein 進而誘發腫瘤的生成 (Bishop et al., 1991; Hunter et al., 1991)。最近的報告也指出，在人類及齧齒類動物的細胞中，過度表現的致癌基因 ras 會阻斷細胞週期的進行，使細胞週期停留在 G1 期；如果將 growth-inhibitory domain 移除

則會活化 ras 致癌的特性 (Serrano et al., 1997)。ras 的細胞週期阻斷的特性與 MDM2 有些類似，但兩者卻是經由不同的路徑來影響 growth arrest；在 ras 方面必須要透過 p53 及 p16 來造成 G1-arrest，而 MDM2 在 NIH 3T3 細胞中造成的 G0/G1-arrest 則不需要 p16 及 p53 的參與 (Linardopoulos et al., 1995)。MDM2 雖然被稱為致癌基因，但事實上其本身卻具有兩種相反的功能，MDM2 的細胞週期抑制功能在正常細胞中可當成是一種保護的機制以對抗不正常的腫瘤形成訊號所引起的過度生長；也就是說這兩種功能對於不同時期的正常細胞生長而言是必須的，而維持這兩種功能的平衡對正常細胞來說也是很重要的。

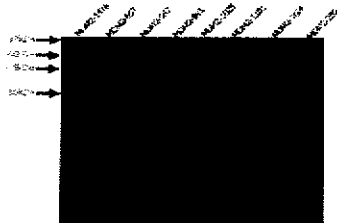
五、參考文獻

1. Bishop, M. (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64, 235-248.
2. Bueso-Ramos, C., Manshour, T., Haidar, M., Yung, Y., McCOWN, P., Ordenez, N., Glassman, A., Sneige, J., and Albitar, M. (1996) Abnormal expression of mdm2 in breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*, 37: 179-188.
3. Doris R. Brown, Charles A. Thomas and Swati Palit Deb. (1998) The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. *The EMBO J.*, 17:2513-2525.
4. Elenbaas, B., Dobbstein, M., Roth, J., Shenk, T., and Levine, A. The mdm2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol. Med.*, 2:439-451.
5. Gudas, J., Nguyen, H., Klein, R., Katayose, D., Seth, P., and Cowan, K. (1995) Differential expression of multiple mdm2 messenger RNAs and proteins in normal and tumorigenic breast epithelial cells. *Clin. Cancer Research*. 1:71-80.
6. Hunter, T. (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64,249-270.
7. Lambert, S., Saintigny, Y., Delacote, F., Amiot, F., Lecomte, M., Huck, S., Bertrand, P., and Lopez, B. (1999) Analysis of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cell, using tandem repeat sequences. *Mutat. Res.*, 433:159-168.
8. Linardopoulos, S., Street, A., Quelle, D. E., Parry, D., Peters, G., Sherr, C. J. and Balmain, A. (1995) Deletion and altered regulation of p16^{INK4a} and p15^{INK4b} in undifferentiated mouse skin tumors. *Cancer Res.*, 55,5168-5172.
9. Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H. (1998) Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res*. 58 (4) :609-613.
10. Manuela Argentini, Nadia Barboule and Bohdan Waszytk. (2000) The contribution of the RING finger domain of MDM2 to cell cycle progression. *Oncogene* 19:3849-3857.
11. Pinkas, J., Naber, S., Butel, J., Medina, D., and Jerry, D. (1999) Expression of mdm2 during mammary tumorigenesis. *Int. J. Cancer*, 81:292-298.
12. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. and Lowe, S. W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell*, 88, 593-602.
13. Sigalas, I., Calvert, A., Anderson, J., Neal, D., and Lunec, J. (1996) Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Net. Med.*, 2: 912-917.
14. Tran, H., Gordenin, D., and Resnick, M. The prevention of repeat-associated deletions in *Saccharomyces cerevisiae* by mismatch repair depend on size and origin of deletions. *Genetics*, 143:2579-1587.
15. Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998) ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. *Cell* 92,725-734.

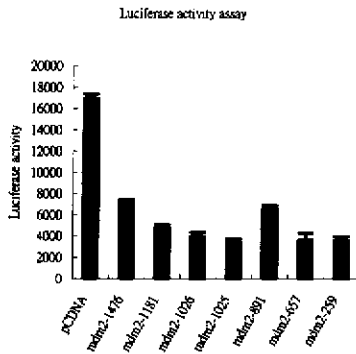
六、圖表



圖一、MDM2-isoforms-pCDNA3.0 質體限制酶作用後之電泳凝膠分析圖



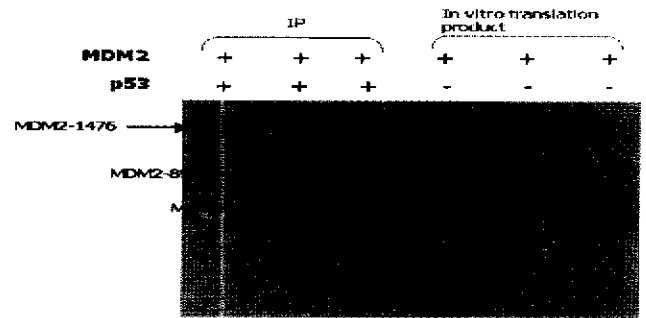
圖二、TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System 對於 MDM2 蛋白分析結果



圖三、各種短小缺失 MDM2 對於 MDM2-p53RE 轉錄活化的能力調控情形。

	1	2	3	4	5	6
p19 ^{ARF}	-	-	+	-	-	+
MDM2-891	-	-	-	+	+	+
MDM2-1476	-	+	+	+	-	-
p53wt	+	+	+	+	+	+
DO-7	[Blacked out]					
β -actin	[Blacked out]					

圖四、探討短小缺失 MDM2 質體 DNA 之蛋白表現對於細胞內 p53 蛋白的影響



圖五、由免疫沉澱法去分析 MDM2-1476、MDM2-891 及 MDM2-657 與 p53 蛋白的結合情形；lane 1:MDM2-1476 經由 IP 後的產物；lane 2:MDM2-891 經由 IP 後的產物；lane 3:MDM2-657 經由 IP 後的產物；lane 4-5 為對照組