

Análisis molecular de los genes supresores tumorales p16INK4 y TP53 en osteosarcomas pediátricos en pacientes españoles

A. Patiño García, L. Sierrasesúмага Ariznabarreta

Resumen. *Fundamento:* Alteraciones en los genes de supresión tumoral en general, y de p16INK4 y TP53 en concreto, se han relacionado con el desarrollo del cáncer debido a su importante papel en la regulación del ciclo celular normal. Dado que las alteraciones genéticas que conducen a la aparición del osteosarcoma en pacientes pediátricos no están completamente definidas, nos hemos propuesto evaluar la importancia de la alteración de los genes anteriormente mencionados en el desarrollo de este tipo de tumores pediátricos.

Material y métodos: Se analizaron 64 muestras (tejidos frescos, biopsias incluidas en parafina y linfocitos de sangre periférica) correspondientes a 38 pacientes afectados de osteosarcoma. Se analizó el gen TP53 mediante la búsqueda de mutaciones por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) en la secuencia codificante de los exones 5 a 8. El análisis de p16INK4 consistió en la detección de deleciones mediante amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y de mutaciones puntuales mediante SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphisms*).

Resultados: El análisis demostró que 18,4% de las muestras eran portadoras de mutaciones en la secuencia codificante de TP53 y 7% de ellas presentaban deleciones homocigotas de p16INK4. Parece existir correlación entre presencia de deleción de p16INK4 y mal pronóstico; mientras que la mutación de TP53 parece estar relacionada con supervivencia reducida, aunque no significativamente.

Conclusiones: La mutación de TP53 y, en menor grado, la deleción de p16INK4 parecen estar implicadas en el desarrollo del osteosarcoma pediátrico; además, la alteración de estos genes parece constituir un factor de mal pronóstico.

An Esp Pediatr 1997;47:478-482.

Palabras clave: Osteosarcoma pediátrico, TP53, p16INK4, mutación, deleción, supervivencia

INVOLVEMENT OF THE TP53 AND p16INK4 TUMOR SUPPRESSOR GENES IN THE DEVELOPMENT OF PEDIATRIC OSTEOSARCOMA IN SPANISH PATIENTS

Abstract. *Objective:* Alterations affecting tumor suppressor genes, specifically p16INK4 and TP53, have been shown to be involved in the development of human cancer due to their important role in the control of normal cell cycle progression. As the genetic events leading to the development of pediatric osteosarcoma remain partially unclear, we have tested the possibility that a significant number of pediatric osteosarcoma patients harbor mutations in these genes.

Patients and methods: We have analyzed 64 samples (fresh tissues, paraffin embedded biopsies and peripheral blood lymphocytes)

Departamento de Pediatría, Unidad de Investigación.
Universidad de Navarra. Pamplona.

Correspondencia: Ana Patiño García. Laboratorio de Pediatría.
Universidad de Navarra. Irunlarrea s/n. 31080 Pamplona.

Recibido: Noviembre 1996

Aceptado: Junio 1997

corresponding to 38 pediatric osteosarcoma patients. TP53 mutations were analyzed by DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) analysis of exons 5 through 8. We searched for deletions in the p16INK4 gene by PCR (*Polymerase Chain Reaction*) analysis and point mutations were screened by means of SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphisms*).

Results: Our analysis showed that 18.4% of the samples harbored mutations in the coding region of TP53 and that 7% had a homozygous deletion of the p16INK4 gene. Our results suggest that p16INK4 deletions may constitute a bad prognostic factor and that TP53 alterations may be correlated, although not statistically, with reduced survival time.

Conclusions: Mutations of the TP53 and deletion of p16INK4 tumor suppressor genes seem to be involved in the development of pediatric osteosarcoma. Moreover, alterations of these genes may constitute a prognostic factor related with poor prognosis or decreased survival time.

Key words: Osteosarcoma, TP53, p16INK4, pediatric, mutation, deletion, survival.

Introducción

Es bien conocido que la célula tumoral difiere de la diploide normal, entre otras características, en su posibilidad de exhibir una capacidad proliferativa aparentemente ilimitada, debido a la alteración de su programa genético que controla el crecimiento y la diferenciación normales. Dicha propiedad de inmortalización se debe, probablemente, tanto a la pérdida de la función normal de determinados genes (antioncogenes o genes de supresión tumoral), como a la alteración de las copias normales de otros (oncogenes). Algunos de estos genes de supresión tumoral han sido identificados, y entre ellos se encuentran el TP53 y p16INK4. Ambos son de actuación recesiva, es decir, ambos alelos deben de estar alterados, inactivados o ausentes para que se produzca la transformación maligna.

Como ya hemos mencionado, los genes de supresión tumoral ejercen un control negativo de la proliferación celular que se expresa como una señal que lleva a la célula a ralentizar su crecimiento y a incrementar su nivel de diferenciación. Una vez que tiene lugar la pérdida de función de estos genes, la célula no puede escapar a los ciclos de división y se ve empujada a una proliferación incontrolada. Dichos genes están localizados en regiones cromosómicas que se ha demostrado están frecuentemente alteradas o delecionadas en pacientes con cáncer⁽¹⁾.

Los eventos moleculares que llevan a la génesis de los tumores óseos infantiles no son completamente conocidos en la

Tabla I Alteraciones del gen TP53 detectadas en las muestras tumorales mediante el análisis por DGGE

Muestra	Exón	Codón	Cambio DNA	Cambio proteína	Subtipo histológico
22A	8	273	CGT→CAT	Arg→His	Osteoblástico
45A, B, C	8	273	CGT→CAT	Arg→His	Condroblástico
43B	8	268	AAC→AGC	Asn→Ser	Osteoblástico
19R	7	250	del C	Desfase	Condroblástico
		250	CCC→TTC	Pro→Phe	
46B	6	196	CGA→TGA	Arg→Stop	Fibroblástico
15C	5	175	CGC→CAC	Arg→His	Osteoblástico
2C	5	?	?	?	Osteoblástico

actualidad; aunque se han descrito diferentes alteraciones genéticas que anulan o alteran la función normal de los genes de supresión tumoral Rb y TP53^(2,3).

Recientemente, se ha demostrado que la alteración del gen p16INK4 es un evento frecuente en diferentes tipos de líneas celulares tumorales, así como en tumores primarios⁽⁴⁾. El gen codifica un inhibidor de los complejos ciclina D-quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), que son parcialmente responsables de la progresión normal del ciclo celular (Fig. 1). La proteína p16INK4 es capaz de inhibir la capacidad catalítica de los complejos ciclina D-CDK4 y, por tanto, la subsiguiente fosforilación de proteínas necesarias para que la célula transcurra de la fase G1 a S. Se ha postulado que si el gen p16INK4 está de alguna manera alterado funcionalmente, no existe el mecanismo regulador que detiene el ciclo celular anómalo, lo que podría conducir a la neoplasia a través de un crecimiento incontrolado⁽⁵⁾.

Las mutaciones que alteran el gen de supresión tumoral TP53 pasan por ser las alteraciones genéticas más frecuentes en tumores esporádicos humanos⁽⁶⁾. Al igual que en el caso anterior, este gen es un importante regulador del ciclo celular normal y su función en la supresión de la proliferación celular anormal en respuesta al daño en el DNA, es de tal importancia, que ha recibido por ello el nombre de “guardián del genoma”.

La proteína codificada por el gen actúa en el punto de control de G1 a S; así, en presencia de daño en el DNA celular, los niveles de TP53 se incrementan y promueven una cascada de eventos que tiene como consecuencia final la detención del ciclo celular antes de que se pueda replicar el DNA dañado, dando así a la célula la oportunidad de reparar la alteración (Fig. 1). Si la reparación no tiene lugar o no es adecuada, la presencia del gen TP53 normal conduce a la célula a una muerte celular programada o apoptosis⁽⁷⁻⁹⁾.

En este estudio hemos analizado los genes de supresión tumoral TP53 y p16INK4 en un grupo de muestras procedentes de pacientes pediátricos afectados de osteosarcoma, con el fin de determinar si dichos genes están implicados en la génesis de este tipo de tumores. Merece la pena destacar que en un estudio previo se ha demostrado que este mismo grupo de pacientes no

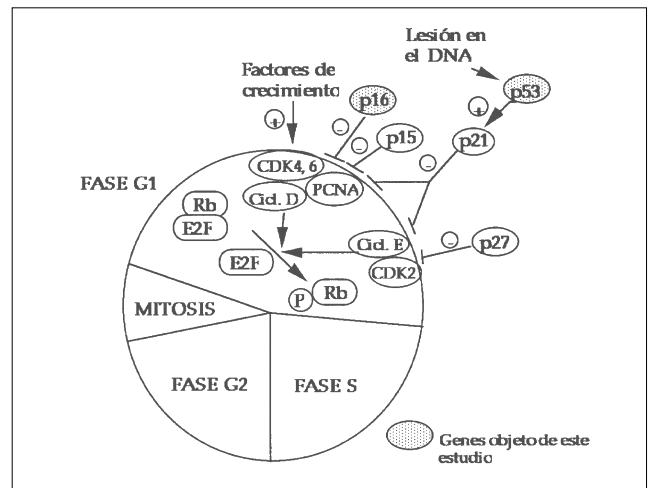


Figura 1. Principales moléculas que intervienen en el punto de control G1-S del ciclo celular.

posea mutaciones puntuales en los codones 12 y 61 de los oncogenes de la familia *ras*⁽¹⁰⁾.

Material y métodos

Pacientes y muestras

Se obtuvieron muestras de tejido y de sangre periférica de pacientes tratados en la Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona. Se examinaron 64 muestras correspondientes a 38 pacientes afectados de osteosarcoma, para seis de los cuales se disponía además de muestras paralelas de sangre periférica.

En el caso de los linfocitos periféricos (n=6) y de tejidos frescos (n=9), el DNA genómico se obtuvo mediante aislamiento y purificación con proteinasa K y extracción mediante protocolos convencionales con fenol-cloroformo. En el caso de las biopsias incluidas en parafina (n=49), se obtuvieron cortes seriados y se desparafinaron siguiendo protocolos convencionales con ligeras modificaciones en cuanto a tiempos de digestión y concentración de proteinasa K⁽¹¹⁾.

Análisis del gen p16INK4

PCR-SSCP

Los exones 1 y 2 del gen p16INK4 se amplificaron utilizando cebadores y condiciones previamente descritos⁽¹²⁾. Brevemente, se amplificaron 200 ng de DNA genómico en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 10 pmol de cada uno de los cebadores, 200 µM de dNTPs, Tris-HCl (pH 8,5) 20 mM, SO₄(NH₄)₂ 16 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 150 µg/ml de BSA, DMSO 5% y una unidad de Taq DNA polimerasa (BioTaq™, Bioprobe Systems).

Para el análisis de SSCP se utilizaron geles de poliacrilamida (49:1, acrilamida:bisacrilamida) al 12% con 10% de glicerol. Antes de comenzar la electroforesis, a 2 µl de muestra se añadieron 10 µl de solución de carga (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05% y xileno cianol 0,05%), se desnaturalizaron a 94 °C durante 6 min y se colocaron inmediatamente en hielo. La electroforesis se mantuvo a 200 V en una

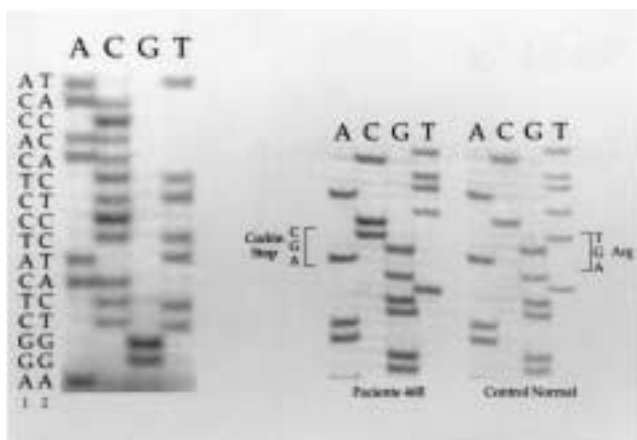


Figura 2. IZQDA: Secuenciación del exón 7 del gen TP53 del paciente 19R que muestra el patrón mutante: alelo 1 con una mutación en tandem CC→TT frente al patrón normal y alelo 2 con delección de una C. DCHA: Secuenciación del exón 6 del gen TP53 del paciente 46B que muestra la sustitución de una T por una C, lo que provoca la aparición de un código de terminación en la posición 196 de la proteína.

cámara refrigerada a 4 °C hasta que el colorante xileno cianol alcanzaba el borde inferior del gel. Tras la electroforesis las bandas se visualizaron mediante tinciones con plata⁽¹³⁾.

En aquellos casos en que el patrón de bandas de SSCP no era suficientemente claro, se repitió la electroforesis en las mismas condiciones tras digestión de los fragmentos de amplificación con la enzima de restricción *Sma I*.

Análisis de las delecciones de p16INK4

Para detectar la presencia de delecciones en el gen p16INK4 se coamplificó el exón 2 de dicho gen con un fragmento de 220 pb de la región V β 2 del receptor de linfocitos T como control interno de la reacción de PCR en condiciones similares a las descritas anteriormente.

Para el análisis de los resultados, los productos de amplificación se separaron, mediante electroforesis, en geles de agarosa al 2% que contenían 0,5 μ g/ μ l de bromuro de etidio y se fotografiaron. Para que fuera posible la comparación de la amplificación de ambos fragmentos la reacción de PCR se mantuvo en el rango exponencial minimizando el DNA de partida y el número de ciclos aplicados.

Se consideró que existía delección homocigota si, en tres reacciones independientes, había ausencia completa de señal de amplificación correspondiente al exón 2 de p16INK4 y presencia del fragmento del TCR.

Análisis de las mutaciones de TP53 y secuenciación

La búsqueda de mutaciones en el gen TP53 se llevó a cabo según protocolos ya publicados con ligeros cambios en los tiempos de electroforesis^(14,15).

Aquellas bandas que presentaban movilidads electroforéticas alteradas al compararlas con una muestra normal se se-

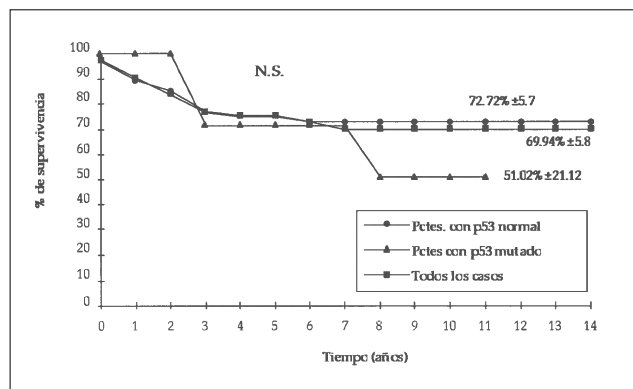


Figura 3. Curva actuarial de supervivencia en pacientes con osteosarcomas en relación con la presencia de mutaciones en el gen TP53.

cuenciaron utilizando secuenciación cíclica con Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing Kit (Amersham Life Science).

Resultados

Análisis de las mutaciones del gen TP53

Se analizaron únicamente los exones 5 a 8 del gen de supresión tumoral TP53 porque dicha región supone aproximadamente el 80% de los dominios conservados del gen (codones 97 a 292) y es donde se localizan más de 85% de las mutaciones que han sido detectadas en tumores esporádicos de muy diferente naturaleza.

Se detectaron alteraciones en 9 muestras correspondientes a 7 pacientes afectados de osteosarcoma (Fig. 2). La localización de las mutaciones fue: tres en el exón 8, dos en el exón 5 y una en los exones 6 y 7 respectivamente (Tabla I). En total se detectaron alteraciones de la secuencia normal en 18,4% de los pacientes, lo que confirma los resultados de artículos previos que destacan el papel del gen TP53 en la carcinogénesis. Cabe destacar que todas las alteraciones detectadas suponían cambios de aminoácidos de la proteína, por lo que ninguna de ellas podía ser considerada una variación polimórfica de la secuencia. Sin embargo, en el caso de la muestra 2C, aunque presentaba un patrón claramente mutante en heterocigosis en el análisis de DGGE, no fue posible obtener DNA de calidad suficiente para su secuenciación, por lo que no podemos estar realmente seguros si presenta una mutación en la secuencia nucleotídica o si la alteración representa una mutación silenciosa o polimorfismo que no tendría, por tanto, relación alguna con el desarrollo del tumor.

Se encontraron alteraciones tanto en tejido de resección de tumores primarios (n=4), como en el DNA de metástasis a distancia (n=4) o en recidivas locales (n=1). En el caso del paciente 45, en que disponíamos de tejido obtenido de biopsia del tumor primario, de recidiva local y de metástasis pulmonar, se encontró la presencia de la misma mutación en las tres muestras.

No se encontró relación significativa entre la alteración del gen TP53 y los parámetros clínicos, aunque aquellos pacientes que presentaron mutaciones poseían un tiempo de supervivencia a 14 años menor que los que presentaban un gen TP53 de tipo normal (Fig. 3).

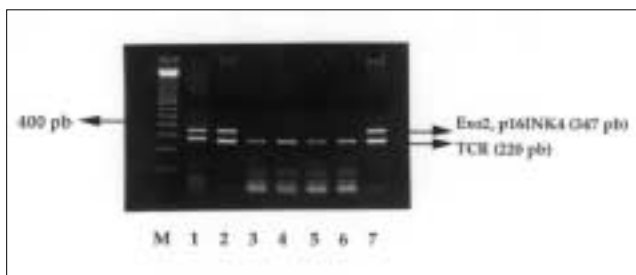


Figura 4. Gel de agarosa en el que se observa la deleción del exón 2 de p16INK4 en las muestras de las calles 3 a 6. Las calles 1, 2 y 7 corresponden a pacientes no delecionados y la calle M es el marcador de peso molecular.

Análisis de las deleciones del gen p16INK4

Se detectó deleción homocigota del gen de supresión tumoral p16INK4 en 5 muestras correspondientes a 3 pacientes afectados de osteosarcoma, que se reconoció como ausencia de amplificación del exón 2 del gen en presencia de amplificación del segmento control (Fig. 4). La frecuencia de deleción homocigota encontrada, 7,9% de los pacientes, no difiere sustancialmente de la previamente reportada en este tipo de tumor en muestras de pacientes adultos. Los tres pacientes en que se detectó deleción poseían osteosarcomas condrolásticos en el estadio IIB de acuerdo con la clasificación de Enneking⁽¹⁶⁾, presentaron metástasis pulmonares en su seguimiento y fallecieron en un período entre 16 y 34 meses. Por tanto, en nuestra serie, la presencia de deleción del gen p16INK4 está significativamente relacionada con mal pronóstico en aquellos pacientes afectados de osteosarcomas condrolásticos (Fig. 5).

En uno de los pacientes en que se disponía de muestra de tejido del tumor primario y de dos metástasis diferentes, se detectó deleción del gen p16INK4 en todas las muestras.

Análisis de mutaciones en el gen p16INK4

En el análisis mediante SSCP de los fragmentos de amplificación correspondientes a los exones 1 y 2 del gen no se encontraron cambios nucleotídicos que alterasen la secuencia codificante de los exones 1 ó 2 del gen p16INK4 en ninguna de las muestras de tejido ni sangre periférica.

Discusión

Se disponía de un completo seguimiento de todos los pacientes de osteosarcoma incluidos en el estudio, desde el diagnóstico hasta la actualidad; dicho seguimiento incluye datos acerca del tratamiento, desarrollo de recidivas locales o metástasis a distancia y tiempo de supervivencia total y libre de enfermedad entre otros parámetros.

Los valores de frecuencia de mutaciones del gen TP53 son similares a los encontrados en otros estudios previos y apoyan la idea de que dicho gen cumple un papel de importancia en el desarrollo de este tipo de tumores pediátricos. El valor del porcentaje de mutaciones de TP53 en este estudio es ligeramente inferior al detectado por otros autores; la razón de esta diferencia es, pro-

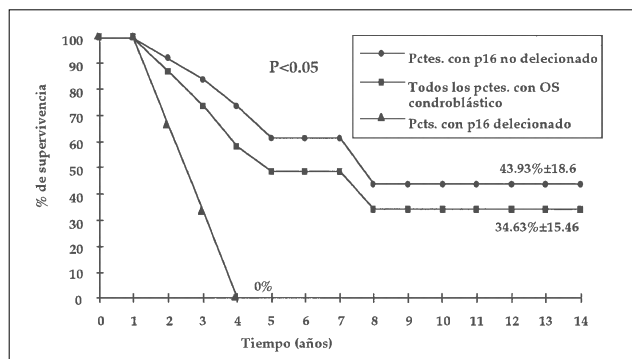


Figura 5. Curva actuarial de supervivencia en pacientes con osteosarcomas condrolásticos en relación con la presencia de deleción homocigota del gen p16INK4.

blemente, la diferencia en el planteamiento del protocolo, ya que dichos autores extendían la búsqueda de mutaciones desde el exón 2 al 11 además de realizar análisis de grandes reordenamientos del gen a través de técnicas de hibridación por Southern^(2,17).

Se ha demostrado que las mutaciones de cambio de sentido en los codones conservados del gen TP53, codones 130 a 286, se encuentran frecuentemente implicadas en el desarrollo de tumores esporádicos humanos, dando idea de la importancia de la función de las regiones de la proteína codificadas por dichos segmentos. En nuestra serie, 71,43% de las muestras mutantes eran portadoras de este tipo de mutaciones que cambian el aminoácido debido a mutación puntual en el triplete codificante.

Todas las mutaciones detectadas en los tumores de esta serie han sido previamente descritas en la literatura⁽¹⁸⁾; algunas de ellas, como el cambio de arginina a histidina en el codón 273 y la generación de un codón de terminación en el aminoácido 196, se han descrito en un amplio espectro de tumores y líneas celulares diferentes con una frecuencia bastante elevada; estas mutaciones representan transiciones en dinucleótidos CpG (CpG→TpG o CpG→CpA) que están relacionados con una elevada frecuencia de mutación. Sin embargo, la mutación de cambio de sentido en el codón 268 y la mutación en tandem del exón 7 sólo han sido detectadas en dos ocasiones cada una, y en ningún caso en el mismo paciente.

No conseguimos obtener DNA de suficiente calidad como para llevar a cabo la secuenciación cíclica de la muestra 2C, por lo que no podemos estar seguros de la naturaleza ni la posición de esta mutación que afecta al exón 5 del gen. Sin embargo, el fragmento de amplificación de dicha muestra migraba más lentamente en el DGGE que la muestra control normal, por lo que se podría predecir la presencia de un cambio GC→AT en esa región.

No se ha encontrado una correlación significativa entre la presencia de mutaciones en el gen TP53 y parámetros clínicos o características del tumor, aunque en publicaciones previas se ha sugerido que la presencia de alteraciones en este gen supresor tumoral puede estar relacionado con tumores de comportamiento más agresivo y peor pronóstico, y en nuestra serie parece existir una tendencia a la reducción de la supervivencia a 14 años en

los pacientes que son portadores de tumores con TP53 alterado.

La frecuencia de deleción homocigota detectada en nuestra serie, 7,9%, no difiere de la encontrada en tumores de adultos de la misma naturaleza⁽¹⁹⁾. Hay que tomar en consideración que dada la técnica utilizada para determinar la presencia de mutación, la amplificación por PCR, podemos estar dando un valor de deleción menor al que realmente se da en la muestra. Ello puede deberse a que exista amplificación debido a células sanas presentes en la muestra tumoral o incluso a la amplificación del alelo no delecionado en el caso de deleción hemocigota. Este valor, por tanto, nos indica la frecuencia "mínima" de deleción de p16INK4.

La ausencia de mutaciones en nuestra serie en el gen p16INK4 no es un dato sorprendente, dada la baja frecuencia de mutación presentada por otros autores y la ausencia de alteraciones en osteosarcomas de adultos. Podría considerarse también que la técnica de SSCP utilizada en el análisis puede haber pasado por alto algunas mutaciones, dado que la sensibilidad de la técnica no es del 100% en estos tamaños de amplificación; sin embargo, para evitar esta posibilidad, en la mayoría de los casos, se procedió a digerir los productos de amplificación obtenidos con enzimas de restricción que rendían fragmentos de tamaños ideales para ser analizados por SSCP.

Es interesante destacar, aun con el limitado número de pacientes de nuestra serie, que los tres pacientes con el gen p16INK4 delecionado eran osteosarcomas condroblásticos que desarrollaron metástasis pulmonares y fallecieron en un período máximo de 3 años desde el diagnóstico. Este hallazgo parece sugerir que la ausencia del gen p16INK4 está relacionado con tumores de mal pronóstico, aunque como ya hemos mencionado, no se pueden extraer conclusiones clínicas definitivas hasta ampliar la serie.

Por último, cabe mencionar el hecho de que para algunas muestras adicionales de biopsias incluidas en parafina no se consiguió amplificación eficiente por PCR. Nos hemos encontrado anteriormente con este problema en el análisis de rutina de bloques de parafina y asumimos que puede deberse a tres factores fundamentales: en primer lugar a los severos y deletéreos procesos de fijación y decalcificación utilizados en los procesos histopatológicos, en segundo lugar, a la posible presencia de trazas de elementos inhibidores de las polimerasas en la muestra y, por último, al elevado porcentaje de necrosis presente en la mayoría de las muestras debido a la quimioterapia intraarterial.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Hamelin, Dr. Zhou y Dr. Zhang por su amabilidad al enviarnos las muestras utilizadas como controles, al Gobierno de Navarra por la financiación de este proyecto y a los departamentos de Anatomía Patológica y Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Clínica Universitaria por su colaboración en la recopilación de muestras.

Bibliografía

1 Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science*, 1991; **254**:1138-1146.

- 2 Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, Yamamuro T, Kotoura Y, Sasaki MS, Little JB: Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res*, 1992; **52**:6194-6199.
- 3 Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y, Tamamuro T: Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res*, 1994; **54**:3042-3048.
- 4 Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tawfigian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 1994; **264**:436-440.
- 5 Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 1993; **366**:704-707.
- 6 Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B: Mutations in the p53 occur in diverse human tumor types. *Nature*, 1989; **342**:705-708.
- 7 Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 1991; **51**:6304-6311.
- 8 O'Rourke RW, Miller CW, Kato GJ, Simon KJ, Chen D-L, Dang C-V, Koeffler PK: A potential transcriptional activation element in the p53 protein. *Oncogene*, 1990; **5**:1829-1832.
- 9 Harris CC: Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Acad Inst*, 1996; **88**:1442-1455.
- 10 Antillón-Klüßmann F, García Delgado M, Villa Elízaga I, Sierrasesúmaga L: Mutational activation of ras genes is absent in pediatric osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995; **79**:49-53.
- 11 Rogers BB, Alpert LC, Hine EA, Buffone GJ: Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 1990; **136**:541-548.
- 12 Sun Y, Hildesheim A, Lanier APE, Cao Y, Yao K-T, Raab-Traub N, Yang C-S: No point mutation but decreased expression of the p16/MTS1 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinomas. *Oncogene*, 1995; **10**:785-788.
- 13 Hiort O, Wodtke A, Struve D, Zöllner A, Sinnecker GHG, German "Collaborative Intersex Study Group": Detection of point mutation in the androgen receptor gene using non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mol Genet*, 1994; **3**:1163-1166.
- 14 Hamelin R, Jegou N, Laurent-Puig R, Vidaud M, Thomas G: Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis in colorectal tumors. *Oncogene*, 1993; **8**:2213-2220.
- 15 Børresen A-L, Hovig E, Smith-Sørensen B, Malkin D, Lystad S, Andersen TI, Nesland JM, Isselbacher KJ, Friend SH: Constant denaturing gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**:8405-8409.
- 16 Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA: A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop*, 1980; **153**:106-120.
- 17 Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, Sasaki MS, Kotoura Y, Yamamuro T: p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Br J Cancer*, 1993; **68**:1134-1139.
- 18 Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sørensen B, Montesano R, Harris CC: Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**:3551-3555.
- 19 Miller CW, Aslo A, Campbell MJ, Kawamata N, Lampkin BC, Koeffler HP: Alterations of the p15, p16 and 18 genes in osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; **86**:136-142.