

U937 세포에서 발암관련 유전자들로 구성된 DNA chip을 이용한 방사선 감수성 유전자들의 선발

김종수¹ · 김인규² · 강경선³ · 윤병수^{1,*}

¹경기대학교 생물학과

²한국 원자력연구소 방사선 생체해석분야

³서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Identification of Radiation-Sensitive Gene in U937 Cell by using cDNA-Chip Composed of Human Cancer Related Gene

Jong Soo Kim¹, In Gyu Kim², Kyung Sun Kang³, and Byoung Su Yoon^{1,*}

¹Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 440-760, Kyonggido, Korea

²Department of Radiation Biology, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-600, Korea

³Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine,

Seoul University, Suwion 441-774, Kyonggido, Korea

(Received February 25, 2002 / Accepted April 9, 2002)

ABSTRACT : We have used cDNA microarray hybridization to identify gene regulated in response to gamma-irradiation in U-937 cell. The cDNA-chip was composed entirely of 1,000 human cancer related gene including apoptosis and angiogenesis etc. In gamma-irradiated U-937 cell, highly charged protein, ribosomal protein L32, four and a half LIM domains 3, lipocalin 2 (oncogene 24p3) and interleukin 15, ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D) genes showed increased level of its transcription, and cell division cycle 25A, dihydrofolate reductase, topoisomerase (DNA) II beta(180kD), kinase suppressor of ras and strarigin genes showed reduced level of its transcription compared to untreated U-937 cell. The significant change of level of transcription was not found in well-known ionizing radiation(IR)-responsive gene, such as transcription factor TP53 and p53 related gene, except ataxia telangiectasia mutated gene.

Key words: gamma irradiation, cDNA microarray, gene expression, U-937 cell

서 론

이온화 방사선(ionizing radiation; IR)은 생물체에 DNA 절단 등 물리적 손상을 야기 시킬 뿐 아니라, growth factor, cytokine 및 oncogene 유전자들의 이상 발현을 유도하기에 세포 내 신호 전달체계에도 큰 영향을 준다(Fance, 1992; Friedberg *et al.*, 1995; Holbrook *et al.*, 1996; Boothman *et al.*, 1998; Woloschak, 1997). 일반적으로 유전독성물질 등에 의하여 DNA에 손상을 입은 세포에서 나타나는 apoptosis, DNA 수복 등의 과정은 transcription factor P53(p53)과 관련된 전사 조절의 신호 기작으로 가장 잘 알려져 있으며 (Kastan *et al.*, 1992; Ko and Prives, 1996),

또한 p53은 DNA손상 뿐 아니라, 세포막 손상의 경우에도 관여하여, NFKB, MAP kinase와 같은 효소들을 활성화시키는 등 다양한 역할을 보이고 있다(Kastan *et al.*, 1992; Ko and Prives, 1996). 세포 신호 전달 관련 유전자들 가운데 p53관련 조절 유전자만도 100여 가지가 알려져 있으며, 사람 유전자에서 200-300개의 p53-binding site가 존재하는 것으로 보고되고 있다(Tokino *et al.*, 1994). 이온화 방사선이 일으키는 세포 손상에서도 p53은 다른 유전독성물질 등에 의한 반응과 같이 cell cycle control, apoptosis 및 DNA 수복기자 조절 유전자들의 활성화에 관여하고 있다(Liu *et al.*, 1996).

세포 내 유전자들의 복합적인 상호연관 관계를 규명하기 위하여, 또한 세포 외 환경변화에 의한 세포 내 유전자들의 집단적 또는 개별적 활성 변화 등 대량의 유전자 기능 분석

*To whom correspondence should be addressed

을 위하여, DNA-chip(Microarray분석)은 현재 매우 유용한 도구로 발전되고 있다. Microarray를 이용한 실험은 수천~수만 개 유전자의 발현 분석을 동시에 가능케 하기에(Brown and Botstein 1999; Lipshutz *et al.* 1999), 인과관계를 갖는 다수의 유전자 발현의 복잡한 변화를 통합적으로 모니터링하는 것이 가능하며, 따라서 이온화 방사선에 의한 유전독성 연구 및 감수성 유전자의 선별에서 매우 유용한 도구로써 기대되고 있다(Amundson *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2001).

Microarray를 이용한 유전자분석에 방사선 감수성 유전자의 발현은 DNA-chip에 탑재된 유전자들이 동일한 경우에도, cell line이나 조직의 종류에 따라 유전적 배경의 차이로 다양하게 나타난다. 실험에 사용된 cell line은 우선 각각의 p53유전자의 상태에 따라 *BCL3*, *FRA1*, *ATF3*, *REL-B*, *PC-1*, *MDM2* 및 *PIPI/WAF13* 유전자들의 발현에 차이를 보이며, 일반적으로 정상의 p53유전자를 가진 세포주는 상기 유전자들이 방사선 감수성 유전자로 강한 발현 변화를 보이는 반면, p53유전자가 돌연변이된 세포주에서는 반응을 보이지 않거나 약한 반응을 나타내었다(Amundson *et al.*, 2001; Achary *et al.*, 2000). 또한 leukemia cell을 이용한 연구에서 이온화 방사선에 반응하는 p53관련 유전자들도 세포주에 따라 다르게 나타났으며, p53과 관련이 없는 것으로 알려진 새로운 방사선 감수성 유전자들도 보고되었다(Amundson *et al.*, 1999). 본 실험에 사용된 U-937 세포는 37세의 남성으로부터 얻은 macrophage의 텁프종으로 Sundstrom과 Nilsson(1976)에 의해 명명되고 기재된 후 *in vitro* 실험에 많이 사용되어 왔다.

따라서 본 연구에서는 이온화 방사선에 반응하는 방사선 감수성 유전자들을 새롭게 탐색하기 위하여, 사람의 발암 관련 유전자로 알려진 1,000개 유전자의 cDNA가 탑재된 DNA-chip을 사용하여 방사선 조사된 U-937 세포주의 발현 변화를 분석하고 p53 유전자와 무관한 것으로 알려진 새로운 방사선 감수성 유전자군을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 방사선조사

본 실험에서는 사람의 histiocytic lymphoma 세포주인 U-937(Number; CRL-1593.2, ATCC, USA)을 실험 세포로 사용하였으며, 배지는 10% fetal bovine serum(Gibco-BRL, USA)를 함유한 RPMI 1640배지(20 mM HEPES)를, 세포 배양은 5% CO₂와 37°C를 유지시킨 배양기를 사용하였다. 방사선 조사는 세포농도 4×10⁵ cells/ml인 배양액 30 ml를 ¹³⁷Cs의 광원으로 100rad (882rad/min) 처리하였으며, 방사

선 조사 24시간 후 total RNA를 분리하였다.

Total RNA 분리

Total RNA의 분리는 TRIzol Reagent(GibcoBRL #15596-018)를 이용하여 추출하였다. 방사선 조사 24시간 후에 세포를 원심분리로 수거하여 상등의 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 1×10⁷ cell에 1 ml의 TRIzol을 넣어 부유시킨 후 상온에 5분 정치하고, 0.3 ml chloroform을 첨가하여 다시 상온에서 2~3분간 정치하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 1.5 ml microtube에 옮긴 후 isopropanol 0.5 ml를 넣고 상온에서 10분 정치한 다음 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. DEPC로 처리한 70% 에탄올로 RNA를 세척 한 후 상온에서 전조시키고, 침전된 RNA를 ddH₂O에 녹인 후, Spectrophotometry방법으로 RNA 농도를 측정하였다. Total RNA는 probe labelling을 수행하기 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

Probe 제작

RNA의 cDNA 역전사 반응과 Cye labelling 과정의 시약들은 DNA-chip hybridization kit(마크로젠사)를 사용하였다. 제작자의 지시에 따랐으며, 이를 간략히 기술하면; 50 µg total RNA에 1.5 µg oligo(dT)primer를 넣고 70°C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 정치하였고, 역전사 표지 반응은 각 1 mM dATP, dGTP, dCTP, 0.4 mM dTTP 및 각 0.15 mM Cy3-, Cy5-dUTP를 첨가하고 50 unit AMV reverse transcriptase를 사용하여 총 20 µl 반응액으로 cDNA를 Cye-dye-labelling 하였다. 역전사 반응 후 Sephadryl S-100으로 labelling 된 cDNA를 정제하였으며 정제된 cDNA는 에탄올 침전으로 농축하고 sample 및 control 각 17.5 µl hybridization buffer(6×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhardt Solution, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA)에 녹인 후 합하여 probe로 사용하였다.

Hybridization

cDNA chip은 Genomictree 사의 HCC v2.0(Human Cancer chip 1kb spots)을 사용하였다. 30 µl prehybridization buffer(6×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhardt solution, 1 mg/ml salmon sperm DNA)를 cDNA chip에 넣고 cover glass로 덮은 후 밀봉하여 상온에서 2시간 정치하였다. 2×SSC와 0.2×SSC로 cDNA chip을 세척한 다음 원심분리기를 이용하여 전조시켰다. 35 µl labelling된 probe를 95°C에서 2분간 정치하여 변성시킨 후 DNA chip위에 떨어뜨리고 cover glass로 덮었다. DNA chip을 100% 습도를 유지시킨 chamber 안에 넣어 62°C에서 16시간 동안 hybridization하였다.

Hybridization 후 60°C에서 세척용액(2×SSC, 0.2%SDS)으로 각각 30분씩 2회 세척하였고 상온에서 0.05×SSC에 5분간 세척 한 후 원심분리로 건조시켰다.

Microarray 분석

cDNA chip의 판독과 해석은 Axon사의 Microarray Scanner/GenePix 4000B를 이용하였다. Cye3와 Cye5의 비율이 1.0이 되도록 프로그램으로 조절하고, 이를 Ratio of medians 값을 기준으로 발현 증가와 감소를 분석하였으며, 이와 동시에 발현의 차이가 4배 이상 보이는 유전자들을 검색하여 분석하였다.

결 과

방사선 조사 후 생세포수의 측정

본 연구에서 사용된 U-937은 사람의 histiocytic lymphoma 세포이며(Sundstrom, et al., 1976), 이온화 방사선 조사를 위해 사용한 핵종은 ^{137}Cs 이며, 선량은 100rad(7초)이었다. 본 실험에서는 방사선을 조사하지 않은 세포(대조군)와 100rad(시료) 조사된 세포의 유전자 발현 양상을 비교하였다.

시료와 대조군을 각각 4×10^5 cell/ml의 세포농도로 30 ml을 준비하여 방사선 조사 24시간 후 살아 있는 세포의 수의 차이를 측정하였다. 방사선에 조사되지 않은 조건의 세포들은 8.2×10^5 cells/ml농도로 약 2배의 증가를 보였으나, 방사선이 조사된 세포의 경우 세포 농도가 2.99×10^5 cells/ml로 생존 세포 수가 감소하였다(자료 미제시). 이는 세포분열과 관련한 세포 활동의 변화는 내부의 생리적인 변화로, 유전자 발현의 수준에서도 변화가 있음을 간접적으로 나타내 주었다(Fornace., 1992). 이를 좀더 구체적으로 확인하고자 cDNA chip을 이용하여 발현이 증가된 유전자와 감소된 유전자를 검색하였다.

DNA-Chip 분석

γ 선 조사로 인한 U-937의 mRNA 발현을 Genomictree 사의 HCC v2.0 chip으로 분석하였다. 사람의 발암 관련유전자 cDNA 1000개를 가진 chip을 사용하였으며, total RNA를 사용하여 cDNA를 Cy3/Cy5-dUTP로 labelling 하여 probe로 사용하였다. Hybridization 후 Fig. 1과 같은 cDNA chip의 scanning 결과를 얻었으며 본 자료를 분석하여 발현의 차이를 보이는 유전자들을 선별하기 위해 scanning과 이미지의 데이터 분석은 Axon Instruments사의 GenePix Pro 3.0를 이용하였다.

영상 분석에서 I_A , λ_k 는 파장 k에서 하나의 pixel이 갖는 값이며, I_B , λ_k 는 하나의 background pixel의 파장 k에서의

값이다. 프로그램에서 자동으로 spot의 범위를 설정하여 범위 내부의 pixel 각각의 $[(I_B, \lambda_1)n]\text{median}$ 을 계산하였으며 내부 pixel의 3배 면적을 설정하여 background pixel의 $[(I_B, \lambda_1)n]\text{median}$ 을 계산하였다. Control과 100rad의 발현 정도는 각각의 중앙값을 비교하였다.

$$\text{Control}(\text{Cy}3) = [(I_P, \lambda_1)n]\text{median} - [(I_B, \lambda_1)n]\text{median}$$

$$100\text{rad}(\text{Cy}5) = [(I_P, \lambda_2)n]\text{median} - [(I_B, \lambda_2)n]\text{median}$$

위의 결과에서 대조군과 100rad 시료의 수치가 각각 1000이상의 발현을 보인 자료만을 인정하였다. 본 실험에서 발현의 변화는 control(Cy3)에 대한 시료(Cy5)의 변화도를 측정하게 됨으로써 Cy5/Cy3의 비율로 발현의 증가와 감소를 계산하고, Cy5와 Cy3의 양이 비슷하여 변화가 없을 경우 Cy5/Cy3의 비율은 1에 근접하게되며, 즉 Cy5/Cy3의 비율이 >1일 경우 발현이 증가됨을 나타내고, <1의 경우는 반대로 발현이 감소됨을 나타낸다. 이는 곧 ratio of median

Table 1. List of up regulated gene exposed to in U-937 γ -irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Gene Symbol	^a Number	Fold
PPP2R5B	AA129171	1.325
YWHAH	N69107	1.334
ATF4	AA600217	1.337
EPB72	R62817	1.338
UBE1L	N23454	1.348
ATM	AA016254	1.354
CORO1A	AA047478	1.365
IL15	N59270	1.403
LCN2	AA400973	1.406
FHL3	AA460438	1.415
RPL32	R43544	1.876
D13S106E	AA250746	2.069

^aGeneBank Accession number.

Table 2. List of down regulated gene exposed to in U-937 γ -irradiation identified using by the human cancer DNA chip

Gene Symbol	^a Number	Fold
DCTD	AA448207	0.354
CDC25A	H59260	0.531
IMAGE:123971	R008884	0.582
IMAGE:2571385	AW074896	0.610
TNFRSF1B	AA150416	0.622
IMAGE:796087	AA460374	0.626
KSR	H88143	0.663
SFN	AA191692	0.664
TNFAIP1	AA456314	0.667
KIAA1595	AA496999	0.668
CTAG1	AI218223	0.678
VTN	H29054	0.680
PSCD2	AA464957	0.686
CCNB1	R46787	0.686

^aGeneBank Accession number

값으로 표시되며 발현의 변화를 보이는 유전자의 spot만을 ratio of median값을 우선으로 정리하였다(Table 1, 2). Fold induction값은 ratio of Medians값을 기준으로 삼았으며 계산 공식은 다음과 같다.

$$\text{Ratio of Medians} = \frac{[(I_P, \lambda_1)n]\text{median}-[(I_B, \lambda_1)n]\text{median}}{[(I_P, \lambda_2)n]\text{median}-[(I_B, \lambda_2)n]\text{median}}$$

본 cDNA microarray hybridization의 영상분석을 통하여 가장 발현이 증가한 유전자는 D13S106E(highly charged protein) 유전자였으며, 가장 많은 감소를 보인 유전자는 DCTD(dCMP deaminase) 유전자였다. 대조군에 비하여 방사선이 조사된 U-937세포에서 mRNA의 발현이 가장 많이 증가된 유전자군 중 상위 10개의 유전자와 mRNA의 발현이 가장 많이 감소된 유전자군 중 하위 10개의 유전자들은 표로 정리하였다(Table 1, 2).

고 찰

발현이 증가된 유전자 가운데서 DNA 수복 기작 관련 유전자인 ATM(ataxia telangiectasia mutated)는 p53관련 유전자이며 세포 주기와 DNA의 수복에 관련하여 phosphorylated p53을 통해 활성을 갖는다. 세포 신호와 관련해서는 ATM과 CORO1A(coronin, actin-binding protein, 1A), IL15(interleukin 15)유전자 발현이 크게 증가하였으며, 구조 단백질 관련 유전자의 발현이 증가하여 RPL32(Ribosomal protein L32), FHL3(four and a half LIM domains 3) 유전자와 단백질 분해와 면역 관련 유전자로 LCN2(lipocalin oncogene 24p3) 유전자가 발현이 증가하였다(Fig. 1). p53유전자의 발현도 대조군에 비해 방사선 조사된 세포에서 증가를 보였다.

발현이 감소된 CDC25A(cell division cycle 25A) 유전자는 세포 분열에 필요한 유전자로 DNA 손상이 있을 경우 감소하는 반응을 보이는 유전자이며, 절단된 DNA의 가닥을 재결합시키는 TOP2B(topoisomerase II)도 발현의 감소를 보였다. Tumor antigen이며 세포의 분열에 관여하는 유전자인 CTAG1(cancer/testis antigen)와 세포의 외부 단백질로 세포 부착과 관련한 구조 단백질 유전자 VTN(vitronectin, serum spreading factor, somatomedin B complement S-protein), 단백질의 운반과 membrane trafficking에 관련하여 ARF1, ARF3, ARF6와 함께 활성을 보이는 PSCD2(pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coil domains2 cytohesin-2), p53 유전자에 의해 조절되어 세포 분열을 억제하는 SFN(stratigin)유전자가 발현의 감소를 보였다. 또한 발현의 감소를 보인 KSR(kinase suppressor of ras) 유전자도 역시 cell cycle 조절하는 단백질이다(Fig. 2).

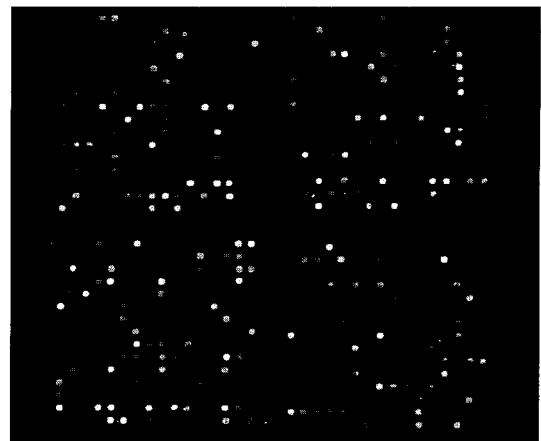


Fig. 1. Color image of microarray used to analyze transcript level in cultured U937 cells after gamma-radiation with ^{137}Cs (100rad). Total RNA was extracted from U937 cells immediately 24h after irradiation. Each RNA sample was used as a template for synthesis of cDNA probes, which were incorporated with either Cy3- or Cy5-dUTP. The probes were mixed and hybridized to a microarray slide (Genomictree in Korea). The slide were scanned in laser scanning (Axon Instruments in U.S.). The control (0rad) was labeled with cy3-dUTP (green) and the radiated sample (100rad) was labeled with cy5-dUTP (red).

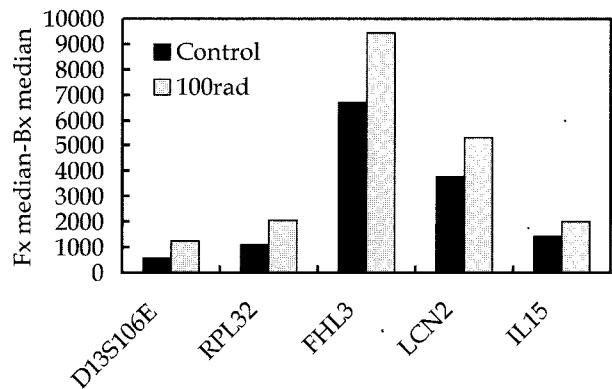


Fig. 2. Microarray analysis of up-regulated gene expression by γ -irradiation. D13S106E, highly charged protein; RPL32, ribosomal protein L32; FHL3, four and a half LIM domains 3; LCN2, lipocalin 2 (oncogene 24p3); IL15, interleukin 15. F_x median = $[(I_P, \lambda m)n]\text{median}$, B_x = $[(I_B, \lambda m)n]\text{median}$; m, Cy3- or Cy5-dUTP; n, kind of wave.

이온화 방사선에 조사되지 않은 세포들에 비해 방사선에 조사된 세포들은 cell cycle 관련 유전자들의 발현이 감소하였으며, 반면 발현이 증가된 유전자들의 대부분은 세포의 구조 관련 유전자와 DNA 손상에 반응하는 유전자다. 대조군에 비하여 방사선 조사된 세포의 낮은 생존율과 cell cycle 관련한 유전자인 CDC25A 발현 감소로 세포 분열에 필요한 유전자들의 발현과 상관관계를 알 수 있다.

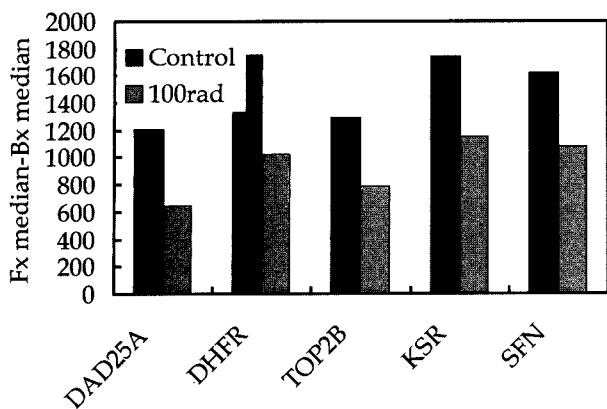


Fig. 3. Microarray analysis of down-regulated gene expression by γ -irradiation. DAD25A, cell division cycle 25A; DHFR, dihydrofolate reductase; TOP2B, topoisomerase (DNA) II beta (180 kD); KSR, kinase suppressor of ras; SFN, strarigin. Fx median = $[(I_B, \lambda m)n]median$, Bx = $[(I_B, \lambda m)n]median$; m, Cy3- or Cy5-dUTP; n, kind of wave.

p53에 관련하여 대부분의 cell line에서 보여지는 방사선에 의한 발현이 증가되는 유전자인 *BCL3*, *FRA1*, *ATF*, *REL-B*, *PC-I*, *MDM2*, *CIP1/WAF1* 등(Amundson et al., 2001)은 본 연구 결과에서는 그 발현에 뚜렷한 증가는 없었다. Cell line의 종류와 방사선량, 방사선 조사 후의 세포 배양 시간 등의 차이는 microarray 분석 결과에 많은 차이를 보일 수 있을 것이라 사료되며 향후 이들 조건에서 cDNA microarray를 이용한 방사선 감수성 유전자의 탐색 및 RT-PCR, Northern blotting 등의 확정 실험이 요구되고 있다 하겠다.

감사의 글

본 연구는 과기처 국가 원자력 중장기 연구개발사업의 연구비(과제번호 M20104000033-01A0400-01521)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Amundson, S.A., Bitter, M., Chen, Y., Trent, J., Meltzer, P., Fornace, A.J. Jr. (1999): Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene*. Jun 17; **18**(24), 3666-72.
- Amundson, S.A., Bitter, M., Meltzer, P., Trent, J., Albert, J., Fornace, Jr. (2001): Physiological function as regulation of large transcriptional programs: the cellular response to genotoxic stress. *Comp Biochem Phys*. **129**(2001), 703-710.
- Amundson, S.A., Do, K.T., Shahab, S., Bitter, M., Meltzer, P., Trent, J., Fornace, A.J. Jr. (2000): Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* Sep **154**(3), 342-6.
- Benditt, E.P. (1977): The origin of atherosclerosis. *Sci. Am.* **236**(2), 74-75.
- Boothmab, D.A., Burrows, H.L., Yang, C.R. (1997): Damage-sensing mechanisms in human cells after ionizing radiation. *Stem. cells.* **15**(suppl2), 364-374.
- Bowtell, D.D.L. (1999): Options available - from start to finish - for obtaining expression data by microarray. *Nature Genet.* **21**, 25-32.
- Brown, P., Botstein, D. (1999): Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* **21**(Suppl 1), 33-37.
- Cleary, M.L., Sklar, J. (1985): Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **82**, 7439-7443.
- Compton, P.J.E., Hooper Kim, Martyn T. Smith. (1991): Human somatic mutation assays as biomarkers of carcinogenesis. *Environ. Health Persp.* **94**, 135-141.
- Fornace, A.J. Jr., Amundson, S.A., Bittner, M., Myers, TG., Meltzer, P., Weinsten, J.J., Trent, J. (1999): the complexity of radiation stress responses: analysis by informatics and functional genomics approaches. *Gene Expr* **7**(4-6), 387-400.
- Fornace, Jr., A.J. (1992): Mammalian genes induced by radiation: activation of gene associated with growth control. *Ann. Rev. Genent.* **26**, 507-526.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995): DNA repair and Mutagenesis.
- Goodhead, D.T. (1994): Initial event in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Rad. Biol.* **65**, 7-17.
- Holbrook, N.J., Lie, Y., Fornace Jr., J.J. (1996): Signaling events controlling the molecular response to genotoxic stress. Stress-Inducible cellular responses, 273-288.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P.A., Gingras, T.R. (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**, 20-24.
- Nicholas, F., Paoni, David, G., Lowe. (2001) Expression profiling techniques for cardiac molecular phenotyping. *TCM* **11**(6), 218-221.
- Sundstrom, C., Nilsson, K., (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line(U-937). *Int. J. Cancer* **17**, 565-577.
- Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W.S., Waldman, T., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1994): p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum. Mol. genet.* **3**, 1537-1542.
- Tromp, G., De Paep, A., Nuytinck, L., Madhatheri, S., Kuivaniemi, H., (1989): A single base mutation that substitutes serine for glycine 790 of the alpha-1(III) chain of type III procollagen exposes an arginine and causes Ehlers-Danlos syndrome IV. *J. Biol. Chem.* **264**, 1349-1352.
- Tromp, G., Kuivaniemi, H., Stolle, C., Pope, F.M., Prockop, D.J. (1989): Single base mutation in the type III procollagen gene that converts the codon for glycine 883 to aspartate in a mild variant of Ehlers-Danlos syndrome IV. *J. Biol. Chem.* **264**, 19313-19317.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M. (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.

- Science* **228**, 1440-1443.
- United Nations Scientific Committee on the effects of atomic radiation. Genetic and somatic effects of ionizing radiation, Report to the general assembly, with annexes (1986): United Nations, New York.
- Ward, J.F. (1994): The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int. J. Radiat. Biol.* **66**, 427-432.
- Ward, J.F. (1995) Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat. Res.* **142**, 362-368.
- Woloschak, G.E. (1997): Radiation-induced responses in mammalian cells. In Book, Stress-Inducible processes in Higher Eukaryotic cells, 185-219.