

MCF-7 세포주의 γ 선에 의한 DNA 손상 반응 유전자 발현 양상의 분석

박지윤 · 황창일¹ · 박웅양¹ · 김진규² · 채영규*

한양대학교 생화학 및 분자생물학과, ¹서울대학교 의과대학 생화학교실,
²한국원자력연구소 동위원소 방사선 응용팀

A DNA-Damage Response Gene Expression Analysis in MCF-7 followed by γ -Radiation

Ji-Yoon Park, Chang-Il Hwang¹, Woong-Yang Park¹, Jin-Kyu Kim² and Young Gyu Chai*

Department of Biochem & Mol. Biol, Hanyang University Ansan 425-791, Korea

¹Department of Biochem, Seoul National University, College of Medicine Seoul 110-799, Korea

²RI Radiation Research Team, Korea Atomic Energy Research Institute 305-353, Korea

Abstract - Cell response to genotoxic agents is complex and involves the participation of different classes of genes including cell cycle control, DNA repair and apoptosis. In this report, we presented a approach to characterize the cellular functions associated with the altered transcript profiles of MCF-7 exposed to low-dose *in vitro* gamma-irradiation. We used the method of human 2.4 k cDNA microarrays containing apoptosis, cell cycle, chromatin, repair, stress and chromosome genes to analyze the differential gene expression characterization that were displayed by radiation-exposed cell, human breast carcinoma MCF-7 cell line, such as 4 Gy 4 hr, 8 Gy 4 hr, and 8 Gy 12 hr. Among these genes, 66 were up-regulated and 49 were down-regulated. Specific genes were concomitantly induced in the results. Cyclin dependent kinase 4 (Cdk4) is induced for starting the cell cycle. This regulation is required for a DNA damage-induced G1 arrest. In addition to, an apoptotic pathways gene Bcl-w was concomitantly induced. Mismatch repair protein homologue-1 (hMLH1), a necessary component of DNA mismatch protein repair (MMR), in G2-M cell cycle checkpoint arrest. The present study provides new information on the molecular mechanism underlying the cell response to genotoxic stress, with relevance to basic and clinical research.

Key words : irradiation, MCF-7, DNA-damage response, gene expression

서 론

생체에 방사선이 조사되면, 방사선 에너지가 생체를

구성하는 원자, 분자로 이동하여 물리 화학적 작용에 의해 화합물의 조성이 변화한다. 이러한 변화는 세포기능의 장애를 유도하며, 고도 장애의 경우 세포의 증식이 억제되거나 세포가 사멸되어 조직이 파괴된다. 또한, 방사선과 같은 유전독성 스트레스는 세포에서 스트레스 관련 신호를 유도하여 세포주기 조절 (Wang *et al.* 1999),

*Corresponding author: Young Gyu Chai, Tel. +82-31-400-5513,
Fax. +82-81-406-6316, E-mail. ygchai@hanyang.ac.kr

세포사멸 (Sheard *et al.* 1997), DNA 수선 (Bashkirov *et al.* 2000) 등과 관련된 여러 유전자의 발현을 변화시켜 다양한 세포의 반응을 유도한다 (Papathanasiou and Fornace 1991; Fornace *et al.* 1999a).

방사선에 민감한 세포로 알려진 MCF-7 세포 (O'Connor *et al.* 1997; Fornace *et al.* 1999b; Soto *et al.* 2000)는 외부의 유전독성 스트레스에 대한 반응성이 뛰어나 방사선 연구에 주로 적용되는 세포주이다.

세포가 유전독성 스트레스에 노출되면, 세포의 주기 체크 포인트는 세포 주기를 일시적으로 중단하여 세포가 복제 또는 감수분열 단계에 이르기 전에 손상된 DNA를 수선할 수 있도록 한다 (Fornace *et al.* 1999a). Cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) 유전자는 G1 주기에서 cyclin D와 복합체를 형성하여 G1-S 세포주기의 조절에 작용하고, 망막아종 (retinoblastoma : Rb)의 기능 조절을 수행한다 (Gabrielli *et al.* 1999). Bcl-w는 세포사멸 (apoptosis)의 조절자로 작용하여 DNA 손상에 의한 세포사를 방지하여 세포내의 반응을 효과적으로 조절하며, 오류수선 유사 단백질 (mismatch repair protein homolog, hMLH1)은 G2/M 체크 포인트에서 DNA 오류의 수선에 필수적인 것으로 보고되었다 (Berry *et al.* 1999).

따라서, 본 연구는 MCF-7 세포의 방사선 조사에 따른 DNA damage response를 살펴보기 위해 방사선 처리 후 배양 시간에 따른 유전자의 발현 양상을 cDNA microarray를 사용하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포의 배양

MCF-7 세포 (Pratt and Pollak 1993)는 한양대학교 의과대학 유전학실의 이철훈 교수 연구실에서 분주 받았고, 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, USA) 100 units mL⁻¹의 penicillin, 100 µL mL⁻¹의 streptomycin (Gibco-BRL, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, USA)을 이용하여 5% CO₂와 37°C가 유지되는 배양기에서 12시간 배양하였다.

2. 방사선의 조사

방사선 조사는 서울대학교 의과대학의 방사선 조사기 (Cs-137 irradiator, USA)를 이용하였고, 사용된 방사선 기준량은 282.2 cGy min⁻¹이었다 (Park *et al.* 2003). 실험군은 MCF-7 세포에 처리한 방사선 조사량과 방사선

조사 후 배양 시간에 따라 실험군 A (4GY4H), B (8GY4H), C (8GY12H)로 나누었으며, 각 실험군의 조건은 다음과 같다. 실험군 A는 4 Gy (1분 25초)로 쬐어준 후 4시간 배양하였고 (4GY4H), 실험군 B는 8 Gy (2분 5초)로 조사하여 4시간 배양하였으며 (8GY4H), 실험군 C는 8 Gy (2분 50초)의 방사선을 처리하여 12시간 배양하였다 (8GY12H).

3. Total RNA 분리 및 확인

Total RNA의 분리는 Trizol 방법 (Gibco-BRL, USA)에 따라 각 실험군 A (4GY4H), B (8GY4H), C (8GY12H)로부터 정제하였다 (Chomczynski and Sacchi 1987). 얻어진 RNA의 확인은 1% 포름알데하이드 아가로스 겔에서 수행하였다 (Lehrach *et al.* 1977).

4. Probe 준비

각 실험군 A (4GY4H), B (8GY4H), C (8GY12H)로부터 준비한 probe 합성과정은 다음과 같다. 각각의 Cy5 probe와 Cy3 probe는 total RNA 50 µg, mRNA (1.0 kb), oligo-dT (1.5 µg), DEPC-처리된 멸균수를 첨가하여 각 probe의 부피를 20.5 µL로 맞추었다.

실험군 A, B, C에서 준비된 각각의 Cy3 probe, Cy5 probe는 70°C에서 5분 동안 열변성 과정을 거쳐 5× Avian myeloblastosis viral (AMV) reverse transcriptase (Promega, USA)에 의한 RT-PCR 과정을 수행하였다. RT-PCR 조건은 AMV buffer (Promega, USA) 8 µL, low dT NTP (5 mM dATP, dGTP, dCTP, 2 mM dTTP) 4 µL, Cy3-dUTP (Amersham Bioscience, USA) 4 µL, Cy5-dUTP (Amersham Bioscience, USA) 4 µL, RNase inhibitor 1 µL, AMV reverse transcriptase (20 unit µL⁻¹) 2.5 µL를 첨가하여 반응액의 부피를 40 µL로 맞추었다. 각각의 Cy3 probe, Cy5 probe를 42°C에서 1시간 동안 반응하여 AMV reverse transcriptase를 첨가하여 RT-PCR 반응을 수행하였다. 반응은 0.5 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 5 µL, 1N NaOH 10 µL를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응용액에 1 M Tris-HCl (pH 7.5) buffer 25 µL를 첨가하고 CentriSep spin column을 사용하여 1,000×g에서 3분간 원심 분리하였다. 원심분리가 끝난 반응액에 준비한 probe를 첨가하여 2.5배 부피의 100% 에탄올 250 µL, 0.1배 부피의 3 M sodium acetate 10 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 -70°C에서 15분 동안 유지하였다. 침전된 cDNA는 15,000×g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하고 70% 에탄올 1 mL로 세정하여, 원심분리를 통해 pellet을 분리하였다. Cy3 probe와 Cy5

probe는 건조하여 각각 hybridization buffer 7.5 μ L씩 첨가하여 15 μ L의 probe를 준비하였다.

5. Prehybridization of arrays

본 연구에 사용한 Human 2.4k cDNA microarray (Macrogen, Korea)는 apoptosis, cancer, cell cycle, chromatin, chromosome, stress, repair, proteasome, brain, cytokine, cytoskeleton, hormone, metabolism, mitochondria, transport 등 관련된 1,800여개의 유전자와 300여개의 EST, 100여개의 unknown gene을 포함한 2,400여개의 유전자 정보를 지닌 chip으로서, 본 방사선 연구의 목적에 부합하는 유전자를 갖추고 있어 본 연구수행에 사용하였다. Array 위에 준비한 전하이브리드 용액 (prehybridization buffer) 15 μ L를 떨어뜨리고, 덮개 유리를 덮어 상온에서 2시간 동안 반응하였다. 세정은 2 \times SSC (saline sodium citrate buffer), 0.2 \times SSC 용액으로 각각 2분간 세척하여 원심 분리로 140 \times g에서 3분간 건조하였다.

6. Hybridization and Scanning

합성된 DNA probe 15 μ L를 단일 가닥으로 만들어, 덮개 유리를 덮은 후, 62 $^{\circ}$ C 하이브리드 형성기 (hybridization incubator (Finemould Precision Ind. Co., Korea))에서 12시간 동안 하이브리드 반응을 수행하였다. 세정은 시트레이트 생리식염수 용액 (2 \times SSC/0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS))을 이용하여 58 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 2회 세척하고, 0.05 \times SSC 용액으로 5분간 상온에서 세척하여 원심분리로 140 \times g에서 3분간 건조하였다. 결과의 분석은 GMS418 스캐너 (Affimetrix, USA)와 Image 3.0을 이용하여 이미지 비교, 분석을 수행하였다 (Park *et al.* 2003).

결과 및 고찰

본 방사선 연구의 목적은 방사선의 조사량과 반응 시간에 따른 MCF-7 세포의 DNA damage 반응을 연구하기 위하여 실험군 A (4GY4H), B (8GY4H), C (8GY12H)를 통하여 유전자 발현 양상을 살펴보았다. 비교 유전자 (Control gene)는 lambda DNA 단편을 사용하였고, 실험군 A, B, C로부터 각각 0.46, 0.47, 0.45의 Pearson correlation 값을 얻었다. 이를 통해 3가지 실험 조건에서 객관적인 유의수준을 확인하였다.

유전자의 발현 변화는 log₂값을 기준으로 발현의 증가

및 감소를 파악하였다 (Eisen *et al.* 1998). 이러한 기준에 따라 비교 유전자로 선택한 lambda DNA 단편보다 log₂ 값이 1배 이상 (즉, 대조군보다 2배 이상) 발현된 유전자에 제한하여 발현의 변화를 관찰하였다. 발현의 변화를 나타낸 유전자 115개 중에서 66개의 유전자는 발현이 증가되었으며, 49개의 유전자는 발현이 감소되었다 (Table 1).

사람의 암 세포주에 방사선을 조사하여 유전자 발현 양상을 살펴본 대표적 선행 연구는 p53 wild type을 갖는 ML-1, Molt4, SR, A549, MCF7, RKO의 6개 세포주와 p53 mutant type을 갖는 CCFR-CEM, HL60, K562, H1299, RKO-E6, T47D의 6개 세포주에 20 Gy의 γ 선을 처리하여 4시간 배양 후 나타나는 유전자 발현 양상과 alkylating agent, UV를 조사하여 4시간 후 관찰되는 유전자 발현 양상을 아울러 분석한 결과였다 (Fornace *et al.* 1999b). 20 Gy의 γ 선을 MCF-7 세포주에 처리하여 4시간 배양 후 특이적인 발현 양상을 나타낸 유전자는 FRA1 9.5배, REL-B 4.4배, MDM2 2.5배, CIP1/WAF1 22.4배, BAX 2.9배로 증가되었다 (Fornace *et al.* 1999b).

반면, 본 연구의 독립된 3개의 실험군 A (4G4H), B (8G4H), C (8G12H)로부터 유전자 발현양상의 증가 및 감소의 변화를 나타낸 유전자들의 수치를 아래의 표에 나타내었다 (Table 2, Table 3 and Table 4). Fornace 그룹의 선행연구와 본 연구에서 나타난 유전자 발현양상의 차이는 4 Gy, 8 Gy의 낮은 강도의 방사선량과 서로 다른 배양시간에 따라 발현되는 mRNA의 종류에 기인한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 발현양상의 변화를 나타낸 주요 유전자들 중 세포주기, 세포사멸, DNA repair에 초점을 두어 살펴보았다. 본 연구결과로부터, Cdk4와 cyclin D1의 유전자의 발현이 함께 증가함을 확인하였다. Cdk4 유전자의 발현은 실험군 A (4G4H)에서 1.2배, B (8G4H)에서 1.8배, C (8G12H)에서 2.0배 증가하였고, 동시에 Cdk4와 복합체를 형성하는 cyclin D1의 발현이 실험군 A, B, C

Table 1. The transcriptional response of MCF-7 cell line to γ -radiation

Treatment	Number of known genes	
	Induced	Repressed
4 Gy 4 hr	27	11
8 Gy 4 hr	25	17
8 Gy 12 hr	14	21
Total	66	49

*We found that exposure to γ -ray alters by at least a log₂ factor of 1.0 the expression 115 known genes and of an equivalent number of expressed sequence tags in the following conditions of 4 Gy 4 hr, 8 Gy 4 hr, and 8 Gy 12 hr.

Table 2. 4G4H gamma radiation-induced fold changes in expression

Induced genes (27)	log ₂ factor	Function
Cdc5-related protein (PCDC5RP)	6.8	cell cycle
Histone H2A.Z	6.2	chromatin
TRRAP protein/ATM-related protein	5.4	apoptosis
Eukaryotic translation initiation factor 1A	5.1	RNA
Monocyte differentiation antigen CD14 precursor	5.1	CD
p21/WAF1	4.8	cell cycle
Small zinc finger-like protein (DDP2)	4.6	transcription
Endozepine	4.4	cytokine
Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	3.9	coagulation
Heterochromatin protein 1 homolog gamma	3.7	chromatin
Amyloid-like protein 2 precursor	3.6	apoptosis
Hsp70	3.6	stress
Estradiol 17 beta-dehydrogenase 2	3.4	hormone
Interleukin-11 receptor	3.4	cytokine
Erythroblast macrophage protein EMP	3.0	differentiation
Glutathione peroxidase precursor	2.9	repair
Transposon-like element THE-7 sequence	2.8	transport
Ribosomal protein S3a	2.7	ribosome
Histone H1 (0)	2.7	chromatin
Ribosomal protein L14 (RPL14)	2.5	ribosome
Calmodulin	2.4	calcium
Retinoblastoma-binding protein (RbAp46)	2.3	cancer
c-myc binding protein/MM-1/CA repeat +	2.3	transcription
bcl-w/KIAA0271	2.2	apoptosis
Nucleoside diphosphate kinase A	2.1	metabolism
Hsp82	2.0	stress
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD)	1.7	metabolism
Repressed genes (11)	log ₂ factor	Function
Chorionic somatomammotropin hormone CS-2	-5.9	hormone
Insulin-like growth factor II	-4.2	signaling
Guanidine nucleotide-binding protein, G(i)2, alpha-subunit	-3.8	signaling
Procholecystokinin precursor	-3.6	hormone
Oncoprotein 18 (Op18) gene, complete cds.	-2.6	cancer
Perosin	-2.5	unknown
60S acidic ribosomal protein P1	-2.1	ribosome
ERK activator kinase (MEK2)	-1.7	signaling
estrogen receptor	-1.5	EST
Eosinophil granule major basic protein precursor	-1.3	differentiation
Chorionic somatomammotropin hormone CS-2	-1.2	hormone

Table 3. 8G4H gamma radiation-induced fold changes in expression

Induced genes (25)	log ₂ factor	Function
T-cell specific RANTES protein precursor	6.8	cell cycle
Apoptosis related protein APR-3	6.2	chromatin
GADD153	7.9	immune
CD44	7.3	apoptosis
Neuronatin	7.1	apoptosis
Cyclin G	6.8	CD
Vesicle docking protein (p115)	5.4	brain
Mitogen-activated protein kinase 7 (MAPK7)	4.7	cell cycle
Thioredoxin isolog	4.5	endocytosis
14-3-3 γ	4.4	signaling
Cyclin T2a	4.0	repair
60S ribosomal protein L5	3.8	signaling
Cyclin D1	3.6	cell cycle
M-phase phosphoprotein (mmp5)	3.2	ribosome
Hsc71	3.2	cell cycle
HRAD9/cell cycle checkpoint control protein	2.8	cell cycle
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	2.8	stress
Calmodulin (CALM1) gene	2.6	cell cycle
Histone H3.1	2.6	cancer
HMG box containing protein 1	2.5	calcium
Centromere autoantigen C (CENPC)	2.4	chromatin
HMG-17 gene for non-histone chromosomal protein (HUMAN)	2.4	chromosome
Histone H2B	2.3	chromatin
Zinc finger protein 207	2.3	chromosome
Transcription initiation factor TFIID	2.2	chromatin
Repressed genes (17)	log ₂ factor	Function
Transporter protein	-4.6	transport
Cytochrome c oxidase polypeptide III	-3.3	mitochondria
Osteopontin precursor	-2.5	bone
Amiloride-sensitive amine oxidase	-2.4	metabolism
Adenylate kinase 3	-2.3	metabolism
Neuromodulin	-2.2	brain
ATPase inhibitor	-1.9	metabolism
NADH-Ubiquinone oxidoreductase B9	-1.8	mitochondria
Arginine methyltransferase	-1.7	metabolism
Immediate early response protein B61 precursor	-1.6	transcription
Cystatin c precursor	-1.5	metabolism
Alpha II spectrin	-1.4	cytoskeleton
TRAM	-1.3	translocation
Zinc finger protein (Myc-associated)	-1.2	transcription
Autocrine motility factor receptor precursor	-1.0	cancer
Brain acid-soluble protein 1 (BASP1)	-1.0	brain
Protein kinase C substrate (80K-H)	-1.0	signaling

에서 각각 2.1배, 3.2배, 2.4배 증가하였다. 각 실험군 내에서 세포주기에 관여하는 2개의 유전자가 유의성 있게 증가하는 발현 패턴을 나타냈다. Cyclin D1은 radiation

에 대해 ipsilateral breast tumor recurrence (IBTR)에서 예후를 판단해 볼 수 있는 지표로서 사용될 수 있을 것으로 판단된다 (Turner *et al.* 2000). 이와 함께, Cdk4 유전자

Table 4. 8G12H gamma radiation-induced fold changes in expression

Induced genes (14)	log ₂ factor	Function
Checkpoint suppressor 1 (CHES1)	9.3	cell cycle
Heterochromatin protein HP1Hs-γ	6.8	chromatin
Chromodomain helicase DNA binding protein 2 (CHD2)	6.4	chromatin
RNA polymerase II elongation factor SIII	6.3	RNA
Fibronectin precursor	5.7	cytoskeleton
Cyclin A/CDK2-associated p19 (p19Skp1)	5.4	cell cycle
Member of DEAD box protein family	5.0	apoptosis
Retinoblastoma binding protein (RbAp48)	4.8	cancer
Aurora-related kinase 2 (ARK2)	4.2	apoptosis
Myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1)	4.0	cytoskeleton
M phase phosphoprotein 10	3.8	cell cycle
Mismatch repair protein homolog hMLH1	3.3	repair
Caspase-4/ICErel-II/TX/ICH-2	2.4	apoptosis
CDK4	2.0	cell cycle
Repressed genes (21)	log ₂ factor	Function
Latent TGF-β binding protein (LTBP-2)	-3.0	cell proliferation
H-cadherin	-2.7	cytokine
Potassium voltage-gated channel (subfamily H)	-2.3	transport
Fas Ligand	-2.2	apoptosis
Fibrillin-1	-2.0	cytoskeleton
Thymosin β-4	-1.7	immune
60S ribosomal protein L28	-1.5	ribosome
Cyclin D2	-1.4	cell cycle
Actin filament-associated protein	-1.4	cytoskeleton
Tubulin β	-1.3	cytoskeleton
HIR (histone cell cycle regulation defective)	-1.3	chromatin
Monocyte chemotactic protein 3 precursor	-1.3	cell cycle
INF-γ	-1.2	cytokine
Basic transcription factor 2 p44 (btf2p44)	-1.2	transcription
Plasminogen activator	-1.1	coagulation
Hemoglobin alpha chain	-1.1	transport
40S ribosomal protein S6	-1.1	ribosome
Platelet-activating factor acetylhydrolase isoform Ib	-1.1	coagulation
KAPPA Casein precursor	-1.0	transport
Syntaxin-binding protein 1 (STXBP1)	-1.0	cytoskeleton
Collagen alpha 1 (XV) chain precursor	-1.0	cytoskeleton

의 발현이 증가되는 현상은 방사선에 의해 p53에 의존적으로 G1 세포 주기를 중단하여 waf1의 발현을 증가시키고 궁극적으로는 세포 주기를 효과적으로 중지하여 외부의 유전독성 스트레스에 대한 세포 내의 방어 시스템의 작용을 확인할 수 있었다(Reed *et al.* 1998).

Bcl-w 유전자는 Bcl-2 family의 새로운 member이며, 세포 성장의 진행을 유도하여 apoptosis(세포사멸)의 조절을 매개한다. 본 연구에서 Bcl-w 유전자의 발현은 실험군 A (4G4H)에서 2.2배, B (8G4H)에서 2.1배, C (8G12H)에서 2.2배로 관찰되었으며, 세 개의 실험군에서 발현의 정도가 비슷하게 증가되는 양상을 나타냈다. 본 연구에서, 방사선의 강도가 비교적 높지 않은 4Gy, 8Gy의 조건에서 Bcl-w 유전자의 발현이 비슷한 수준으로 증가된 결과로부터 방사선에 의한 DNA 손상에 대비하여 세포 내의 세포사멸의 조절작용의 진행을 유추할 수 있었다(Pritchard *et al.* 2000). DNA mismatch repair protein(hMLH1)은 실험군 A(4G4H)에서 3.0배, B(8G4H)에서 1.4배, C(8G12H)에서 3.3배로 관찰되었으며, 발현 정도가 잠시 감소하다가 재증가하는 패턴이 나타나는 것은 hMLH1이 방사선에 의한 DNA base mispairing과 replication error를 교정하여, DNA 손상에 대한 세포 내 반응을 매개함으로써, 세포 손상에 대한 G2-M 세포 주기 체크포인트를 정지하도록 하여 DNA 손상을 수선하는 조절 시스템의 작용으로 분석할 수 있었다(Davis *et al.* 1998).

결 론

1. 본 연구는 MCF-7 세포에 방사선을 조사하여 DNA 손상 반응 유전자의 발현 양상을 cDNA microarray를 통하여 분석하였다.
2. 방사선 조사에 의한 발현패턴의 변화를 나타낸 유전자의 종류는 세포 주기 (cell cycle), DNA 수선 (DNA repair), 세포사멸 (apoptosis) 관련 유전자들로 관찰되었다.
3. MCF-7 세포주에 방사선을 조사하여 발현된 대표적인 유전자는 Cdk4, Bcl-w, hMLH1로 나타났다.

사 사

본 연구는 과학기술부 원자력연구기반확충사업 (2003. 6. 01 ~ 2004. 5. 31)의 일환으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Bashkirov VI, JS King, EV Bashkirova, J Schmuckli-Maurer and WD Heyer. 2000. DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of the DNA damage checkpoints. *Mol. Cell.*

- Biol. 20:4393-4404.
- Berry SE, C Garces, HS Hwang, K Kunugi, M Meyers, TW Davis, DA Boothman and TJ Kinsella. 1999. The mismatch repair protein, hMLH1, mediates 5-substituted halogenated thymidine analogue cytotoxicity, DNA incorporation, and radiosensitization in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 59:1840-1845.
- Chomczynski P and N Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Davis TW, C Wilson-Van Patten, M Meyers, KA Kunugi, S Cuthill, C Reznikoff, C Garces, CR Boland, TJ Kinsella, R Fishel and DA Boothman. 1998. Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer Res.* 58:767-778.
- Eisen MB, PT Spellman, PO Brown and D Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14863-14868.
- Fornace AJ Jr, SA Amundson, M Bittner, TG Myers, P Meltzer, JN Weinstein and J Trent. 1999a. The complexity of radiation stress responses: Analysis by informatics and functional genomics approaches. *Gene. Expr.* 7:387-400.
- Fornace AJ Jr, SA Amundson, M Bittner, Y Chen, J Trent and P Meltzer. 1999b. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 18:3666-3672.
- Gabrielli BG, B Sarcevic, J Sinnamon, G Walker, M Castellano, XQ Wang and KA Ellem. 1999. A Cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay. *J. Biol. Chem.* 274:13961-13969.
- Lehrach H, D Diamond, JM Wozney and H Boedtker. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-4751.
- O'Connor PM, J Jackman, I Bae, TG Myers, S Fan, M Mutoh, DA Scudiero, A Monks, EA Sausville, JN Weinstein, S Friend, AJ Fornace Jr and KW Kohn. 1997. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 57:4285-4300.
- Papathanasiou MA and AJ Fornace Jr. 1991. DNA-damage inducible genes. *Cancer Treat. Res.* 57:13-36.
- Park JY, CI Hwang, WY Park, JK Kim and YG Chai. 2003. Signal transduction-related gene expression analysis in MCF-7 flowed by γ -radiation. *Korean J. Environ. Biol.* 21:52-55.
- Pratt SE and MN Pollak. 1993. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Res.* 53:5193-5198.
- Pritchard DM, C Print, L O'Reilly, JM Adams, CS Potten and JA Hickman. 2000. Bcl-w is an important determinant of damage-induced apoptosis in epithelia of small and large intestine. *Oncogene* 19:3955-3959.
- Reed MF, VF Liu, MH Ladha, K Ando, JD Griffin, DT Weaver and ME Ewen. 1998. Enforced CDK4 expression in a hematopoietic cell line confers resistance to the G1 arrest induced by ionizing radiation. *Oncogene* 17:2961-2971.
- Sheard MA, B Vojtesek, L Janakova, J Kovarik and J Zaloudik. 1997. Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. *Int. J. Cancer* 73:757-762.
- Soto J, C Sainz, D Gonzalez-Lamuno, A Falkenbach and S Cos. 2000. Low radon doses sensitize MCF-7 human breast cancer cells to taxol. *Oncol. Rep.* 7:941-944.
- Turner BC, AA Gumbs, D Carter, PM Glazer and BG Haffty. 2000. Cyclin D1 expression and early breast cancer recurrence following lumpectomy and radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 47:1169-1176.
- Wang XW, Q Zhan, JD Coursen, MA Khan, HU Kontny, L Yu, MC Hollander, PM O'Connor, AJ Fornace Jr and CC Harris. 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3706-3711.

Manuscript Received: February 19, 2004

Revision Accepted: September 3, 2004

Responsible Editorial Member: Myung Chan Gye
(Hanyang Univ.)