

BALB/c 마우스의 배아 간장에서 TIS21 유전자 발현

아주대학교 의과대학 생화학교실

이 명 숙 · 홍 인 아 · 임 인 경

Expression of TIS21 in the Embryonic Liver of BALB/c Mouse

Myung Soog Lee, Lyhna Hong and In Kyoung Lim

Department of Biochemistry, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

TIS (TPA inducible sequence) genes are known as the primary response genes in the SW3T3 fibroblast treated with TPA. TIS21 and TIS1 genes are constitutively expressed in the BALB/c mouse thymus, lung, spleen and stomach.

In order to understand the function of TIS21, we investigated the changes in its expression in the BALB/c mouse, from embryo to 6 months. Northern blot hybridization results showed an increase in TIS21 expression in the whole embryo in the second week of gestation. Further investigation showed that the expression was particularly strong in the embryonic liver. After birth, on the contrary, TIS21 expression disappeared in the liver.

In order to confirm the northern results, we used *in situ* histochemical hybridization to determine the tissues which express TIS21 mRNA during murine embryonic development. Embryonic liver and brain from a 15.5-day-old rat embryo showed strong expression of TIS21 gene : the gene was expressed in the whole embryonic liver and in the neuroepithelium near the lateral ventricle of the brain at this stage.

Liver is known to be the primary locus of hematopoiesis during murine embryonic development. Transient expression of TIS21 in the embryonic liver strongly suggests an important role for TIS21 during the embryonic hematopoiesis.

Key Words: TIS21, TIS8, Hematopoiesis, Embryonic liver, *in situ* hybridization

서 론

세포분열 촉진제로 알려진 mitogen들이나 growth factor들, 그리고 tumor promoter들은 세포에 투여되어 일련의 유전자 발현을 유도하는데 이때 발현되는 유전자들을 크게 대별해 볼 때 early and late response genes으로 나눌 수 있다. Late gene의 범주에 드는 것들은 주로 structural gene이거나 neuronal phenotype을 나타내는데 관여되는 것으로 알려져 있는데 반하여¹⁻⁴, early gene들은 세포분화 및 증식에 관련되는 유전자들의 전

사를 조절하는 것으로 알려져 있다^{5,6}.

이러한 early expression gene들의 cDNA를 여러 연구실에서 각각 cloning 하여 붙인 명칭들은 다양하여서 competence⁷, immediate early gene⁸, early growth response gene⁹, 또는 primary response gene^{10,11}으로 알려져 있다. 이러한 부류에 속하는 유전자들은 세포분열 촉진제와 함께 단백질 합성 억제제인 CHX(cycloheximide)나, benzodiazepine 병행 투여시에 superinduction 되는 것으로 보아서¹², 기존의 transcription factor들이 ligand-receptor 상호 작용에 의하여 유도된 second messenger들에 의하여 activation되어 나타나는 현상으로 알려져 있다¹⁰. Tumor promoter인 TPA를 SW3T3 mouse fibroblast culture system에 투여한 후 differential screening을 통하여 분리한 TPA inducible sequence (TIS)들은 primary

저자연락처: 이명숙, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5번지, 아주대학교 의과대학 생화학교실, Tel (0331) 219-5050

response gene의 일종으로서 TIS1, TIS7, TIS8, TIS10, TIS11, TIS21, TIS28들이 분리 보고되었다¹¹. 이들 TIS 유전자들 중 TIS21은 아직 그 기능이 밝혀져 있지 않은 실정이다¹³.

본 연구실에서는 BALB/c 마우스 태령 1주에서부터 생후 6개월된 adult 마우스에 이르기까지 개체 발생과정과 개체 성장과정중에 TIS21 발현 여부를 조사한 결과 thymus, spleen과 같은 lymphoid organ과 lung에서 TIS21 유전자 발현이 항상 표현되고 있으며, stomach, heart, intestine 등의 smooth muscle 과 kidney, brain 등에서도 역시 항상 발현되는데 비하여 liver 에서는 발현이 매우 약하고 skeletal muscle에서는 거의 발현되지 않음을 보고한 바 있다¹⁴. 또한 사람의 폐암(A549, NCIH69) 및 histiocytic lymphoma(U937) 세포계에 TPA를 처리하면 TIS1, TIS8 등의 TIS 유전자 발현은 유도할 수 있는데 반하여 TIS21 발현은 거의 소실되어 있음을 보고하였다¹⁵. 이와 같은 현상들은 암세포의 신호전달계 및 암화과정 (carcinogenesis 및 tumorigenesis) 상에 TIS21 유전자가 어떤 역할을 할 것 이라는 가능성을 제시하고 있다.

포유동물의 adult에서 혈액세포의 주요 원천은 bone marrow (마우스에서는 비장도 관여함)이나 태아 때에 주요 조혈장기는 간장이다. Embryonic CFU-S(the colony forming unit of spleen)는 마우스에서 발견되고 있는데 이는 pluripotential hematopoietic stem cell로 많은 유형의 혈액세포를 만들 수 있다. Pluripotent stem cells은 committed(progenitor) stem cell, differentiating cells과 differentiated cells을 거치면서 적혈구세포(erythrocytes), platelets, 거식세포(macrophage), neutrophils, eosinophils, basophils, plasma cell, activated T cell 등을 만든다¹⁶. 태아의 간장에서 조혈작용을 하다가 출생 후에는 bone marrow에서 그 기능을 수행하는데 태령 1주된 마우스 보다는 2주된 마우스에서 TIS21 유전자 발현이 더 강하고 신생마우스 이후 adult 마우스의 간장에서는 TIS21 유전자 발현이 거의 없는 것은 TIS21 유전자와 조혈작용이 어떤 관련성이 있으리라는 가능성을 시사한다. 본 논문에서는 마우스 배아의 어느 장기에서 TIS21 유전자의 발현이 활발한 지를 규명함으로써 TIS21 유전자의 기능을 밝히는데 좀 더 접근하고자 발생과정 중에 있는 BALB/c 마우스 각 장기에서 RNA를 분리하여 Northern blot hybridization을 시행하고, rat 태아를 냉동절편하여 *in situ* hybridization을 시행하여 TIS21 발현 여부를 가시화함으로써 TIS21 유전자의 기능에 대한 연구를 진행하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

실험 동물로는 BALB/c mouse, Sprague-Dawley rat을 사용하였으며, 시약은 guanidine thiocyanate와 phenol은 molecular biology grade로서 IBI Kodak(New Haven, CT) 제품을 구입하였으며, MOPS, deionized formamide, diethyl pyrocarbonate(DEPC), formaldehyde(37%), salmon sperm DNA와 그밖의 다른 시약들은 가장 purity가 높은 grade로 Sigma 제품을 이용하였다. β -mercaptoethanol과 ethanol은 Merck(Germany) 제품을 이용하였으며 positively charged nylon membrane은 Qiagen(Chatsworth, CA) 제품을 이용하였다. $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol)는 Amersham (Arlington Hts, IL) 제품을 구입하였으며 oligolabelling kit는 Pharmacia 제품을 이용하였다. Plastic ware들은 GIBCO/BRL(MD)과 녹십자(한국) 제품을 이용하였다. 실험에 사용한 모든 시약과 plastic 그리고 glass ware들은 0.1% DEPC water를 사용하여 씻은 다음 멸균을 하거나 180°C oven 에서 12시간 이상 baking을 시행하여 RNase free condition이 되도록 하였다. Riboprobe의 합성을 위하여 Promega의 in vitro transcription kit를 사용하였으며 yeast rRNA는 BRL 제품을 사용하였고 Hyperfilm β max 필름(Amersham)과 X-ray (Kodak) 필름을 사용하였다.

TIS21과 TIS8 cDNA는 Dr. Herschman (Department of Biological Chemistry, School of Medicine, UCLA)로부터 얻었으며, CHO는 PC12 library로 부터 분리¹⁷된 것을 사용하였다.

2. 방 법

1) **Mouse 조직 준비:** BALB/c 마우스 태령 2주, 신생 마우스, 생후 7주와 6개월된 마우스에서 간장과 뇌를 분리하여 곧 바로 liquid nitrogen에 얼린 다음 바로 실험에 사용하거나 -70°C 에 보관 하였다가 실험에 사용하였다.

2) **Total cellular RNA 분리와 Northern blot hybridization 시행:** 얼려있는 조직에 0.1% β -mercaptoethanol이 들어 있는 RNazolTM B 용액(CINNA/BIOTECX LAB.)을 넣은 다음 homogenizer(Brinkman)을 사용하여 조직을 갈았다. 여기에 0.1 volume의 chloroform을 넣고 충분히 vortex을 하여 얼음에 30분 정도 보관한다. 원심 분리 후 상층액을 모아 여기에 같은 양의 2-propanol을 넣어 섞은 후 4°C에서 30분간 방치하여 RNA가 침전되

게 하였다. 원심분리를 하여 RNA pellet을 얻은 후 80% ethanol로 씻어 salt를 제거한 다음 공기중에서 말린다. 말린 pellet에 DEPC(0.1%)로 처리된 물을 넣어 충분히 녹인 다음 RNA 양과 순도는 spectrophotometer (Beckman model DU 65)를 사용하여 측정하였다. 각각 20 μ g의 total cellular RNA를 1X MOPS buffer, 2.2M formaldehyde 등이 포함된 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 분리한 다음 10X SSC buffer를 이용하여 nylon membrane에 capillary transfer를 시행하였다. RNA가 transfer된 membrane은 랩으로 싸서 UV crosslinker에 넣어 UV에 3분간 노출시킴으로써 membrane에 RNA가 부착되어 고정되게 하였다. 이 membrane은 바로 hybridization을 시행하거나 -20°C 에 보관한 후 사용하였다. Probe로 사용한 TIS21과 TIS8은 cDNA clone의 EcoRI fragment를 사용(각각 2.65Kb, 1.4Kb) 하였으며, control로 사용한 CHO는 rat cDNA library로 부터 얻은 clone을 EcoRI과 XhoI으로 자른 후 사용하였다. Random primer labelling 방법을 이용하여 $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP로 labelling을 하였으며, hybridization solution ml 당 1×10^6 cpm을 사용하였다. 42°C water bath에서 12시간 이상 hybridization을 시행한 후, washing solution (0.1XSSC+0.1% SDS)으로 씻고 X-ray 필름(Kodak)에 노출시켰다.

3) 조직표본 제작: 백서(Sprague-Dawley)의 태아(embryo)를 얻기 위해 임신 13.5, 15.5, 17.5일 된 개체로부터 태아를 적출하여 이 실험에 사용하였다. 태아를 적출한 즉시 dry ice에서 냉동하고, 12 micron 두께의 냉동절편(cryostat section)을 gelatin을 입힌 slide위에 얻은 후, 고정액(4% paraformaldehyde in PBS)에서 10분간 고정하였다. PBS로 두번 씻은 다음 triethanolamine/acetic anhydride 용액에 넣어 acetylation을 하고, 알코올 dehydration 과정(70, 80, 95, 100%)을 거치고 chloroform을 이용해 지방 성분을 제거 한 후 100%, 95% 알코올로 씻어주고 -20°C 에 보관하였다.

4) Riboprobe의 준비: TIS21 cDNA clone으로부터 NlaIII로 자른 0.5kb의 DNA(94-583)를 subclone 하여 pGem3Zf의 SmaI site에 삽입하였다(Fig. 3). 방사선 동위원소를 가진 riboprobe는 Promega의 in vitro transcription kit을 사용하였는데 이 때 T7 RNA polymerase를 선택하여 ^{35}S UTP로 표지된 antisense riboprobe를 제조하였다.

5) In situ hybridization: Hybridization 용액(50% formamide, 4XSSC(saline citrate), 500 μ g/ml salmon sperm DNA, 250 μ g/ml yeast tRNA, 1X Denhardt's 용액, 10% dextran sulfate) 1ml 당 2×10^7 cpm의 probe를 넣었고 각 슬라이드 당 60 μ l의 hybridization 용액을 점적하였다.

슬라이드 위에 cover slip을 덮고 48°C 에서 16시간 동안 incubation하였다.

Hybridization이 끝난 후 4X SSC로 씻으면서 cover slip을 제거하고 20 μ g/ml RNase A 용액에서 37°C , 30분간 처리하였다. 1mM DTT를 포함한 2X, 1X, 0.5X SSC로 단계적으로 씻은 다음 마지막으로 1mM DTT/0.1X SSC로 60°C 에서 30분간 처리하고 알코올 탈수과정 시행 후 공기 중에서 건조시켰다. Hyperfilm β max 필름(Amersham)아래서 10일간 노출시킨 후 D19 현상액으로 현상하였다.

결 과

1. Expression of TIS21 in the liver & brain isolated from the developing mice

본 연구자들이 이미 보고한 바와 같이 TIS21 유전자의 발현은 태령1주 보다는 태령 2주에서 더 활발하였으므로¹⁴, 태령 2주된 마우스태아, 신생마우스, 생후 7주와 6개월된 마우스에서 TIS21 유전자의 발현을 조사한 결과, 태령 2주된 마우스 간장에서는 TIS21 유전자 발현이 활발한데 비하여 신생마우스 간장에서는 발현이 감소되었으며 생후 7주와 6개월된 마우스의 간장에서는 발현이 더욱 소실되는 것을 관찰하였다(Fig. 1). 한편 마우스 뇌는 생후 6개월 이후에도 신생마우스에 비하여 TIS21 발현이 크게 감소하지 않음을 관찰하였다.

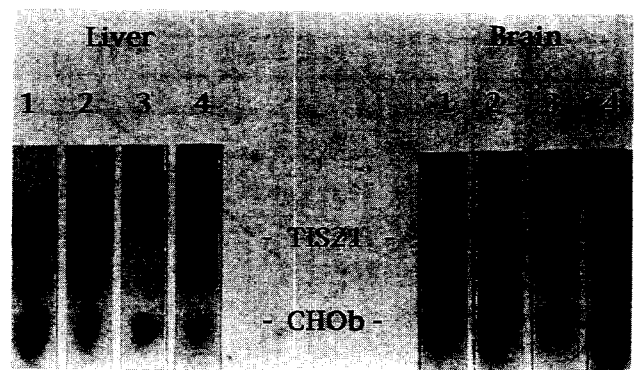


Fig. 1. Expression of TIS21 in the liver & brain isolated from the developing mice. Twenty μ g of total cellular RNAs (liver, brain) purified from the whole embryo in the second week of gestation (lane 1), newborn mice within 24 hours (lane 2), 7 week (lane 3) and 6 month old (lane 4) mice were separated on the agarose gel. TIS21 gene expression was detected by Northern blot hybridization. Relative amount of RNAs were visualized with the expression of CHO.

세포 배양계에서는 TIS21 유전자 발현이 mitogen이나 tumor promoter 또는 neurotransmitter들에 의하여 일시적으로 유도된다는 보고¹⁸와는 상이하게 뇌조직에서는 항상 발현(constitutively) 되는 사실을 다시 한번 확인하였

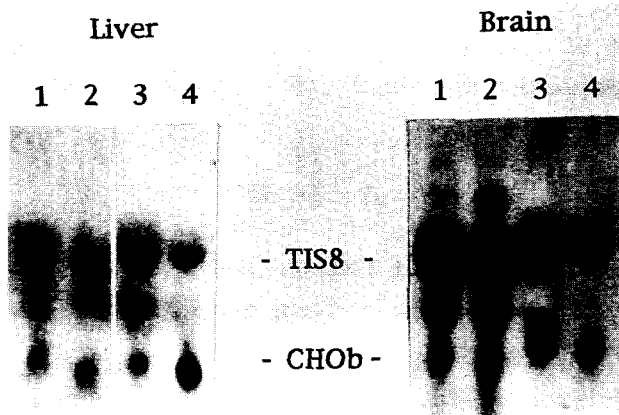


Fig. 2. Expression of TIS8 in the liver & brain isolated from the developing mice. Twenty μ g of total cellular RNAs (liver, brain) purified from the whole embryo in the second week of gestation (lane 4), newborn mice within 24 hours (lane 3), 7 week (lane 2) and 6 month old (lane 1) mice were separated on the agarose gel. TIS8 gene expression was detected by Northern blot hybridization. Relative amount of RNAs were visualized with the expression of CHOb.

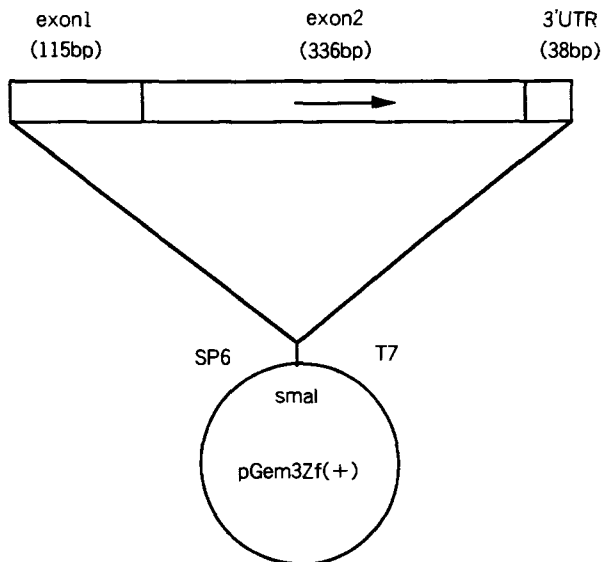


Fig. 3. TIS21 template for anti-sense riboprobe. Total 489bp TIS21 cDNA was inserted into the SmaI site of pGem3Zf vector. SP6: promoter, T7:T7 promoter

다.

2. Expression of TIS8 in the liver & brain isolated from the developing mice

Zinc-finger containing transcription factor로 알려져 있는 TIS8 유전자의 발현은 마우스 태아와 생후 6개월된 마우스 간장에서 모두 활발하게 표현되고 있음을 관찰하였다. 또한 TIS8 유전자 발현은 간장조직에서보다 뇌 조직에서 더욱 활발하였다(Fig. 2).

3. In situ hybridization

백서의 발생 단계에 따른 TIS21 유전자의 발현 양상을 살펴보기 위해 임신 15.5일 된 모체로부터 태아를 적출하여 12 micron 두께의 냉동 절편을 만들어 *in situ* hybridization을 시행한 결과 15.5일 된 태아의 간장과



Fig. 4. *In situ* hybridization. Localization of the TIS21 message in 15.5 days rat embryo. The sagittal section of embryo was hybridized with antisense TIS21 riboprobe, washed and exposed on X-ray film. Dark area represents the presence of TIS21 mRNA in the embryo. Large arrow points to the fetal liver and small arrows point to lateral ventricle of the brain.

뇌조직 일부에서 TIS21 mRNA의 강한 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 포유류에서 태아 간장은 조혈 장기로서 알려진 바 15.5일 된 백서 태아 간 조직에서의 TIS21 유전자의 강한 발현은 TIS21 유전자가 조혈 작용에 직접 혹은 간접으로 관여하리라는 가능성을 시사해 준다. 뇌 조직에서는 lateral ventricle 주변의 neuroepithelium 이 TIS21 발현을 하는 것으로 관찰된다.

고 찰

TIS21 유전자의 기능에 대한 연구보고로는 TIS21 단백질의 아미노산 서열과 59% 유사성이 있는 hBTG-1 gene이 antiproliferative gene¹⁹으로 보고된 바 있으며, murine epidermal cell인 JB6 세포주에서 TIS21 유전자는 일종의 tumor suppressor로서의 가능성을 보고하고 있다²⁰.

본 연구실에서 보고한 바에 의하면 TIS21 유전자는 thymus, spleen 같은 lymphoid organ과 lung, stomach, intestine 일부 등에서 항상 발현되고 있는 house keeping gene이다¹⁴. 이러한 사실은 TIS21 유전자 발현이 TPA에 의해서 일시적으로 유도된다는 세포 배양계에서의 보고¹⁸와는 다르게 tumor promoter나 mitogen 또는 neurotransmitter 등에 의한 외적 자극과는 무관하게 여러 장기에서 항상(constitutively) 기본적으로 발현되고 있음을 알 수 있다. 한편, 마우스 간장에서 TIS21 발현이 거의 없었던 사실에 비하여 태령 2주된 마우스 간장은 TIS21을 강하게 발현¹⁴하는 사실이 본 실험을 통하여 다시 한번 확인되었다. 태령 2주된 마우스태아, 신생마우스, 생후 7주와 6개월된 마우스 장기에서 TIS21 유전자 발현에 대해 살펴본 결과(Fig. 1) 태령 2주된 마우스 간장에서는 TIS21 유전자의 발현이 활발한데 비하여 신생마우스의 간장에서는 그 발현 정도가 감소하였으며 생후 7주와 6개월된 마우스의 간장에서는 그 발현이 거의 소실되는 것을 관찰하였다. 또한 rat 태아를 이용하여 *in situ* hybridization을 실시한 결과, 15.5일 된 rat 태아의 간장과 뇌조직에서 TIS21 유전자가 강하게 발현되었다(Fig. 4). 이는 마우스 장기를 이용한 Northern blot hybridization 결과와 일치하는 소견이다. 포유류 태아 간장은 태생기에 주로 조혈작용을 하는 것으로 알려진 바^{16,21}, 같은 시기에 TIS21 유전자 발현이 활발하다가 생후 소실되는 점은 TIS21 유전자가 배아의 조혈작용에 중요한 역할이 있음을 시사하는 것으로 추측된다.

BALB/c 마우스와 A/J 마우스의 thymus, spleen, lung, stomach 등에서 TIS21 발현이 활발하였으므로¹⁴ 생후 8

주된 마우스 비장으로부터 B-임파구, T-임파구와 거식세포를 분리하여 TIS21 유전자 발현을 조사한 결과, 세 가지 혈구세포에서 모두 활발하게 발현되고 있음을 확인한 바 있다(manuscript in preparation). 이는 TIS21 유전자가 lymphoid organ 에서 중요한 역할을 할 것 이라는 가능성을 뒷받침하는 결과이다.

조혈 장기인 태아 간장에서 TIS21 유전자 발현이 활발한 사실은 조혈작용과 밀접한 관련성이 있음을 시사하고 있으나 이를 뒷받침하기 위해 계속 연구를 진행하여 TIS21 유전자의 확실한 기능을 밝혀야 한다고 사료된다. 한편 태령 15.5일된 백서 배아 뇌조직의 lateral ventricle neuroepithelium 에서 TIS21 발현이 활발한 점과(Fig. 4), 생후 마우스 뇌조직에서 TIS21 발현이 더욱 증가되어 있는 점은(Fig. 1), TIS21이 마우스 뇌조직에 필수적인 house keeping gene 으로서 존재함을 의미한다. 이에 대한 추적 조사 역시 TIS21 유전자 기능 연구에 좋은 모델이 될 수 있을 것이다.

결 론

마우스 배아 간장에서 TIS21 유전자 발현이 활발하다가 생후에 소실되는 사실로 보아 TIS21 유전자 발현은 조혈작용에 중요한 역할이 있을 것으로 사료된다. 또한 TIS21은 마우스 뇌조직에 필수적인 house keeping gene 임을 강하게 시사하고 있다.

ACKNOWLEDGEMENT

본 연구는 교육부 기초의학 연구비(95-102, 수혜자 : 임 인경)와 1995년도 아주대학교 교내연구비(수혜자 : 임 인경)에 의하여 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Levi A, Eldridge JD and Paterson BM: Molecular cloning of gene sequence regulated by nerve growth factor. *Science* 229: 393-395, 1985
2. Masiakowski P and Shooter EM: Nerve growth factor induces the genes for two proteins related to a family of calcium binding proteins in PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1277-1281, 1988
3. Anderson DJ and Axel R: Molecular probes for the development and plasticity of neural crest derivatives. *Cell* 42: 649-662, 1985
4. Leonard DGB and Greene LA: Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12

- cells. *Mol Cell Biol* 7: 3156-3167, 1987
5. Sheng M and Greenberg ME: The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4: 477-485, 1990
 6. Tirone F and Shooter EM: Early gene regulation by nerve growth factor in PC12 cells: induction of an interferon-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2088-2092, 1989
 7. Cochran BH, Reffel AC and Stiles CB: Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 33: 939-947, 1983
 8. Lan LF and Nathans D: Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J* 4: 3145-3151, 1985
 9. Sukhatme VP, Sredharan K, Toback FG, Taub R, Hoover RG and Tsai-Morris CH: A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogen Res* 1: 343-355, 1987
 10. Yamamoto KR and Alberts BM: Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription. *Annu Rev Biochem* 45: 1976, pp721-746
 11. Lim RW, Varnum BC and Herschman HR: Cloning of tetradecanoylphorbol ester induced "primary response" sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA nonproliferative variants. *Oncogene* 1: 263-270, 1987
 12. Kujubu DA, Lim RW, Varnum BC and Herschman HR: Induction of transiently expressed genes in PC12 pheochromocytoma cells. *Oncogene* 1: 257-262, 1987
 13. Herschman HR: Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60: 1991, pp281-319
 14. In Kyoung Lim, Nam Keun Kim, Myung Soog Lee and Soo Han Lee: Expression of TIS21 gene during the development of BALB/c mice and the liver regeneration. *Korean J. Biochem.* 26(4) : 169-175, 1994
 15. In Kyoung Lim, Myung Soog Lee, Soo Han Lee, Nam Keun Kim, Ilo Jou, JS Seo, SC Park: Differential expression of TIS21 and TIS1 genes in the various organs of BALB/c mice, thymic carcinoma tissues and human cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 121: 279-284, 1995
 16. Scott E and Gilbert: *Developmental Biology*. Fourth edition. Scinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. USA, 1994, pp354-361
 17. I.K. Lim, Vician L and Herschman HR: Ligands induced PC12 cell-specific subtraction library. *Korean J. Biochem.* 26: 21-28, 1994
 18. Herschman HR: Induction of gene expression in response to mitogens, tumor promoters and neurotransmitter, In cell activation: Genetic approaches. *Advances in regulation of cell growth. vol.2* (Mond J. Cambier JC, and Weiss A eds.) Ravan Press, New York, 1991
 19. Rauault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, French M, Duret G, Garoccio M, Germain D, Samarut J and Magaud JP: BTG-1, a member of a new family of antiproliferative gene. *EMBO J.* 11: 1663-1670, 1992
 20. Joan L Cmarik, Harvey Herschman and Nancy H Colburn: Preferential primary - response gene expression in promotion - resistant versus promotion - sensitive JB6 cells. *Mol. Carcinogenesis* 11: 115-124, 1994
 21. Thompson and Thompson: *Genetics in medicine*. Fourth edition, 1992, pp226-227
-