

ORIGINAL ARTICLE

유방의 침윤성 관암에서 주요 종양 억제유전자의
이형접합 소실변우석 · 박찬흔 · 조성진¹ · 안혜경¹ · 남은숙¹ · 차희정² · 김관석³한림대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실, ²울산대학교 의과대학 병리학교실, ³김관석 의원

Loss of Heterozygosity of Major Tumor Suppressor Genes in Invasive Ductal Carcinomas

Woo Seok Byun, Chan Heun Park, Seong Jin Cho¹, Hye Gyung Ahn¹, Eun Sook Nam¹, Hee Jung Cha²,
Kwan Suk Kim³Departments of Surgery, and ¹Pathology, Hallym University College of Medicine, Seoul; ²Department of Pathology and Biomedical Research Center, Ulsan University Hospital, University of Ulsan College of Medicine, Ulsan; ³Dr. Kim's Clinic, Seoul, Korea

Purpose: Breast cancer is one of the most frequent malignant tumors in Korea. The major tumor suppressor genes (TSGs) such as p16, Rb, E-cadherin and p53 may play important roles in cell cycle regulation, apoptosis and the regulation of the expression of other genes as well as tumor suppression. Microsatellite alteration such as loss of heterozygosity (LOH) have been reported to be a novel mechanism of carcinogenesis and a useful prognostic factor for many malignant tumors. Also, LOH is also known to be related with allelic loss of various TSGs. This study evaluated LOH of 4 TSGs in invasive ductal carcinomas (IDCs) and we correlated these results with the clinicopathological factors.

Methods: LOH analysis was carried out using a polymerase chain reaction with 12 polymorphic microsatellite markers of 4 TSGs in 50 surgically resected tumors and their non-tumorous counterparts.

Results: There was no detectable LOH in the normal tissue. LOH was detected in 86% of the 50 cases of IDCs. LOH was detected on all chromosomes and this showed a stati-

stical difference between benign tumor and malignant tumor. LOH of p16, Rb, E-cadherin and p53 TSGs was detected in 36%, 26%, 54% and 60% of the tumors, respectively. LOH of the p16 and Rb genes was inversely correlated with tumor grade 1. The low rate of detecting LOH on the E-cadherin gene was noted in T1 tumor and stage I disease. LOH of the p53 gene correlated well with the tumor size and stage. The LOH-High results correlate well with the tumor size and stage and the LOH-High results are similar to those of the p53 gene LOH.

Conclusion: These results suggest that LOH of the 4 major TSGs may contribute to the development and invasion of IDCs. Also, the combined use of various LOH markers may help in deciding the prognosis of IDCs. (*J Breast Cancer* 2007; 10:68-76)

Key Words : Invasive ductal carcinoma, Tumor suppressor gene, LOH
중심단어 : 유방암, 종양억제 유전자, 이형접합 소실

서 론

한국의 의료 수준과 외과적 치료술이 선진화되었음에도 국내

책임저자 : 박찬흔

134-701 서울시 강동구 길1동 445, 한림대학교 강동성심병원 외과
Tel: 02-2224-2226, Fax: 02-2224-2570

E-mail : hhh@hallym.or.kr

접수일 : 2007년 1월 24일 게재승인일 : 2007년 2월 28일

유방암의 발생률은 계속 증가되어 왔으며, 성인 여성은 물론 젊은 연령층에서의 유방암 발생률도 증가되고 있다. (1) 유방암의 발생 요인에 대해 생활의 서구화와 호르몬 영향 및 고위험군 등이 역학적으로 제시되어 왔지만 분명한 암 전구병변에 대한 이해가 부족한 실정이다. (2, 3) 게다가 유방암은 특이 종양표지자가 드물어 외과 수술의 발전에도 불구하고 예후가 나쁜 경우가 여전히 많은 실정이다. 따라서 유방암의 진행, 침윤, 전이에 관련된 분자, 종양

생물학적 인자를 규명하고 이들의 생체내에서의 작용 및 발현 기전을 파악하는 것은 환자의 예후 추정에도 매우 중요한 것으로 생각된다.(4) 일반적으로 현재까지 많은 연구 결과 인정되는 발암 기전은 다양한 종류의 복수의 종양유전자 또는 종양억제유전자들에서의 돌연변이를 비롯한 유전자의 이상이 다단계 발암 과정에서 한 종양 세포내에서 여러 단계에 걸쳐 축적되어 발현하는 것으로 설명되고 있다.(5)

이 중 종양억제 유전자는 핵 전사와 세포주기, 세포 증식 및 신호전달 체계 등의 과정을 조절하여 종양의 발생을 억제하는 중요한 역할을 한다.(6) 특히 종양억제 유전자가 있는 두개의 대립유전자가 모두 변이 및 소실되어 일어나는 종양억제 유전자의 비활성화는 현미부수체(microsatellite) 표식자를 이용한 이형접합소실(Loss of Heterozygosity, LOH)의 확인을 통해 알아낼 수 있다. 현미부수체는 게놈(genome)의 비전사(non-coding) DNA 전반에 걸쳐 풍부하게 존재하는 짧고 반복된 형태의 DNA로 다형성(polymorphism)이 심해 염색체 결손 검사에 특히 유용하다. 이러한 특징을 갖는 현미부수체를 이용하여 염색체상에서 LOH를 검출하는 기법으로 소실 부위에 존재하는 종양억제 유전자의 비활성화를 입증할 수 있다.(7, 8) 최근 국내외적으로 거의 모든 장기의 암종을 대상으로 거의 모든 염색체의 다형성 표식자에서의 LOH에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나,(9, 10) 유방암을 대상으로 한 대부분의 LOH 연구는 특정 유전자에 국한된 연구들이 대부분이며, 다양한 중요 종양억제 유전자들을 대상으로 동시에 LOH를 규명하고 임상 및 병리학적 인자들과의 상호관계를 규명한 연구는 드물다고 할 수 있다. 더욱이 국내 문헌에는 유방암에서 LOH의 연구가 10여편 내외에 불과한 실정이다. 이에 저자들은 50예의 유방의 침윤성 관암을 대상으로 한국인에서 종양억제 유전자와 연관된 LOH 양상을 규명하기 위하여 종양학에서 가장 많은 연구가 이루어진 p53 암억제 유전자와 연관된 17번 염색체를 비롯하여 p16, pRb, E-cadherin 등 중추적인 종양억제 유전자들이 있는 9번, 13번, 16번 염색체에서 LOH를 규명하고자 하였다.

방 법

1. 연구대상

한림대학교 의료원에서 1999년 1월부터 2003년 1월까지 유방의 침윤성 관암으로 진단받고 유방 절제술 및 액와림프절 청소술을 시행한 중재 중 수술 전 항암화학요법을 받지 않았으며 환자의 임상 기록이 잘 보관되어 있고 임상 추적 기록과 파라핀 블록 상태가 양호한 50예를 연구대상으로 하였으며, 이때 각 중재 당 종양 파라핀 블록은 과사가 없고 종양 세포의 분포가 50% 이상이 되는 블록

을 선정하였다. 한편, 이들 환자들의 적출된 유방 조직 중 정상 부분 50예는 LOH 실험 기법에서 '정상 대조군'으로 사용되었으며 이 정상 대조군 중 20예에서 비종양 대조군에 대한 결과를 얻었다.

2. 연구 방법

1) 병리조직학적 검색

모든 검체는 10% 중성 포르말린에 양호하게 고정된 후 통상 병리진단을 위한 처리과정을 거친 파라핀 포매 조직을 이용하였으며 각 예에서 암종과 비암종 부위가 포함된 파라핀 블록을 선택하여 hematoxylin and eosin 염색을 시행하였다. 50예의 침윤성 관암 중재들은 광학현미경으로 조직학적 등급을 Bloom과 Richardson 체계의 변형인 Nottingham 방법(21)에 따라 세 등급으로 재분류하였으며, 종양의 크기는 2 cm 이하인 예를 T1, 2 cm 보다 크고 5 cm 이하인 경우를 T2, 5 cm보다 큰 경우를 T3으로 구분하였다.

2) 미세절제술 및 DNA 추출

DNA는 모두 파라핀 블록에서 획득하였으며, 각 중재 당 유방의 침윤성 관암 조직과 정상 조직 등 2개의 파라핀 포매 조직을 6 μ m 두께의 연속절편으로 만들어 파라핀을 제거한 후 H&E 염색을 매우 약하게 한 후, 슬라이드를 2% 글리세롤 용액에 2분간 담가 두었다가 광학현미경 하에서 관찰하면서 미세절제기를 이용하여 슬라이드상의 순수 암종과 비암종을 조직을 1 mL 주사기 바늘로 긁어내고 각각 DNA 추출 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% Tween 20, 0.1 mg/mL proteinase K)이 들어 있는 1.5 mL eppendorf tube에 넣었다. 이때 슬라이드가 바뀔 때마다 조직이 서로 오염되지 않도록 알코올 솜으로 충분히 칼을 닦아냈으며, 중재가 바뀔 때마다 오염을 방지하기 위해 새로운 칼을 사용하였다. 그 후 eppendorf tube는 2일간 52°C 수조에 두었다. 그 후 시료는 끓는 물에 10분간 방치하여 proteinase K의 반응을 불활성화시킨 후, 분광광도계로 DNA 농도를 측정한 다음 -20°C에서 냉장 보관하면서 이 중 용액 1 μ L를 중합효소연쇄반응(PCR) 증폭시 주형 DNA로 사용하였다.

3) 주요 암억제 유전자들의 현미부수체 표식자의 LOH 분석

LOH 연구는 4가지의 염색체 좌위(9p21, 13q14, 16q22, 17p13)의 현미부수체 표식자를 사용하였으며, 각 염색체 좌위의 표식자들은 다음과 같다. 염색체 9p21에 위치하는 *p16* 유전자와 관련된 D9S104, D9S162, D9S165 등을 비롯하여 13q14상의 *Rb* 유전자와 관련된 D13S118, D13S153, D13S273과 16q22상의 *E-cadherin* 유전자와 관련된 D16S419, D16S3106, D16S498 및 17p13에 위치하는 *p53* 유전자와 관련된 D17S796, TP53, D17-

S513 등 총 12개로 그 시발체는 GIBCO사(Carlsbad, CA, USA)에서 제작된 것을 사용하였으며, 염기 서열은 Table 1과 같다. 우선 종양 부위와 정상 부위에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 각각 PCR을 시행하였으며, 각각의 PCR 용액은 주형 DNA 1 μ L, 0.2 mM dNTP, 10 \times buffer, 10 pmol/ μ L primer, 1U Taq polymerase에 증류수를 가하여 12 μ L로 되게 하였고, PCR은 각 표본에 대하여 35내지 40주기를 반복 실시하였다. 모든 증합효소 연쇄반응은 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus 9700, PerkinElmer Inc., MA, USA)에서 시행하였다. 기본적으로는 각 주기 당 변성반응은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 결합반응은 55–60 $^{\circ}$ C에서 30초, 연장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 40초씩 시행하고 마지막 주기의 연장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키고, 증폭된 PCR 산물 3 μ L를 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

이후 3 μ L의 PCR 산물과 formamide loading dye (95% formamide, 20mM EDTA, 10mM NaOH, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol) 3 μ L를 취해 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓여 변성시킨 후, 열음으로 급히 냉각시킨 다음 3 μ L를 취해 전기영동에 사용하였다. 전기영동을 1,400 V에서 1시간 반 동안 시행한 후 gel을 은 염색하였다. 은 염색은 binding solution에 의해 gel이 붙어 있는 유리판 쪽을 그대로 염색용기에서 10% acetic acid로 30분간 고정시킨 후, 증류수로 3분씩 2회 반복하여 세척하고, silver nitrate 용액에서 30분간 반응시킨 다음 증류수에서 신속히 세척을 한 후, sodium carbonate 용액에서 피가 두

Table 1. DNA sequences of 12 microsatellite markers

D9S162	(f) 5'-GCAATGACCAGTTAAGGTTTC-3' (r) 5'-AATTCACCAACAATCTCC-3'
D9S104	(f) 5'-GATCTGGGTATGCTTTCTG-3' (r) 5'-ACTGGGACTCTAACTAATGT-3'
D9S165	(f) 5'-GACTTTGGCTGCTAGATGTG-3' (r) 5'-CAGAGGAGTTACAAATATAGACAGG-3'
D13S118	(f) 5'-GCTCCCGGCTGGTTTT-3' (r) 5'-GCAGGAAATCGCAGGAACCT-3'
D13S153	(f) 5'-ATTAGCCCAGGTATGGTGAC-3' (r) 5'-GCTGTGGTATGAGTTACTTAAACAC-3'
D13S273	(f) 5'-CTGNGGCAAAAACAACCTT-3' (r) 5'-ATCTGTATGTCCTCTTTCAATG-3'
D16S421	(f) 5'-ACATGAACCGATTGGACTGA-3' (r) 5'-CCGTTCCTATATTTCTGG-3'
D16S512	(f) 5'-TGAGAGCCAAATAAATAATGG-3' (r) 5'-TCACGTTGTGAATGCAAGT-3'
D16S3106	(f) 5'-GAGACCTACAGTCTTTTGACATTAC-3' (r) 5'-TTTTGAAGCTGAGCAGAAGG-3'
TP53	(f) 5'-TGGATCCTCTTGCAGCAGCC-3' (r) 5'-TP53.A2 AACCTTGTCTTACCAGAA-3'
D17S796	(f) 5'-CAATGGAACCAATGTGGTC-3' (r) 5'-AGTCCGATAATGCCAGGATG-3'
D17S513	(f) 5'-TTCACCTGTGGGCTGCTGTC-3' (r) 5'-TAAGAAAGGCTCCCAAGCA-3'

렛이 보일 때까지 발색시킨 후, 앞 과정에서 사용한 고정액 10% acetic acid를 혼합하여 반응을 중지시킨 후 띠의 소실여부를 관찰하였다.

4) 결과 판정과 통계 처리

gel상의 띠(band)를 밀도측정기를 이용하여 측정하고 정상 조직에 비해 종양조직에서 명백한 띠 소실이 있거나 최소한 50% 이상의 소실이 있는 경우를 LOH로 판정하였다. 그리고 Choi 등 (11)의 방식과 유사하게 2개 이상의 유전자에서 LOH를 보인 경우 LOH-High 군으로 취급하였다. 실험결과 중 동형접합성을 보이는 경우와 PCR 산물을 얻을 수 없는 증례, 그리고 유전자 변이를 확인할 수 없는 경우는 non-informative로 처리하고 결과 분석에서 제외하였다.

각 증례의 현미부수체 표식자에 대한 LOH의 빈도와 p53 단백질 발현 결과 등과 제반 임상병리학적 소견 및 예후 인자들과의 상관관계를 Chi-square 검정을 이용하여 구하였으며, *p* 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 임상 정보 및 조직학적 소견

대상 환자들 총 50예의 연령 분포는 29세부터 67세까지였고 평균연령은 44.5세였다. 종양의 크기는 T1 등급이 14예(28%), T2 등급이 20예(40%), T3 등급이 16예(32%)이었다. 조직학적 분화도는 Nottingham I 등급이 10예(20%), II 등급이 25예(50%), III 등

Table 2. Clinicopathologic findings of 50 invasive ductal carcinomas

Clinicopathologic parameters	Number of case (%)
Age	
Below 35	9 (18)
Above 35	41 (82)
Grade	
I	10 (20)
II	25 (50)
III	15 (30)
Size	
<2 cm	14 (28)
2-5 cm	20 (40)
>5 cm	16 (32)
LN metastasis	
Positive	23 (46)
Negative	27 (54)
Stage	
I	13 (26)
II	25 (50)
III	12 (24)

LN=lymph node.

급이 15예(30%)이었다. 림프절 전이가 있었던 예는 23예(46%)이었고, 전이가 없었던 예는 27예(54%)이었다. 병기별로는 I기가 13예(26%), II기는 25예(50%), III기는 12예(24%)이었다(Table 2).

2. 4가지 종양억제 유전자의 microsatellite 표식자에서의 LOH 검출 양상

본 실험에서 사용한 4개의 염색체 내의 종양억제 유전자(*p16*, *Rb*, *E-cadherin*, *p53*)의 표식자 12개 모두에서 LOH가 검출되었다. 또한 50예의 관상피암 증례 중 LOH가 검출된 증례는 43예(86%)이었으며, 7예(14%)는 어떠한 LOH도 관찰되지 않았다. 각 유전자별 LOH 검출률은 *p16* 유전자의 LOH는 36%, *Rb* 26%, *E-cadherin* 54%, *p53* 60%로서 *p53* 유전자의 LOH 검출률이 제일 높았고, *Rb* 유전자의 LOH 검출률이 가장 낮았다.

p16 유전자의 LOH는 18예(36%)에서 검출되었다. D9S104, D9S162, D9S165 표식자의 분석에서 informative 증례는 각 표식자 당 32예, 36예, 39예이었고 그 중 각각 7예(21.9%), 9예(25.0%), 9예(23.1%)에서 LOH를 보였다.

Rb 유전자의 LOH는 13예(26%)에서 검출되었다. D13S118, D13S153, D13S273 표식자의 분석에서 informative 증례는 각 표식자 당 31예, 28예, 35예이었고 그 중 각각 5예(16.1%), 7예(25.0%), 10예(28.6%)에서 LOH를 보였다.

E-cadherin 유전자의 LOH는 27예(54%)에서 검출되었다.

Table 3. LOH on 4 tumor suppressor genes according to the clinicopathological factors (%)

	Total	p16	Rb	E-cadherin	p53	LOH-High
Tumor vs. normal						
Tumor	50	18 (36)	13 (26)	27 (54)	30 (60)	30 (60)
Normal	20	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Age						
Below 35	9	3 (33.3)	3 (33.3)	4 (44.4)	6 (66.7)	5 (55.6)
Above 35	41	15 (36.6)	10 (24.4)	23 (54.8)	24 (58.5)	25 (61.0)
Tumor grade						
I	10	2 (20.0)	1 (10.0)	4 (40.0)	5 (50.0)	4 (40.0)
II	25	10 (40.0)	7 (28.0)	14 (56.0)	15 (60.0)	15 (60.0)
III	15	6 (40.0)	5 (33.3)	9 (60.0)	10 (66.7)	11 (73.3)
Tumor size						
Below 2 cm	14	5 (35.7)	2 (14.3)	4 (36.4)	4 (28.6)	4 (28.6)
2-5 cm	20	5 (25.0)	7 (35.0)	14 (58.3)	13 (65.0)	13 (65.0)
Above 5 cm	16	8 (50.0)	4 (25.0)	9 (50.0)	13 (81.3)	13 (81.3)
LN Metastasis						
(-)	27	8 (29.6)	5 (18.5)	12 (44.4)	13 (48.1)	13 (48.1)
(+)	23	10 (43.5)	8 (34.8)	15 (65.2)	17 (73.9)	17 (73.9)
Tumor stage						
I	13	5 (38.5)	2 (15.4)	3 (23.1)	3 (23.1)	3 (23.1)
II	25	8 (32.0)	8 (32.0)	15 (60.0)	16 (64.0)	16 (64.0)
III	12	5 (41.7)	3 (25.0)	9 (75.0)	11 (91.7)	11 (91.7)

LOH=loss of heterozygosity; LN=lymph node.

D16S419, D16S3106, D16S498 표식자의 분석에서 informative 증례는 각 표식자 당 44예, 41예, 42예이었고 그 중 각각 12예(27.3%), 11예(26.8%), 11예(26.2%)에서 LOH를 보였다.

p53 유전자의 LOH는 30예(60%)에서 검출되었다. TP53, D1-7S796, D17S513 표식자의 분석에서 informative 증례는 각 표식자 당 42예, 42예, 38예이었고 그 중 각각 14예(33.3%), 12예(28.6%), 10예(26.3%)에서 LOH를 보였다.

한편, 정상 대조군 조직에서는 상기 4가지 종양억제 유전자에서의 LOH가 검출되지 않았으므로 4가지 LOH 모두 암종에서만 특이적으로 검출되었다($p=0.001$). LOH가 관찰되지 않은 7예 중 병기 III기 증례는 없었으며, T3군은 1예, 전이성 암종은 2예이었다.

3. LOH 검출과 임상병리학적 인자와의 상관관계

1) 9p21 염색체의 p16 유전자 LOH

LOH 검출률은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다.

종양의 분화도에 따른 LOH 검출률은 I 등급 증례 10예 중 2예(20%), II 등급 25예 중 10예(40%), III 등급 15예 중 6예(40%)로서 분화도 I 등급에서 LOH 검출률이 유의하게 낮았다($p=0.047$). 종양의 크기에 따른 LOH 검출률은 T1군에서 5예(35.7%), T2군에서 5예(25.0%), T3군에서 8예(50%)로서 T3군에서 LOH 검출률이 높은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 림프절 전이에 따른 LOH 검출률은 전이성 암종에서 10예(43.5%), 비전이성 암종에서 8예(29.6%)로서 전이성인 경우 LOH 검출률이 높은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 병기에 따른 LOH 검출률은 I기 13예 중 5예(38.5%), II기 25예 중 8예(32.0%), III기 12예 중 5예(41.7%)로서 병기별 LOH 검출률의 차이는 없었다.

2) 13q14 염색체의 Rb 유전자 LOH

LOH 검출률은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유

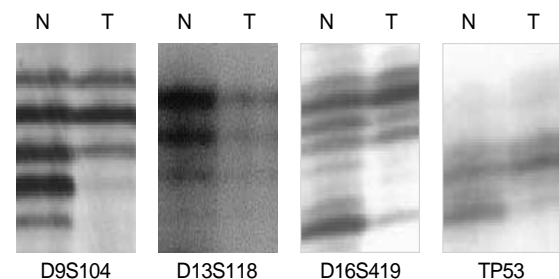


Fig 1. Representative LOH pattern on p16, Rb, E-cadherin and p53 gene in invasive ductal carcinoma. Each LOH detection was accomplished at the microsatellite markers (D9S104, D13S118, D16S419, TP53) of the each invasive ductal carcinoma. Each T lane shows near-entirely or considerable band loss. N=normal; T=tumor.

의성 있는 차이는 없었다.

종양의 분화도에 따른 LOH 검출률은 I 등급 증례 10예 중 1예(10%), II 등급 25예 중 7예(28%), III 등급 15예 중 5예(33.3%)로서 분화도 I 등급에서 LOH 검출률이 유의하게 낮았다($p=0.041$). 종양의 크기에 따른 LOH 검출률은 T1군에서 2예(14.3%), T2군에서 7예(35.0%), T3군에서 4예(25.0%)로서 T1군에서 LOH 검출률이 낮은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 림프절 전이에 따른 LOH 검출률은 전이성 암종에서 8예(34.8%), 비전이성 암종에서 5예(18.5%)로서 전이성인 경우 LOH 검출률이 높은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 병기에 따른 LOH 검출률은 I기 13예 중 2예(15.4%), II기 25예 중 8예(32.0%), III기 12예 중 3예(25.0%)로서 병기 I기에서 LOH 검출률이 낮은 경향을 보였으나 유의성은 없었다.

3) 16q22 염색체의 E-cadherin 유전자 LOH

LOH 검출률은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다.

종양의 분화도에 따른 LOH 검출률은 I 등급 증례 10예 중 5예(50.0%), II 등급 25예 중 13예(52.0%), III 등급 15예 중 9예(60%)로서 분화도와 LOH 검출률간에는 통계적 유의성은 없었다. 종양의 크기에 따른 LOH 검출률은 T1군에서 4예(36.4%), T2군에서 14예(58.3%), T3군에서 9예(60%)로서 T1군에서 LOH 검출률이 유의성 있게 낮게 검출되었다($p=0.0387$). 림프절 전이에 따른 LOH 검출률은 전이성 암종에서 15예(65.2%), 비전이성 암종에서 12예(44.4%)로서 전이성인 경우 LOH 검출률이 유의성 있게 높게 검출되었다($p=0.0466$). 병기에 따른 LOH 검출률은 I기 13예 중 3예(23.1%), II기 25예 중 15예(60.0%), III기 12예 중 9예(75.0%)로서 병기별 LOH 검출률의 차이는 없었지만, 병기 I기와 II+III기로 구분하면 병기 I기에서 유의성 있게 낮은 검출률을 보였다($p=0.044$).

4) 17p13 염색체의 p53 유전자 LOH

LOH 검출률은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다.

종양의 분화도에 따른 LOH 검출률은 I 등급 증례 10예 중 5예(50.0%), II 등급 25예 중 15예(60.0%), III 등급 15예 중 10예(66.7%)로서 분화도와 LOH 검출률간에는 상관관계가 없었다. 종양의 크기에 따른 LOH 검출률은 T1군에서 4예(28.6%), T2군에서 13예(65.0%), T3군에서 13예(81.3%)로서 T1군에서 LOH 검출률이 유의성 있게 낮았다($p=0.030$). 림프절 전이에 따른 LOH 검출률은 전이성 암종에서 17예(73.9%), 비전이성 암종에서 13예(48.1%)로서 전이성인 경우 LOH 검출률이 높은 경향을 보였으며,

유의한 검출률 차이가 있었다($p=0.038$). 병기에 따른 LOH 검출률은 I기 13예 중 3예(23.1%), II기 25예 중 16예(64.0%), III기 12예 중 11예(91.7%)로서 병기별로 LOH 검출률의 차이는 없었지만, 병기 I기와 II+III기로 구분하면 병기 I기에서 유의성 있게 낮은 검출률을 보였다($p=0.027$).

5) LOH-High 군 분석

이상의 각 유전자별 LOH 결과를 종합하여 통합적으로 분석하고자 Choi 등(11)의 방식 같이 2개의 유전자 이상에서 LOH를 보이는 경우를 LOH-High 군으로 임의적으로 설정하였으며, LOH-High 군은 모두 30예(60%)이었다. LOH-High 군의 검출률은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다. 종양의 분화도에 따른 LOH 검출률은 I 등급 증례 10예 중 4예(40.0%), II 등급 25예 중 15예(60.0%), III 등급 15예 중 11예(73.3%)로서 분화도가 낮을수록 LOH-High 검출률이 높아지는 경향이 있었으나 유의성은 없었다. 종양의 크기에 따른 LOH 검출률은 T1군에서 4예(28.6%), T2군에서 13예(65.0%), T3군에서 13예(81.3%)로서 T1군에서 LOH 검출률이 유의성 있게 낮았다($p=0.030$). 림프절 전이에 따른 LOH 검출률은 전이성 암종에서 17예(73.9%), 비전이성 암종에서 13예(48.1%)로서 전이성인 경우 LOH 검출률이 높은 경향을 보였으며, 유의한 검출률의 차이가 있었다($p=0.038$). 병기에 따른 LOH 검출률은 I기 13예 중 3예(23.1%), II기 25예 중 16예(64.0%), III기 12예 중 11예(91.7%)로서 병기별로 LOH 검출률의 차이는 없었지만, 병기 I기와 II+III기로 구분하면 병기 I기에서 유의성 있게 낮은 검출률을 보였다($p=0.027$).

6) LOH (-) 군 분석

총 7예(14%)에서는 어떠한 LOH도 검출되지 않았다. 이들을 정리하면 분화도에 따른 경우 1등급 3예(30%), 2등급 2예(8%), 3등급 3예(20%)로서 유의한 차이점은 없었다. 종양의 크기에 따른 경우 T1군 4예(28.6%), T2군 2예(10%), T3군 1예(6.25%)로서 종양의 크기와 역상관성이 있었다($p=0.040$). 전이 여부에 따른 경우 전이성 암종 2예(8.7%), 비전이성 암종 5예(18.5%)로서 비전이성 암종에서 LOH (-) 군이 많은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 병기에 따른 경우 I기 4예(30.8%), II기 3예(12%), III기 0예(0%)로서 병기와의 역상관성이 있었다($p=0.021$).

고 찰

국내외적으로 유방암과 관련된 임상적으로 적용할 수 있는 표지자 발굴에 많은 노력이 이루어지고 있으며, 암 발생과 종양의

진행 과정에 대한 많은 분자생물학적, 종양생물학적 연구가 이루어져 왔으나 아직 대장암 같은 잘 정립된 분자적 기전은 아직 밝혀지지 않았다. (4, 5, 12)

일반적으로 암세포의 발생과 진행 과정에는 광범위한 유전자 및 염색체의 이상이 일어난다고 밝혀지고 있고, 각 장기의 주요 종양별로 특이하게 발생하는 돌연변이 등이 다수 규명됨으로써 발암화, 종양의 진행 및 악성화와 관련된 유전자의 규명과 종양의 분자적 진단 및 임상적 예후를 판단하는 것이 가능해졌다. 또한 암 발생에는 복수의 발암유전자나 암억제유전자의 이상이 한 종양 세포내에서 여러 단계에 걸쳐 축적 내지는 발현되는 것으로 객관적으로 인식되고 있다. 동시에 많은 발암화 관련 유전자들의 염색체상에서의 위치가 규명되면서 염색체 이상과의 상관성을 밝히려는 많은 연구들이 진행되어 왔다. (6-10) 이 같은 배경 하에 본 연구에서는 다른 장기의 암종을 대상으로 많은 국내적 연구가 이루어진 4가지의 종양억제 유전자에 대해 LOH 연구를 하게 되었다.

대표적인 암억제유전자인 p16^{INK4A}는 9번 염색체의 9p21부위에 위치하고 있으며 이 유전자의 생성단백인 p16은 세포주기의 G1 후기에서 세포주기 진행에 관여하는 cyclin dependent kinase (CDK)의 억제인자이다. 정상 세포주기에서 CDK는 cyclinD와 결합하여 cyclinD/CDK4 복합체를 형성하며 이 복합체가 retinoblastoma (Rb) 암억제유전자의 생성물인 pRb를 인산화시켜 G1 후기에서 S기로 세포주기가 이행하게 된다. p16은 CDK4에 결합하여 CDK가 cyclin D와 결합하는 것을 방해하며 결과적으로 pRb의 인산화를 막아 G1 후기에서 세포주기가 멈추게 된다. 그런데 p16^{INK4A}의 유전자에 이상이 있을 경우 cyclinD/CDK4 복합체를 통한 G1 checkpoint가 조절되지 않아 S기로 세포주기가 계속 진행함으로써 종양이 발생하게 된다고 알려졌다. p16^{INK4A} 유전자가 위치하고 있는 9p21의 결손과 재배열은 많은 악성종양, 즉 조혈계, 소화기계, 비뇨기계, 호흡기 및 부인과 악성종양 등에서 흔히 관찰되는 것으로 보고되고 있다. (14, 15)

본 연구에서는 대표적 세포 간 부착분자(adhesion molecule)인 E-cadherin 유전자의 발현 이상에 대해서 연구하였다. 세포 간 부착분자는 세포간 결합이나 세포골격 유지에 중요한 역할을 하며 세포골격(cytoskeleton)과 결합함으로써 세포의 모양을 형성하고 세포 간 상호작용을 매개하여 조직을 유지시키는 데 기여한다고 알려져 있다. 따라서 일반적으로 이 같은 세포간 결합의 장애가 발생하면 세포들이 서로 분리되어 상피내암의 침윤성 획득에 관여하는 것으로 인식되고 있으며, 또한 부착분자의 발현 변화는 세포의 분화와 이동에 영향을 주어 종양의 침윤과 전이 과정에 기여한다고 보고되고 있다. 이들 중 염색체 16q22에 위치하는 E-cadherin 유전자의 단백 산물은 세포막에 위치하며 세포질내의 catenin과 결합하여 cadherin-catenin 복합체를 형성함으로써 actin

과 같은 세포골격과 결합할 수 있게 된다. 또한 E-cadherin은 많은 암종에서 발현이 저하되므로 정상 세포에서 종양억제 유전자로 인식되고 있으며, 위암, 대장암, 난소암, 유방암 등 다양한 장기의 암종에서 E-cadherin의 발현 이상이 보고되었으며, 암 발생과 전이에 있어서의 E-cadherin의 중요성이 보고되었다. (15, 16)

p53 유전자는 인체에서는 17번 염색체의 단완 13.1 (17p13.1)에 위치하고, 약 20 Kb 크기의 11개 exon으로 구성되어 있으며 정상 세포에서는 세포 주기의 중요 조절인자인 p21, cdc 등과 작용하여 비정상세포의 G1/S 주기에서 세포성장을 억제시켜 손상된 DNA를 회복시키거나 세포자멸사(apoptosis)를 유발시키는데 이 유전자에서 변이가 발생하면 정상 p53 유전자의 기능을 비활성화시킴으로써 종양 발생에 기여하게 된다. 특히 p53 유전자는 가장 많은 종양에서 가장 많은 연구가 이루어져 임상적인 적용도가 높을 뿐만 아니라 많은 발암 관련 유전자들의 발현을 조절하는 매우 중요한 역할을 하고 있다. (17, 18)

다양한 암종에서 이들 종양억제 유전자의 이상에 대해 대다수의 연구 문헌에서는 종양의 높은 악성도, 종양의 침윤 및 전이와 종양억제 유전자 이상 또는 단백 발현 사이에 관계가 있다고 일반적으로 제시되고 있다. 물론 유방을 비롯한 대부분 장기의 암종의 경우 이들 유전자들의 변이 및 발현 이상 비율이 연구자별로 다양하게 보고되고 있다. 통상 유전자의 이상은 크게 유전자 자체의 변이와 이상 단백 과발현으로 나타나는데 이들 종양억제 유전자들의 경우도 불활성화 기전이 다양하므로 종양억제 유전자의 유전적 이상에 대한 검출 기법 역시 다양하다. 기존의 임상종양학 분야에서 종양억제 유전자의 이상에 대한 대부분의 연구는 간편한 면역조직화학적 기법으로 단백 과발현 또는 발현 소실을 검출하는 방식이었지만, 최근에는 종양억제 유전자의 돌연변이 또는 결손 등 분자적 수준의 발암 과정이 주요 기전으로 제시되고 있다. 즉, 종양억제 유전자의 불활성화에 대한 기전을 대립유전자의 결손으로부터 현미부수체 좌위의 돌연변이(mutated microsatellite loci) 형태로 파악할 수 있으며, 이 돌연변이를 검출하는 기법으로 LOH를 적용할 수 있게 되었으며, LOH는 종양억제유전자의 결손과 관련되는 기전으로 정립되어졌고 유방암에서도 다양한 염색체 좌위의 종양억제 유전자에서의 LOH가 보고되었다. (7-10) 다만, 국내에서는 다른 장기의 암종과는 달리 유방암에서 분자종양학적인 연구는 그렇게 많이 연구된 것은 아니며, 특히 p53 유전자 같이 일반 의료인들에게도 잘 알려진 종양억제 유전자의 변이에 대한 연구도 의외로 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 유방암에서 다양한 중요 종양억제 유전자들과 연관된 LOH를 동시에 연구하여 임상 및 병리학적 특성에 따라 분석하는 것은 큰 의의가 있는 것으로 판단하였다.

본 연구에서는 p16 유전자와 관련 있는 염색체 9p21에서의

LOH를 검출하기 위해서 D9S104, D9S162, D9S165 등 3개의 대표적인 현미부수체 표식자를 사용하였다. 그 결과 LOH를 보인 증례는 18예(36%)이고, 비종양 정상 부위에서는 LOH 검출이 있는 예가 없어서 유방암에서는 p16 유전자 LOH가 정상 조직과의 감별에 특이성이 있었다. p16 유전자 LOH는 T3군과 전이성 암에서 높은 LOH의 검출률의 경향을 보였으며, 종양의 분화도 1등급에서 유의하게 낮은 LOH 검출률을 보였다. 본 결과를 평가하기 위해 외국의 연구들을 참고하면 Gorgoulis 등(17)은 p16 유전자 LOH가 거의 검출되지 않았음을 보고하여 본 연구와 큰 차이가 있었으나 Eiriksdottir 등(20)은 201예에서 38%의 LOH 비율을 보고하여 본 연구 결과보다 크게 높은 검출률을 보였다. 다만, p16 유전자의 경우에는 다른 암종과는 달리 유방암을 대상으로 한 국내외의 문헌이 극히 적어 객관적인 참고가 용이하지 않았다.

Rb 유전자와 관련 있는 염색체 13q14에서의 LOH를 검출하기 위해서 D13S118, D13S153, D13S273 등 3개의 대표적인 현미부수체 표식자를 사용하였다. 그 결과 LOH를 보인 증례는 13예(26%)이고, 비종양 정상 부위에서는 LOH 검출이 있는 예가 없어서 유방암에서는 Rb 유전자 LOH가 정상 조직과의 감별에 특이성이 있었다. Rb 유전자 LOH는 T1군과 병기 I기에서 낮은 LOH의 검출률의 경향을 보였고, 전이성 암종에서 높은 LOH의 경향을 보였으며, 종양의 분화도 1등급에서 유의하게 낮은 LOH 검출률을 보였다. 본 결과를 평가하기 위해 외국의 연구들을 참고하면 다양한 염색체 좌위에서 LOH를 연구한 Emi 등(21)은 Rb 유전자 LOH가 가장 높은 비율로 검출되었다고 보고하여 가장 낮은 LOH 검출률을 보인 본 연구와 차이가 있었다. 다만, Eiriksdottir 등(22)은 139예에서 Rb 유전자관련 표식자 18개를 적용하여 51%의 검출률을 보고하여 본 연구와 어느 정도 부합되었다.

E-cadherin 유전자가 존재하는 염색체 16q22에서의 LOH를 검출하기 위해서 3개의 대표적인 현미부수체 표식자를 사용하였으며, LOH의 종합적인 합산 결과 세가지 표식자 중 한 개 이상의 LOH를 보인 증례는 27예(54%)이었다. 그러나 비종양 정상 부위에서는 단 한 예에서도 LOH 검출이 없어서 유방암에서는 16q22 염색체의 LOH가 정상 조직과의 감별에 특이성이 있었다. 그리고 16q22의 LOH는 종양의 분화 등급 및 림프절 전이 여부와는 상관관계가 없었지만 종양 크기 2 cm 미만의 암종과 병기 I기에서 LOH가 유의성 있게 낮은 빈도로 검출되었다. 유방암에서 16q22에서의 LOH에 대한 연구가 국내에서는 아직 보고가 없으며 외국에서도 비교적 드물어서 본 연구의 임상병리학적 인자들과의 연관성을 정확하게 비교하지는 어렵지만 Roylance 등(23)은 60%의 LOH 검출률을 보고하였으며, Iwase 등(24)은 약 40%의 LOH 검출률을 제시하여 보고자들마다 LOH의 검출률의 차이가 있었지만 대체로 LOH 검출률에 있어서는 본 연구와 부합되었다.

본 연구에서는 p53 유전자와 관련 있는 염색체 17p13에서의 LOH를 검출하기 위해서 D17S796, TP53, D17S513 등 3개의 대표적인 현미부수체 표식자를 사용하였다. 그 결과 LOH를 보인 증례는 30예(60%)이고, 비종양 정상 부위에서는 LOH 검출이 있는 예가 없어서 유방암에서는 17p13 염색체의 LOH가 정상 조직과의 감별에 특이성이 있었다. 본 결과를 평가하기 위해 유방암을 대상으로 한 외국 연구자들의 결과를 참고하면 Roncuzzi 등(25)은 D17S34, D17S30/5 2개의 표식자에서 27.6%의 LOH 검출률을 보고했으며, Tsuji 등(26)은 D17S938 표식자에서 40%를 보고하였다. 본 연구에서는 4개의 표식자에서 66%의 LOH 비율이었으므로 Roncuzzi 등의 연구에 어느 정도 부합되었지만 TP53 표식자의 경우 본 연구는 물론 외국의 연구자들의 결과가 31.3%에서 67%까지 큰 차이를 보여 정확히 본 연구 결과를 평가하기 곤란하다. Johnson 등(27)의 연구에서는 본 연구에서 사용된 표식자 중 D17S796, TP53, D17S513 등 세가지가 같은 표식자이었는데 LOH 검출률이 각각 36.7%, 33.3%, 59.3%로서 본 연구와 부합되는 결과를 보였다. 본 연구의 LOH 결과와 임상병리학적 인자들과의 상관관계를 보면 높은 검출률의 LOH는 종양의 크기 및 병기와 유의성 있는 상관관계가 있었다. 한편 유의성은 없었지만 림프절 전이가 있는 암종에서는 LOH가 높게 검출되는 경향이 있어서 p53 LOH가 임상적인 유용성이 있다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서 3가지의 p53 유전자 관련 현미부수체 표식자를 사용한 시도는 외국의 연구와 비교해도 낮은 LOH 검출률은 아닌 것으로 판단되고, 또한 p53 유전자와 연관된 p53 유전자의 변이 및 소실은 유방의 침윤성 관상피 암종의 발암 기전과 악성화에 기여하는 것으로 판단된다.

결론적으로 본 연구를 종합하면 비록 국내에서의 연구 보고가 매우 미흡하여 외국의 연구들과 다소 상이한 부분들이 있지만 주요 종양억제 유전자들 각각의 LOH는 일반적으로 침윤성 관암의 악성화와 침습성 및 전이능에 관여하는 것으로 보인다. 한편, 4가지 종양억제 유전자별 LOH 결과를 종합하여 통합적으로 분석하기 위해 2개의 유전자 이상에서 LOH를 보이는 경우를 LOH-High 군으로 임의적으로 설정하면 그 결과가 p53 유전자의 LOH와 상당히 유사한 것으로 보인다. 아울러 본 연구에서는 총 12개의 현미부수체 표식자를 사용하였지만 표식자를 대폭 늘리고 연구 대상 수를 늘리면 다양한 종양억제 유전자들의 변이가 각 암종 증례에서 어떤 양상으로 축적되고 작용하는지 더 명확하게 파악할 수 있을 것으로 보인다. 그러나 본 연구결과 4가지 종양억제 유전자의 LOH를 검색하는 것과 p53 유전자 LOH의 결과가 비슷하므로 환자 진료를 위한 임상 측면에서는 간편하게 p53 유전자의 LOH를 시행하는 것도 진료에 도움이 될 것으로 판단된다.

결론

50예의 유방의 침윤성 관암에서 4종류의 주요 종양억제 유전자(*p16*, *Rb*, *E-cadherin*, *p53*)의 표식자 12개에서 LOH를 검출하고 임상 및 병리학적 소견과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

본 실험에서 사용한 모든 표식자에서 LOH가 검출되었다. 또한 50예의 침윤성 관암 중례 중 LOH가 검출된 중례는 43예(86%)이었으며, 7예(14%)는 어떠한 LOH도 관찰되지 않았다. 각 유전자별 LOH 검출률은 *p16* 유전자의 LOH는 36%, *Rb* 26%, *E-cadherin* 54%, *p53* 60%로서 *p53* 유전자의 LOH 검출률이 제일 높았고, *Rb* 유전자의 LOH 검출률이 가장 낮았다. 한편, 정상 대조군 조직에서는 상기 4가지 종양억제 유전자에서의 LOH가 검출되지 않았으므로 4가지 LOH 모두 암종에서만 특이적으로 검출되었다.

p16 유전자 LOH는 T3군과 전이성 암에서 높은 LOH의 검출률의 경향을 보였으며, 종양의 분화도 1등급에서 유의하게 낮은 LOH 검출률을 보였다. *Rb* 유전자와 관련된 LOH는 T1군과 병기 I기에서 낮은 LOH의 검출률의 경향을 보였고, 전이성 암종에서 높은 LOH의 경향을 보였으며, 종양의 분화도 1등급에서 유의하게 낮은 LOH 검출률을 보였다. *E-cadherin* 유전자와 관련된 LOH는 종양의 분화 등급 및 림프절 전이 여부와는 상관관계가 없었지만 T1 암종과 병기 I기에서 LOH가 유의성 있게 낮은 빈도로 검출되었다. *p53* 유전자 관련 LOH는 종양의 크기 및 병기와 유의성 있는 상관관계가 있었으며, 림프절 전이와는 LOH가 높게 검출되는 경향이 있었다.

이상의 결과들을 정리하면 주요 종양억제 유전자들 각각의 LOH는 일반적으로 침윤성 관암의 악성화와 침습성 및 전이능에 관여하는 것으로 보인다. 2개의 유전자 이상에서 LOH를 보이는 LOH-High 군은 그 결과가 *p53* 유전자의 LOH와 유사하였다.

향후 현미부수체 표식자를 대폭 늘리고 연구 대상 수를 늘리면 다양한 종양억제 유전자들의 변이가 각 암종 중례에서 어떤 양상으로 축적되고 작용하는지 더 명확하게 파악할 수 있을 것으로 보이며, 유방암 환자의 치료 전략을 세우는 데 있어 *p53* 유전자의 LOH 여부가 상당한 역할을 할 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- 2002 Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea. Ministry of Health and Welfare. Republic of Korea 2003;11.
- Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:320-7.
- Clamp A, Danson S, Clemons M. Hormonal risk factors for breast cancer: identification, chemoprevention, and other intervention strategies. *Lancet Oncol* 2002;3:611-9.
- Hollingsworth AB, Singletary SE, Morrow M, Francescatti DS, O'Shaughnessy JA, Hartman AR, et al. Current comprehensive assessment and management of women at increased risk for breast cancer. *Am J Surg* 2004;187:349-62.
- Ingvarsson S. Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol* 1999;9:277-88.
- Soussi T. The *p53* tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:121-37.
- Haga S, Emi M, Hirano A, Utada Y, Kajiura T, Akiyama F, et al. Association of allelic losses at 3p25.1, 13q12, or 17p13.3 with poor prognosis in breast cancers with lymph node metastasis. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:1199-206.
- Shen CY, Yu JC, Lo YL, Kuo CH, Yue CT, Jou YS, et al. Genome-wide search for loss of heterozygosity using laser capture microdissected tissue of breast carcinoma: an implication for mutator phenotype and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res* 2000;60:3884-92.
- Regitnig P, Moser R, Thalhammer M, Luschin-Ebengreuth G, Ploner F, Papadi H, et al. Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences. *J Pathol* 2002;198:190-7.
- Otis CN, Krebs PA, Albuquerque A, Quezado MM, San Juan X, Sobel ME, et al. Loss of heterozygosity of *p53*, *BRCA1*, *VHL*, and estrogen receptor genes in breast carcinoma: correlation with related protein products and morphologic features. *Int J Surg Pathol* 2002;10:237-45.
- Choi SW, Choi JR, Chung YJ, Kim KM, Rhyu MG. Prognostic implications of microsatellite genotypes in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2000;89:378-83.
- Sparano JA, Fazzari MJ, Childs G. Clinical application of molecular profiling in breast cancer. *Future Oncol* 2005;1:485-96.
- Yeager T, Stadler W, Belair C, Puthenveetil J, Olopade O, Reznikoff C. Increased *p16* levels correlate with *pRb* alterations in human urothelial cells. *Cancer Res* 1995;55:493-7.
- Gombart AF, Morosetti R, Miller CW, Said JW, Koeffler HP. Deletions of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes *p16INK4A* and *p15INK4B* in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1995;86:1534-9.
- Davies BR, Worsley SD, Ponder BA. Expression of *E-cadherin*, *alpha-catenin* and *beta-catenin* in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. *Histopathology* 1998;32:69-80.
- Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. *E-cadherin* expression in pri-

- mary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 2003;5:217-22.
17. Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* 2005;14:7-10.
 18. Hall PA, McLuggage WG. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *J Pathol* 2006;208:1-6.
 19. Gorgoulis VG, Koutroumbi EN, Kotsinas A, Zacharatos P, Markopoulos C, Giannikos L, et al. Alterations of p16-pRb pathway and chromosome locus 9p21-22 in sporadic invasive breast carcinomas. *Mol Med* 1998;4:807-22.
 20. Eiriksdottir G, Johannesdottir G, Ingvarsson S, Bjornsdottir IB, Jonasson JG, Agnarsson BA, et al. Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. *Eur J Cancer* 1998;34:2076-81.
 21. Emi M, Matsumoto S, Iida A, Tsukamoto K, Nakata T, Yokota T, et al. Correlation of Allelic Losses and Clinicopathological Factors in Primary Breast Cancers. *Breast Cancer* 1997;4:243-6.
 22. Eiriksdottir G, Sigurdsson A, Jonasson JG, Agnarsson BA, Sigurdsson H, Gudmundsson J, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 9 in human breast cancer: association with clinical variables and genetic changes at other chromosome regions. *Int J Cancer* 1995;64:378-82.
 23. Roylance R, Droufakou S, Gorman P, Gillett C, Hart IR, Hanby A, et al. The role of E-cadherin in low-grade ductal breast tumourigenesis. *J Pathol* 2003;200:53-8.
 24. Iwase H, Iwata H, Toyama T, Hara Y, Omoto Y, Ando Y, et al. The Clinical Value of Microsatellite Instability and a Loss in Heterozygosity in Sporadic Breast Cancers. *Breast Cancer* 1997;4:234-8.
 25. Roncuzzi L, Brognara I, Baiocchi D, Amadori D, Gasperi-Campani A. Loss of heterozygosity at 17p13.3-ter, distal to TP53, correlates with negative hormonal phenotype in sporadic breast cancer. *Oncol Rep* 2005;14:471-4.
 26. Tsuji N, Furuse K, Asanuma K, Furuya M, Kondoh K, Kamagata C, et al. Mutations of the p53 gene and loss of heterozygosity at chromosome 17p13.1 are associated with increased survivin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;87:23-31.
 27. Johnson SM, Shaw JA, Walker RA. Sporadic breast cancer in young women: prevalence of loss of heterozygosity at p53, BRCA1 and BRCA2. *Int J Cancer* 2002;98:205-9.