

유방암조직의 Tissue Microarrays에서의 면역화학염색법을 이용한 Apoptosis 관련단백질의 발현

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실, ¹이화여자대학교 의과대학 내과학교실

김정수 · 김기환 · 안창혁 · 전해명 · 정상설 · 임석아¹

Apoptosis Related Protein Expressions in Immunohistochemical Staining Using Tissue Microarrays of Breast Cancer

Jeong Soo Kim, M.D., Kee Hwan Kim, M.D., Chang Hyeok Ahn, M.D., Hae Myung Jeon, M.D., Sang Seol Jung, M.D. and Seock Ah Im, M.D.¹

Department of Surgery, Uijongbu St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Uijongbu, Korea, ¹Department of Internal Medicine, College of Medicine, Ewha Womens University, Seoul, Korea

Purpose: In order to confirm the clinical application of a tissue microarrays method, the expression rate and relationship between factors related apoptosis, hormonal receptors and the clinical factors were investigated.

Methods: A tissue microarrays of 59 breast cancer tissues, and apoptosis related factors were examined by immunohistochemical staining using monoclonal antibodies.

Results: The median age of the patients was 49.9 years and 86.4% had a pathological stage of over stage II. The average number of metastatic lymph nodes was 3.8. p53 expression was noted in 21 cases (35.6%) and was related to Bcl-2, ER and PR expression. PTEN was expressed in 39 cases (66.1%) and related to FAS, Bcl-2, ER and PR expression. Fas was expressed in 34 cases (57.6%) and related with PR and BAX expression. BAX expression was observed in 42 cases (71.2%) and was related to the metastatic axillary lymph nodes, and both Bcl-2 and PR expression. Bcl-2 expression was noted in 33 cases (55.9%) and related to ER and PR expression. ER was expressed in 34 cases (57.6%) and was related positively with PR expression.

Conclusion: The tissue microarrays method can be used for both screening and analyzing many factors or different tumor types. This new technique may be very powerful for the rapid

identification of the tumor characteristics. (Journal of Korean Breast Cancer Society 2001;4:179-184)

Key Words: Tissue microarrays, Apoptosis, Breast cancer

중심 단어: 조직미세배열, 고사, 유방암

서 론

유방암은 우리 나라에서 여성의 악성암 중 두 번째로 많은 빈도를 나타내는 악성종양으로서, (1) 그 빈도가 점차적으로 증가되고 있으며 유방암의 진행은 다른 악성종양과 마찬가지로 여러 가지 유전적인 변화가 관여한다. 많은 종양 유전자, 조절인자, 종양 억제유전자들이 종양의 형성에 영향을 끼치며 종양세포의 자연사멸과 증식간의 균형이 맞지 않아 종양의 크기가 증가하게 되며 apoptosis에 관련된 여러 가지 인자가 여기에 관여하나 이에 대한 많은 부분은 아직 잘 알려지지 않은 부분이 많다. Apoptosis 관련 인자들은 환자의 예후와도 연관이 있으며 이 중 가장 잘 알려진 것으로 p53, bcl-2 등이 있으며 bcl-2 유전자와 그 반대작용을 하는 BAX, bcl-Xs, BAK, BAD 등의 여러 가지 관련인자 등이 알려져 있다. (2)

PTEN/MMAC1 유전자는 최근에 알려진 종양억제 유전자로서 유방암을 비롯한 여러 악성종양에서 변이가 일어나 그 기능이 불활성화된다. 그 정확한 작용기전은 아직 확실히 밝혀지지는 않았지만 PTEN 단백질 발현의 감소시 PTEN에 의하여 조절되는 protein kinase Akt/PKB의 인산화가 증가하게 된다. 이렇게 증가된 인산화는 악성종양의 진행과 연관이 있다고 하며 wild type의 PTEN을 유방암세포에 주입하면 세포주기의 G1 기에서 성장을 정지시키는 효과가 보고되었다. 또한 PTEN은 p27Kip1 cyclin dependent kinase inhibitor의 표현을 증가시켜 세포의 apoptosis를 촉진하는 효과를 야기한다. 또한 PTEN은 다른 AKT, BAD, p70S6 kinase, GSK3 alpha 등의 apoptosis 인자의 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며 apoptosis의 한 종류인 anoikis를 촉진하는 것으로 알려져 있다. (3,4) 그러나 그 정확한 기전이나 다른 인자들과의 연관관계는 아

책임저자 : 김정수, 경기도 의정부시 금오동 65-1

☎ 480-130, 의정부성모병원 일반외과

Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717

E-mail: drbreast@cmc.cuk.ac.kr

접수일 : 2001년 5월 24일, 게재승인일 : 2001년 5월 30일

직 확실히 밝혀지지 않았다.

Tissue microarrays는 많은 수의 종양들을 한 번의 실험으로 간단히 할 수 있는 새로운 방법으로서 여러 종양조직에서 미세한 원통형(직경 2 mm)의 조직 표본을 한 개의 파라핀포매에 넣어 5 μ m 두께로 절편을 제작하여 다수의 유전자에 대한 DNA, RNA 검사나 면역화학염색법을 사용하여 실험을 시행하는 것이다. 이러한 tissue microarrays 기법의 단점은 많은 종양들이 이형질(heterogeneity)을 나타내므로 미세한 조직표본이 전체 조직을 대표하기 어렵다는 점이 있으나 많은 수의 표본조사 등을 신속하게 하는데 유용하게 사용될 수 있다.(5) 저자들은 이러한 tissue microarrays를 이용하여 유방암에서의 PTEN, p53, Bcl-2, BAK, Fas 등의 apoptosis 관련인자의 발현빈도를 알아보고 다른 문헌에 보고된 성적과 비교하여 임상적인 유용성을 알아보고 임상적인 병기, 다른 apoptosis 인자, 호르몬 수용체와의 연관관계를 알아보려고 하였다.

방 법

유방암 환자 59명을 대상으로 하였으며 대상예의 조직 표본 재료는 적출된 조직의 hematoxylin-eosin 염색표본을 검토하여 파라핀 포매조직의 보관상태가 양호한 부위를 선택하였다. 종양의 크기는 2 cm 이하일 경우는 T1, 2 cm에서 5 cm 미만일 때는 T2, 5 cm 이상일 때는 T3로 분류하였고, 전이된 림프관의 개수에 따라 림프절 전이가 없는 0일 경우는 N0, 1개에서 3개까지는 N1, 4개 이상을 N2로 분류하였다. 유방암 환자 59명의 조직을 모은 breast cancer array slide (FH-AC1)는 (주)수퍼바이오칩에서 구입하여 실험에 사용하였다. Array slide를 58°C oven에서 1시간 동안 건조시키고 xylene으로 3분간 3회 담구어 파라핀을 제거한 후, 100%, 85%, 70%, 50% 알코올에 3분씩 처리 후 증류수에 넣어 흡수화하였다. Citrate buffer 용액(0.01

M, pH 6.0)에 넣어 121°C에서 10분간 가압한 후 조직 표본 위에 peroxidase-blocking solution을 떨어뜨려 10분간 방치하여 내인성 peroxidase를 저지시키고, TBS 용액으로 씻어 non-immune serum과 실온에서 20분간 반응시킨 후, estrogen receptor (Zymed), progesteron receptor (Zymed), p53 (Zymed, San Francisco, CA), bcl-2 (DAKO, Denmark), Fas (Transduction Laboratories, Lexington)에 대한 일차항체는 1 : 50으로 희석하여 사용하였으며, PTEN (Neomarkers, Fremont), BAX (Oncogene research products, Cambridge)에 대한 일차항체는 1 : 100을 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS 용액으로 씻고 발색시약인 DAB로 5분간 반응시킨 후 물로 세척하였다. Hematoxylin으로 15초간 대조염색하고 알코올과 xylene으로 탈수시켜 canada balsam으로 봉입하여 현미경으로 검경하였다(Fig. 1). 염색의 강도와 양성으로 염색되는 세포의 숫자를 고려한 semi-quantitative 방법으로 시행하였다. 증식이 왕성한 정상세포에서의 발현보다 더 강한 발현을 보이는 암세포를 선택하여 이러한 암세포가 전체 암세포에서 10% 이상의 발현을 보이는 경우를 양성이라고 판정하였다. 일반 특성과 각 단백질의 발현과의 비교는 SAS를 사용한 chi-square test를 이용하였고 각 단백질간의 상관관계는 spearman의 순위상관계수로 알아보았다. 또한 각 단백질의 발현에 영향을 미치는 일반적 특성과 다른 유전자에 대한 분석은 다중로지스틱 회귀모형으로 알아보았다.

결 과

59명의 여성유방암 환자의 평균 연령은 39.9세(32~84세)이었으며, 40대가 20명(34%)로 제일 많았고 70대 이상이 4명(6.8%)으로 가장 적은 빈도를 보였다. 종양의 크기는 T2 (2~5 cm)가 33예(55.9%)로 제일 많았으며 액와림프절 전이 상태는 N0가 31예(52.5%)로서 제일 많았다(Table

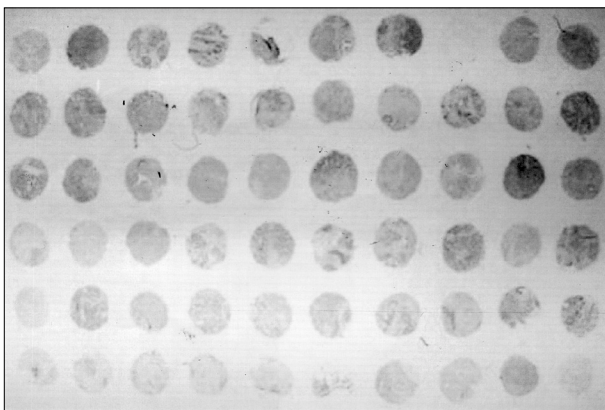


Fig. 1. Immunohistochemical staining of tissue microarrays of multiple breast cancer tissues.

Table 1. The characteristics of patients (n=59)

Features	No. of patients (%)
Tumor size (cm)	
T1 (<2)	8 (13.55)
T2 (2~5)	33 (55.93)
T3 (>5)	17 (28.81)
T4	1 (1.69)
LN metastasis	
0	31 (52.54)
1~3	11 (18.64)
>4	17 (28.81)

LN = lymph node.

Table 2. Correlation of apoptosis related protein expression with clinicopathologic features (n=59)

Spearman Correlation Coefficients / Prob > |R| under Ho: Rho=0 / N = 59

	AGE	T-STAGE	LN	P53	PTEN
AGE	1.00000 0.0	0.19416 0.1406	-0.03905 0.7690	0.06553 0.6219	0.02525 0.8494
T-STAGE	0.19416 0.1406	1.00000 0.0	0.44733 0.0004	0.06414 0.6294	-0.19698 0.1348
LN	-0.03905 0.7690	0.44733 0.0004	1.00000 0.0	0.03827 0.7735	0.00114 0.9932
P53	0.06553 0.6219	0.06414 0.6294	0.03827 0.7735	1.00000 0.0	0.08366 0.5287
PTEN	0.02525 0.8494	-0.19698 0.1348	0.00114 0.9932	0.08366 0.5287	1.00000 0.0
FAS	0.05946 0.6546	-0.03955 0.7662	0.00545 0.9673	0.13599 0.3044	0.54529 0.0001
BAX	0.16495 0.2119	0.10972 0.4081	0.33078 0.0105	0.08214 0.5363	0.25594 0.0504
BCL-2	-0.17254 0.1913	-0.18894 0.1518	0.13133 0.3214	-0.26708 0.0409	0.37405 0.0035
ER	0.18242 0.1667	-0.17853 0.1761	-0.08615 0.5165	-0.29384 0.0239	0.32791 0.0112
PR	0.06922 0.6024	-0.17705 0.1798	-0.05618 0.6726	-0.27625 0.0342	0.38091 0.0029

	FAS	BAX	BCL-2	ER	PR
AGE	0.05946 0.6546	0.16495 0.2119	-0.17254 0.1913	0.18242 0.1667	0.06922 0.6024
T-STAGE	-0.03955 0.7662	0.10972 0.4081	-0.18894 0.1518	-0.17853 0.1761	-0.17705 0.1798
LN	0.00545 0.9673	0.33078 0.0105	0.13133 0.3214	-0.08615 0.5165	-0.05618 0.6726
P53	0.13599 0.3044	0.08214 0.5363	-0.26708 0.0409	-0.29384 0.0239	-0.27625 0.0342
PTEN	0.54529 0.0001	0.25594 0.0504	0.37405 0.0035	0.32791 0.0112	0.38091 0.0029
FAS	1.00000 0.0	0.43900 0.0005	0.13700 0.3008	0.16706 0.2060	0.32575 0.0118
BAX	0.43900 0.0005	1.00000 0.0	0.26447 0.0430	0.21180 0.1073	0.39124 0.0022
BCL-2	0.13700 0.3008	0.26447 0.0430	1.00000 0.0	0.48244 0.0001	0.44990 0.0004
ER	0.16706 0.2060	0.21180 0.1073	0.48244 0.0001	1.00000 0.0	0.40024 0.0017
PR	0.32575 0.0118	0.39124 0.0022	0.44990 0.0004	0.40024 0.0017	1.00000 0.0

1). 종양의 크기와 전이림프절과는 통계적으로 유의있게 유의한 관계를 보였고(P=0.0004) p53의 발현빈도는 21예(35.6%)에서 양성으로 나타났으며 bcl-2 (P=0.04), ER (P=0.02), PR (P=0.03)과 유의한 상관관계를 보였다. PTEN의 발현빈도는 39예(66.1%)에서 양성을 나타내었고 Fas (P=0.0001), Bcl-2 (P=0.004), ER (P=0.01), PR (P=0.003)과 각각 유의한 상관관계를 나타내었다. Fas 발현의 양성빈도는 34예(57.6%)를 보였고 BAK (P=0.0005), PR (P=0.01)과 유의한 관계를 보였으며, BAX의 발현빈도는 42예(71.2%)를 나타내었고 Bcl-2 (P=0.04), PR (P=0.002)와 유의한 관계를 보였고, Bcl-2 발현은 33예(55.9%)에서 양성률을 보였고 ER (P=0.0001)과 PR (P=0.0004)에 관련성을 나타내었다. ER과 PR의 양성률은 각각 34예(57.6%), 41예(69.5%)을 나타내었으며 서로 유의한 관계를 보였다(P=0.002)(Table 2).

고 찰

종양의 생성과 진행에 있어 어떤 유전자가 정상적인 세포 발달에 광범위하게 영향을 미치는 역할을 하는 예는 많다. 정상적인 유방에서는 상피세포의 증식과 apoptosis의 균형이 생리적 주기에 따라 이루어지고 있으며 apoptosis의 조절 기전은 아직 잘 알려져 있지 않으나 내분비적 조절과 paracrine signal에 의한 것으로 생각되며 유방암에서의 apoptosis는 호르몬 치료나 항암치료, tumor necrosis factor나 성장촉진인자 등의 영향을 받는다.(6) 종양세포에서 apoptosis의 변화는 p53이나 bcl-2, bax, Fas와 같은 apoptosis 관련인자들의 변화와 밀접한 관계를 갖게 된다.(2,6) 이중적 특이적 인산화 효소의 유전자인 PTEN(MMAC1 혹은 TEP1)은 최근에 알려진 종양억제 유전자로서 10번 염색체 단축의 23.3 위치에 존재하며 403개의 아미노산으로 구성되어 있으며 protein tyrosine phosphatase(PTP) 계열과 cytoskeletal protein 즉 tensin이나 auxilin과 같이 이중적으로 비슷한 구조를 갖는 dual specificity phosphatase를 만드는 역할을 하며 PTEN 유전자의 이상이 있는 경우에는 유방암이나 갑상선암의 위험도가 증가하게 된다.(3,4) PTEN 유전자는 여러 악성 종양에서 유전자의 결손이나 변이가 있는 것으로 보고되어 유방암에서는 4~6%, 전립선암 35% 자궁내암에서는 35~50% 정도의 이상이 있으며 이외에도 악성 흑색종에서도 유전자 이상이 보고되고 있다. 이러한 변이는 인산화 효소의 불활성을 초래하여 종양억제작용을 저해하는 것으로 되어 있다.(7) PTEN은 in vivo와 in vitro 실험에서 모두 종양세포의 증식을 억제하며 동물실험에서 PTEN 결핍동물에서 여러 가지 종양이 발생하는 것이 보고되었다. PTEN의 작용기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 PI3K/Akt signaling을 억제함으로써 성장을 억제하고 세포의 apoptosis를 증가시키는 것으로 보고되었으며 세포주기의 G1기에서 세포성장

을 정지시킨다고 한다. 또한 FAK (focal adhesion kinase)와 MAP kinase pathway에 작용할 가능성이 알려지고 있으며, (3,4) Tamura등(8)은 종양 세포의 이동, 전이, 흡착 등에도 영향을 주는 것으로 보고되었다. 정상적인 유방세포에서 PTEN의 면역화학염색법으로 발현은 근상피세포에서 강하게 나타나며 관상증식증(ductal hyperplasia)에서는 정상보다 더 PTEN 단백질의 정도가 증가된다. Perren등(9)은 유방암에서 33%의 PTEN 발현의 감소를 보고하였으며 본 연구에서도 20예(33.9%)의 발현감소를 나타내었다. PTEN과 다른 유전자와의 관계에 대한 연구는 많지 않으나 Garcia등(10)은 유방암환자 중 29.5%에서 PTEN 유전자의 이상이 있으며 나이, 림프절 전이, 조직학적 등급, PR과 연관이 있었다고 하였으며 Nakatani등(11)은 ER과의 연관이 있음을 보고하였으며 Perren등(9)의 연구에서도 PTEN과 ER, PR과의 관계가 시사되었다. 본 연구에서도 ER 및 PR과 통계적으로 유의한 관계를 보여서 hormonal regulation의 역할을 시사하는 소견을 나타내었으며 다른 apoptosis연관 인자인 Fas, Bcl-2와 연관이 있는 것으로 나타났다. Wild type의 p53은 잘 알려진 종양억제인자로서 종양 세포의 증식을 억제하고 DNA가 손상된 세포를 세포주기에서 더 이상 진행시키지 않으며 apoptosis를 야기하는 중심적 유전자이며 유방암을 비롯한 여러 악성종양에서도 p53 유전자의 변이나 손실을 흔하게 볼 수 있다. 유방암에서 p53의 변이는 약 20~40%로서 보고되고 있으며 정상적인 p53의 기능이 소실되면 환자의 예후와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. (12,13) 본 연구에서도 35.6%의 발현을 나타내어 전 연구들과 일치한 성적을 보였다. 또한 p53 유전자는 apoptosis와 관련된 다른 여러 유전자와 상관관계를 갖는 것으로 보고되고 있다. Wild type의 p53은 Bak 유전자의 promotor와 유사한 구조를 갖고 있는 부위가 있으며 Bax 유전자와 Bcl-2 유전자에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며, (14,15) Formby와 Wiley(16)는 progesterone이 p53 mRNA를 증가시킨다고 하였고, Kim등(17)은 p53이 Fas mediated apoptosis를 야기한다고 보고하였다. 본 연구에서도 p53은 Bcl-2와 PR간에 유의한 상관관계를 나타냈으나 p53과 Fas와는 통계적으로 유의하지 않았다. Bcl-2는 apoptosis에 의한 세포사멸을 억제하는 중요한 유전자로서 침윤성유방암에서(45%) 정상 유방조직(96%)이나 전암병변(79%)보다 그 발현이 감소되는 경향을 보이며, (15) Bcl-2 계열에는 BAX와 같은 동종의 유전자 등이 있어 Bcl-2와 heterodimer를 형성하여 apoptosis를 촉진하는 유전자가 알려져 있다. (2) 임상적으로는 Bcl-2 유전자의 발현은 조직학적으로 양호한 형태와 관련이 많고 호르몬 수용체 양성과 일치하며 p53 변이, c-erb B2와는 역관계를 갖는다고 하여 예후에는 좋은 영향을 미친다고 하였다. (18,19) Bargou등(20)은 BAK mRNA를 측정하여 정상유방조직에서보다 유방암조직에서 현저히 감소되는 반면 Bcl-

2의 수치는 정상이나 종양에서 큰 차이가 없다고 하였다. Binder등(2)은 유방암환자의 48%에서 BAX의 발현을 보고하였고, 조직학적으로 등급이 높고 c-erbB 1/2, 세포증식 정도가 증가하는 양상을 보였다고 하였으며 bcl-2 발현과 역관계를 갖는다고 하였으나 Krajewski등(21)은 전이성 유방암환자에서 34%의 BAK 유전자발현의 감소를 보고하면서 이들 환자는 치료에 잘 반응하지 않고 예후가 불량하였다고 보고하였다. Reed(22)는 BAX의 표현이 ER, PR, p53, c-erb B2, 조직학적 등급, 림프절 전이 등의 다른 임상적 요인과 연관이 없으며 Bcl-2와 관련이 있다고 하였다. 이러한 Bcl-2와 BAX가 apoptosis에 중요한 역할을 하며 서로 연관성을 갖고 있으나 apoptosis에 대한 작용은 독립적으로 이루어진다. 본 연구에서도 BAX와 Bcl-2는 유의한 관계를 보였으며 Bcl-2 역시 다른 문헌에서와 같이 ER이나 PR과 매우 유의한 상관관계를 나타냈다. Fas는 nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily의 한 종류로서 270,000의 분자량을 갖는 포화지방산의 생성에 작용하는 효소로서 정상적인 유방 상피세포나 난소, 자궁 내막, 질의 상피세포 등에서도 발현된다. (7) Mottoliese등(23)은 정상유방이나 양성종양(91.1%)보다 유방암에서(56.7%) 더 발현도가 낮게 보고하였고, 조기 유방암에서 Fas의 발현이 있는 경우 재발이 높으며, 혈중 Fas가 높은 경우 예후가 불량한 것으로 보고하였고, (24) Hahnel등(25)도 Fas mRNA가 전이성암에서 원발암보다 증가된다고 하였다. 본 연구에서도 34예의 57.6%에서 발현을 나타냈으며 통계적으로 BAX와 PR과 연관을 보였다.

Tissue microarrays 방법은 최근에 개발된 것으로 2 mm 정도의 작은 원통형의 조직표본들을 모아 하나의 새로운 파라핀에 포매하여 이를 5 um의 두께로 절편하여 DNA와 RNA 실험, 단백질 발현도에 대한 실험 또는 면역조직화학염색법을 사용하여 많은 종류나 수의 종양을 신속하게 같은 조건으로 실험할 수 있는 장점을 갖고 있다. (5) 이러한 tissue microarrays 방법의 문제점으로서 작은 표본 하나가 이형질(heterogeneity)인 종양 전체를 항상 대표할 수 있는가에 대한 위험성이다. 그러나 형태학적으로 가장 특징적이고 확실한 부위를 찾아서 선택하게 되고, 다른 유전자 증폭이나 분자 생물학적 인자들에 관한 성적에서 전체적인 조직표본에서의 과거 성적과 일치하였다고 하였으며, 종양의 집단 검사에 유용한 방법으로 보고하였다. (6) 본 연구에서도 apoptosis에 관련된 여러 가지 인자에 대한 면역화학염색법을 시도하여 PTEN 유전자발현이 다른 문헌에서 보고된 성적과 유사하게 호르몬수용체 발현과 연관이 깊으며 apoptosis에 대한 영향이 있음을 시사하는 결과를 얻을 수 있었다.

결론

저자들은 59명의 유방암 환자의 조직을 1개의 slide에 모은 tissue microarrays를 이용한 방법으로서 여러 가지 apoptosis 관련인자에 대한 면역화학염색법을 사용하여 각 인자의 발현빈도를 산출하여 임상적인 자료와 함께 분석한 결과 과거의 다른 문헌에서 보고되었던 성적과 일치하는 결과를 얻을 수 있었으며, 연구시간도 비교적 신속하게 수행할 수 있는 장점을 보였다. 이러한 tissue microarrays 방법은 많은 수의 표본에서나 여러 가지 유전자에 대한 screening의 한 방법으로 유용하게 쓰일 것으로 보이며 신뢰성이 있는 결과를 얻기 위하여 향후 계속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Suh CI, Suh KA, Park SH, Chang HJ, Ko JW, Ahn DH: Annual report of the central cancer registry in Korea-1998 (based on registered data from 124 hospitals). *J Korean Cancer Assoc* 32:827-34, 2000
- 2) Binder C, Marx D, Binder L, Schauer A, Hiddemann W: Expression of Bax in relation and other predictive parameters in breast cancer. *Ann Oncol* 7:129-33, 1996
- 3) Lu Y, Lin YZ, LaPushin R, Cuevas B, Fang X, Yu SX, et al: The PTEN/MMAC1? TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene* 18:7034-45, 1999
- 4) Weng LP, Smith WM, Dahia PL, Ziebold U, Gil E, Lees JA, et al: PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res* 59:5808-14, 1999
- 5) Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, et al: Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5:1966-75, 1999
- 6) Keane MM, Eitenberg SA, Lowrey GA, Russell EK, Lipkowitz S: Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res* 56:4791-8, 1996
- 7) Immaculata DV, Gertig DM, Nagase S, Hankinson SE, O'Brien R, Speizer FE, et al: Novel germline mutations in the PTEN tumour suppressor gene found in women with multiple cancers. *J Med Genet* 37:336-41, 2000
- 8) Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM: PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 274:20693-703, 1999
- 9) Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, et al: Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* 155:1253-60, 1999
- 10) Garcia JM, Silva JM, Dominguez G, Gonzalez R, Navarro A, Carretero L, et al: Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. *Breast Cancer Res Treat* 57:237-43, 1999
- 11) Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, et al: Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor deficient breast cancers and androgen independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 274:21528-32, 1999
- 12) Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, Benter T, Luck HJ, Wolff G, et al: Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer* 87:517-21, 2000
- 13) Barnes DM, Camplejohn RS: P53, apoptosis, and breast cancer. *J Mamm Gl Biol Neoplasia* 1:163-75, 1996
- 14) Krajewski S, Thor AD, Edgerton SM, Moore DH II, Krajewska M, Reed JC: Analysis of Bax and Bcl-2 expression in p53 immunopositive breast cancers. *Clin Cancer Res* 3:199-208, 1997
- 15) Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, Kanno M, Katagata N, Hara K, et al: Correlation between the expression of apoptosis related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 3:2329-35, 1997
- 16) Formby B, Wiley TS: Bcl-2, surviving and variant CD44 v7-v10 are downregulated and p53 is upregulated in breast cancer cells by progesterone: inhibition of cell growth and induction of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 202:53-61, 1999
- 17) Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Monaco R, Abarzua P, et al: Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem* 274:34924-31, 1999
- 18) Bhargava V, Kell DL, Rijn M, Warnke RA: Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol* 145:535-40, 1994
- 19) Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R: Clinical studies of Bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocrine Related Cancer* 6:61-8, 1999
- 20) Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Mapara MY, Daniel PT, Arnold W, et al: Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest* 97:2651-9, 1996
- 21) Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, et al: Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 55:4471-8, 1995
- 22) Reed JC: Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer. *J Clin Invest* 97:2403-4, 1996
- 23) Mottollese M, Buglioni S, Bracalenti C, Cardarelli MA, Ci-

- abocco L, Giannarelli E, et al: Prognostic relevance of altered Fas (CD95) system in human breast cancer. *Int J Cancer* 89:127-32, 2000
- 24) Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U: Expression of fatty acid synthetase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 77:474-82, 1996
- 25) Hahnel E, Harvey J, Robbins P, Sterrett G, Hahnel R: Hormone regulated genes (pS2, PIP, FAS) in breast cancer and nontumoral mammary tissue. *Pathobiology* 62:82-9, 1994
-