

## cDNA Microarray 기법을 이용한 한국인 유방암 조직에서 유전자 발현 양상

서울대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>서울대학교 의과대학 암연구소

한원식 · 정기욱 · 안수정<sup>1</sup> · 노동영 · 윤여규 · 오승근 · 최국진

### Gene Expression Profiles of Primary Breast Cancer Tissue Using cDNA Microarray

Wonshik Han, M.D., Ki-Wook Chung, M.D., Soo-Jung Ahn, M.D.<sup>1</sup>, Dong-Young Noh, M.D., Yeo-Kyu Youn, Seung-Keun Oh, M.D. and Kuk-Jin Choe M.D.

Department of Surgery, Seoul National University, College of Medicine, <sup>1</sup>Cancer Research Institute, Seoul, Korea

**Purpose:** Breast cancer is characterized by an extensive heterogeneity that complicates the precise assessment of tumor aggressiveness and makes therapeutic decisions difficult. Variation in transcriptional programs accounts for much of the biological diversity of the tumors. We tried to investigate the gene expression profile of Korean breast cancer with cDNA microarray technique.

**Methods:** We have characterized variation in gene expression patterns in 7 tissue samples of infiltrating ductal carcinoma from different individuals and 1 tissue sample of malignant phyllodes tumor using cDNA microarray representing 7,500 human genes. Breast cancer cell line, MCF7 and T lymphoblastoid cell line, CCRF-CEM were also included in this study. RNA extracted from normal breast tissue of 3 non-cancer individuals were pooled and used as a control sample. We analyzed the data with Cluster and TreeView program.

**Results:** Tissues from infiltrating ductal carcinoma and tissue from phyllodes tumor and 2 cell lines are clearly differentiated by hierarchical clustering as their pathologic features and showed characteristic genetic expression. Some interesting clusters were found. They were 'stromal cluster', 'immune cluster', 'proliferation and transcription cluster', and a cluster including FOS and JUNB gene. Phyllodes tumor

showed distinctive genetic expression pattern compared with ductal carcinoma tissues. Two patients whose c-erbB2 protein had been measured as highest level in immunohistochemistry showed overexpression of ERBB2 gene. GRB7, MLN51, and PPARBP in 17q21 that are known to coexpress with ERBB2 also showed overexpression in these patients.

**Conclusion:** We found some interesting clusters and confirmed the feasibility of cDNA microarray in the study of breast cancer. This preliminary study will help the further research of DNA microarray with larger sample size. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2002;5:284-290)

**Key Words:** Breast cancer, cDNA microarray, Gene

**중심 단어:** 유방암, cDNA microarray, 유전자

### 서론

Human Genome Project의 완료 이후 유전체 연구의 초점은 염기 서열 분석을 떠나 각 유전자의 기능의 규명에 모아지고 있다. 이런 작업에 있어서 가장 효율적인 도구로 최근 각광 받고 있는 것이 DNA chip, 혹은 gene chip 등으로 불리는 DNA microarray 기법이다.(1-3) DNA chip 기술은 bioinformatics와 computational biology의 발전으로 빠르게 표준 실험 기법으로 자리를 잡아가고 있다. 이 기술은 동시에 수천 개의 유전자와 그 RNA 산물에 대한 분석을 가능하게 한다. 그 개요는, 전형적으로 수 천 내지 수 만 개의 유전자를 특수 표면 처리된 유리 슬라이드 위에 고 밀도로 집적시키고 기준시료와 시험시료로부터 분리한 total RNA로부터 reverse transcription 방법으로 cDNA를 합성하는 과정 중에 형광물질을 표지시킨다. 이렇게 표지된 cDNA probe를 하나의 DNA chip에 경쟁적으로 반응시킨 다음, 여기로부터 얻어진 image를 통계적으로 처리를 함으로써 spotting 된 유전자중에서 의미 있는 수 십 내지 수백 개의 특이적 발현 양상의 차이를 보이는 유전자들을 포함하는 data file을 얻을 수 있다. 여기서 얻어진 data들을 실험자의 목적에 따라 여러 가지 방법으로 filtering 함으로

책임저자 : 노동영, 서울시 종로구 연건동 28

☎ 110-744, 서울대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 760-2318, Fax: 766-3975

E-mail: dynoh@plaza.snu.ac.kr

접수일 : 2002년 12월 13일, 게재승인일 : 2002년 12월 26일

본 연구는 폐암 및 유방암/난소암 유전체 연구센터로부터 연구비 지원을 받았음.

써 최종적으로 의미 있는 data file 을 작성할 수가 있다.

많은 새로운 유전자 분석기법들이 유전자 발현 양상의 다양성에 근거하여 종양을 분류할 수 있는 획기적인 비전을 제시해 왔다. 그러나 인체 유방암에서의 유전자 발현의 연구는 다른 대부분의 고형암에서와 마찬가지로 두 가지 이유에서 어려움이 있다. 첫째, 유방 종양은 암세포뿐만 아니라 다른 상피세포나, 기질 세포, 지방 세포, 혈관내막 세포, 침윤한 림프구 등 많은 다른 형태의 세포들을 포함하고 있다. 둘째, 유방암 세포 그 자체가 형태학적으로나 세포학적으로 매우 다양성을 띤다. 또한 유방암은 그 자연 경과와 치료에 대한 반응에 있어서도 매우 다양하게 나타나는데, 이러한 생물학적 표현형의 다양성은 유전자 발현 양상의 다양성을 수반할 것으로 가정할 수 있으며, 이는 DNA chip 기법을 이용하여 포착할 수 있을 것이다.(4-6) 그리고 인체 유방암의 유전자 발현형의 체계적인 규명은 유방암의 분자적 분류법의 기초가 될 수 있을 것이다. 현재까지 DNA chip을 이용한 유방암의 유전자 프로파일에 대한 연구는 국내에서는 발표된 바가 없는 실정으로써 저자는 한국인 유방암에 있어서 유전자 발현의 특징적 프로파일을 DNA microarray 기법으로 분석하고자 한다.

## 방 법

### 1) 연구 대상

2000년 4월부터 2001년 11월까지 서울대학교병원 외과에서 유방암 진단으로 수술 받은 환자들의 유방암 조직 중에서 무작위로 7명의 침윤성 관암종 환자와 1명의 악성엽상 육종 환자(mitotic count: 4/10 HPF)의 조직을 대상으로 하였다. 이 조직들은 수술 직후 병소에서 채취하여 액체 질소에서 동결 보관해 오던 조직들이었다. 각 환자들의 임상 데이터를 Table 1에 정리하였다. 또한 한국 세포주은행으로부터 얻은 유방암 세포주인 MCF7 세포주와 T

림프아형 세포주(T lymphoblastoid cell line)인 CCRF-CEM을 대상에 포함시켰다. 한편 4명의 유방축소수술 환자에서 채취한 정상 유방 조직 중 3명의 정상 조직의 RNA를 pooling하여 대조 시료로 삼았다.

### 2) 연구 방법

(1) 동결조직 및 세포주에서 RNA의 추출: -120°C 액체 질소 탱크에 보관 중인 동결 조직들을 채취하여 TRIzol 시약(GIBCO/BRL, Co.)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 세포주에서도 같은 방법으로 total RNA를 추출하였다. RNA pellet을 DEPC-treated H<sub>2</sub>O 에서 약 0.5µg/µl에서 1.0 µg/µl 농도까지 녹여 -70°C에 보관하였다. 260 nm와 280 nm의 absorbance에서 RNA preparation의 정성 및 정량을 실시하였다.

(2) DNA chip 선정, microarray 및 scanning: DNA chip 은 (주)지노믹트리 사의 7.5 K GeneTrack Human cDNA chip을 사용하였다. 이는 7,500개의 알려진 유전자들과 EST로 구성되며 cDNA size는 0.5~5 kb (평균 1 kb)이다. 유방암 조직 및 세포주에서 추출한 RNA에 대하여 Cy5 dye를 이용하여 형광 labeling된 cDNA를 만들고 대조 시료인 정상 유방 조직 RNA pool에 Cy3 dye를 labeling하였다. Washing 과정을 거쳐 hybridization을 완료하였다. cDNA microarray는 Axon Instrument GenePix4000B Scanner를 이용하여 10 micron 해상도로 스캔하며, 그 결과 파일을 GenePix Pro 3.0 소프트웨어에 의해서 분석한다.

(3) Array 데이터 분석: Eisen 등(7)이 개발한Cluster 프로그램을 이용하여 average-linkage hierarchical clustering 방법을 각 유전자와 조직 및 세포주 샘플에 적용하였다. 그 결과를 분석하여 인체 유방암에서 유전자 발현의 특성을 관찰하고, 임상 데이터와의 연관성을 알아보았다. Tree-View 소프트웨어를 통하여 도식을 얻었다.

Table 1. Clinical data of patients

No.	Age	Histology	Size (cm)	Multi	NG	HG	N	M	ER	PR	p53 (%)	c-erbB2	bcl-2	Ki-67 (%)	Menopause
#1	32	IDC	4	No	1		0	0	-	-	<50	1+	-	30	Pre
#2	34	IDC	3.4	Yes	1	3	0	0	-	-	0	3+	-	10	Pre
#3	50	IDC	2.5	No	2	3	2	0	-	-	afew	3+	-	10	Post
#4	45	IDC	2.7	No	1	3	0	0	-	-	7	2+	+	30	Pre
#5	29	IDC	6	No	2	2	1	0	-	+	afew	1+	+	3	Pre
#8	47	Phyllodes	10	No											Pre
#9	56	IDC	5.5	No	1	2	1	0	-	-	25	2+	-	2	Post
#10	42	IDC	3.3	Yes	1	3	2	0	-	-	50	1+	+	3	Pre

IDC = infiltrating ductal carcinoma; Phyllodes = malignant phyllodes tumor; Multi = multifocal lesion; NG = nuclear grade; HG = histologic grade; N = TNM N stage; M = TNM M stage.



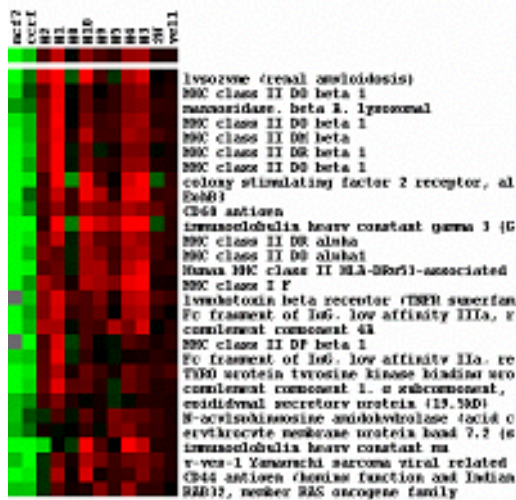


Fig. 3. The 'immune cluster'.



Fig. 4. The 'proliferation and transcription cluster'.

의 유전자들은 간질 세포나 면역 세포가 없는 세포주에서는 발현이 현저하게 감소하는 것을 보여주었다. 'stromal cluster'는 침윤성 유관암종보다는 엽상 육종에서 그 발현이 높게 나타나는 양상이었고, 'immune cluster'의 유전자들은 반대로 침윤성 유관암종 조직에서 더 발현이 증가되어 있음을 보였다. 이는 각 종양의 병리학적 양상을 대변한다고 할 수 있다. 세번째 특징적인 클러스터는 cell proliferation 및 transcription, apoptosis 등의 조절에 관여되는 유전자들로서, 임상적으로도 세포 증식의 지표로 사용되는 PCNA를 비롯하여 BCL2-like 1, leukemia-associated phosphoprotein p18, E2F transcription factor 4, heterogeneous

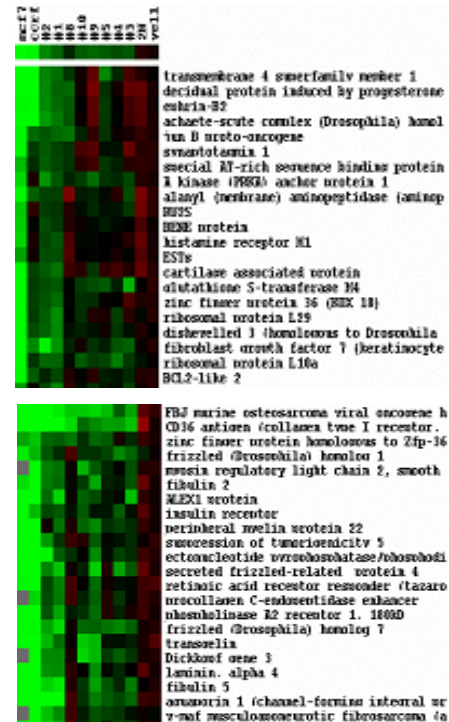


Fig. 5. Cluster including FOS, JUNB.

nuclear ribonucleoprotein, SET translocation, minichromosome maintenance deficient, replication factor C, splicing factor, RNA binding motif protein 8A, CDC28 protein kinase 2 등을 포함하며, 거의 모든 세포주와 조직에서 현저히 발현이 증가된 양상을 보였는데, 특히 세포주에서의 발현 증가가 두드러졌으며 엽상 육종에서 가장 발현이 낮게 나타나는 양상이었다(Fig. 4). 마지막 클러스터는 가장 큰 클러스터로 FOS, JUNB, EGR1 등을 포함하는데, 이들은 증식성 자극에 의해 신호 전달 과정의 transcription factor 들에 대한 정보를 가진 유전자들이다(Fig. 5). Bertucci 등(8)은 이를 'immediate response cluster'라 하였으며, Perou 등(9)도 이 클러스터를 관찰하였었다. Perou 등의 연구에서 이 클러스터에 포함되었던 Dopachrome tautomerase, NR4A1 등도 이 번 연구에서 같은 클러스터에서 관찰되었다. 이 클러스터의 유전자들은 대부분 그 발현이 감소한 양상을 보였다.

## 2) Microarray 결과와 임상병리학적 자료의 비교

대상이 되었던 환자들의 임상병리학적 데이터를 microarray 결과와 비교하여 그 일치성과 예측성을 평가하고자 하였다. 먼저 엽상 육종에서 특징적으로 발현이 증가, 감소되는 유전자 군을 찾기 위하여 세포주를 제외시키고, 조직 샘플들만 가지고 클러스터링을 하였다. 먼저 엽상육종에서 감소된 유전자들을 보면, MHC class II, CD44, CD48, CD53, colony stimulating factor, T cell receptor,



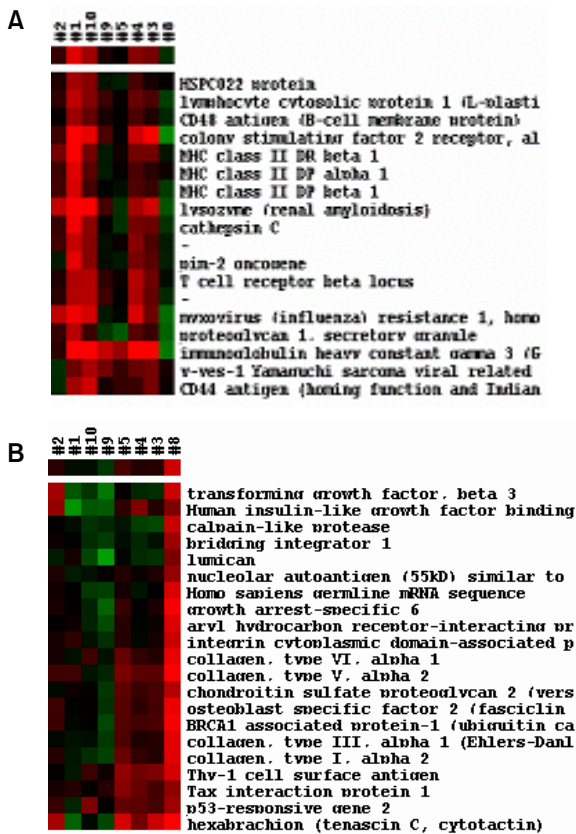


Fig. 6. (A) Genes underexpressed in phyllodes tumor, (B) Genes overexpressed in phyllodes tumor.

immunoglobulin 등 면역세포에서 발현되는 유전자들이 대부분이었고, 앞에서 말한 'immune cluster'의 유전자들과 중복되는 유전자들이 많았다(Fig. 6A). 임상 육종에서 침윤성 관암종에서보다 증가된 유전자들(Fig. 6B)은 collagen, chondroitin, integrin 등 간질세포에서 증가될 수 있는 유전자들 외에 bridging integrator 1이나 BRCA1 associated protein-1처럼 종양 억제 유전자로 여겨지는 유전자들이 포함된 한편, 세포의 분화와 증식에 관여하는 transforming growth factor beta 3, growth arrest-specific 6, insulin-like growth factor 2 등의 발현이 증가되어 그 의미에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다 하겠다.

다른 연구들에서 흔하게 관찰되는 클러스터 중의 하나는 에스트로겐 수용체 유전자와 함께 발현되는 유전자들의 클러스터인데 이번 연구에 포함된 환자들은 우연히 모두 면역조직화학 검사상 에스트로겐 수용체가 음성이었던 환자들로, microarray 결과에서도 에스트로겐 수용체 유전자의 발현이 증가된 것은 없었다.

면역조직화학적 검사상의 c-erbB<sub>2</sub> 결과와 microarray 상 ERBB2 유전자 발현의 상관관계를 분석하였다. 이번 연구의 대상 환자 중 2번과 3번에서 면역조직화학검사 상 c-erbB<sub>2</sub>가 3+로 높게 나왔는데, microarray 상 역시 2번과 3

번에서만 ERBB2의 발현이 4배 이상 증가됨을 보였고, 같은 17q12 염색체 부위에서 증폭되는 것으로 알려진 GRB7이 2번과 3번에서 4배 이상, MLN51과 PPARBP가 3번에서만 4배 이상 발현이 증가된 것으로 관찰되었다.

한편 임상적인 병기와 유전자 발현과의 상관관계를 보기 위하여 각 환자들의 병기를 분석하였는데 3, 5, 9, 10번 환자들은 III기의 국소 진행된 유방암 환자들이었고, 1, 2, 4번 환자들은 림프절 음성의 병기 IIA의 환자들이었다. Microarray 상에서는 1번과 2번이 같이 clustering되어 유전자 발현 양상이 다른 종양군과 다른 것으로 나타났으나 4번은 다른 진행된 병기의 조직들과 같이 clustering 되어 임상적 병기만으로는 유전자 발현 양상이 설명되지 않음을 보여주었다.

## 고 찰

유전자 발현의 다양성은 암의 생물학적 다양성을 반영한다. 유전자 발현 양상의 특성을 체계화하는 것은 각 종양에서 관찰되는 발현 양상의 생물학적 중요성을 해석하는데 근간이 될 것이다. 이번 연구에서 저자는 최신 기법인 cDNA microarray를 이용하여 한국인 유방암에서의 유전자 발현 양상의 특성을 규명하고자 하였다. 우선 hierarchical clustering 방법을 통하여 몇 개의 특징적인 클러스트들을 발견하였는데 'stromal cluster'와 'immune cluster'는 유방암 조직 내에 유방암 세포뿐 아니라 간질세포와 면역세포가 다수 혼재해 있음을 의미하며, 세포주에서는 이들 유전자들이 발현되지 않음을 보여줌으로써 이를 입증하였다. 그리고 암세포에서 명백하게 증가될 것으로 기대되었던 세포 증식과 유전자 전사, 세포 사멸의 억제 등에 관여하는 유전자들이 하나의 클러스터를 이루어 현저하게 발현이 증가됨이 관찰되었다. 이들 유전자들은 예상대로 순수하게 암세포로 이루어진 세포주에서 더욱 발현이 증가된 것이 보였다. 한편 FOS, JUNB를 포함하는 클러스터는 Perou 등(9)과 Bertucci 등(8)이 보고하였었고, 난소암의 분석에서도 관찰되었다.(14) Perou 등(9)은 이 유전자 군이 외과적 절제 후에 검체의 장시간 조작에 의해서 특징적으로 발현이 유도된다고 하였다.

이번 연구에서는 악성 임상 육종의 특징적인 유전자 발현 양상이 많이 관찰되었는데 임상 육종의 microarray를 통한 유전자 발현 특성은 아직까지 보고된 바가 없는 것이다. 임상 육종에서는 면역세포에서 발현되는 유전자가 침윤성 관암종에 비하여 적게 발현되고 간질 세포와 관련되는 유전자들이 많이 발현되는 것이 관찰되었다. 이는 상대적으로 임상 육종에서 간질세포가 많고 면역세포의 침윤이 관암종에 비하여 적은 것을 반영하는 것이라 하겠다. 한편 앞에서도 언급하였듯이 bridging integrator 1이나 BRCA1 associated protein-1처럼 종양 억제 유전자로 여겨

지는 유전자들의 발현이 관암종에 비하여 많이 증가되면서, 반면에 세포의 분화와 증식에 관여하는 transforming growth factor beta 3, growth arrest-specific 6, insulin-like growth factor 2 등의 발현이 증가되어 그 의미에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다 하겠다. 특히 다른 모든 관암종에서 현저한 감소를 보였던 insulin-like growth factor 2가 염상육종에서는 정상 유방조직에 비해 24배의 발현 증가를 보여 매우 특이하였다.

여러 연구에서 microarray 상에서 에스트로겐 수용체 유전자의 발현 증가가 임상적으로 측정된 에스트로겐 수용체 단백질의 양성 여부와 일치하는 것으로 보고되었다.(8-10) 또한 에스트로겐 수용체 유전자는 GATA binding protein 3, X-box binding protein 1, hepatocyte nuclear factor 3 alpha 등의 transcription factor 들과 함께 발현하는 것으로 보고되었다.(9,11-13) 이번 연구에서는 우연히도 에스트로겐 수용체 단백질이 모두 음성인 유방암 조직들만이 대상이 되었다. 그 결과 에스트로겐 수용체 유전자의 발현이 증가된 조직이 없었으며, 위에서 언급된 함께 발현되는 유전자들도 발현의 증가가 전혀 없었다.

ERBB2의 과발현은 모든 일차성 유방 종양의 10~34%에서 발견되며 나쁜 임상적 예후와 관련이 있다고 알려져 있다.(15) 최근 연구에 의하면 ERBB2 단독으로 발현이 증폭되는 것이 아니고, 17q12 염색체 부위에 있는 유전자들인 THRA/ERBA1, RARA, TOP2A, GRB7, MLN50, MLN51, MLN62/TRAFA, MLN64, PPARBP 등의 유전자들이 함께 증폭되는 것으로 알려졌다.(16) 또한 최근에는 DNA microarray 기법을 이용하여 ERBB2와 함께 발현되는 유전자들을 밝혀내려는 연구들이 수행되었다.(17) 이번 연구에서는 면역조직화학검사로 측정된 c-erbB2 단백질이 3+로 높게 나온 경우 microarray 상에서도 ERBB2 유전자 발현이 현저히 증가되었음이 일치되게 관찰되었다. 또한 함께 증폭되는 것으로 알려진 위에 언급된 유전자들 중 다수가 이번 연구에서도 같은 환자에서 그 발현이 함께 증가됨이 관찰되었다.

DNA microarray를 이용한 종양 연구에서 가장 많이 다루어지고 있는 주제는 종양의 예후인자와 치료예측 인자로서의 유전자군을 찾아내려는 노력이다. 특히 유방암에서는 치료 방침의 결정에 있어서 예후를 예측할 수 있는 인자가 다른 어떤 종양보다도 중요함에도 불구하고 현재까지 알려진 어떤 예후인자도 단독으로 만족스러운 결론을 내려주지 못한다.(11) 그런 이유로 유방암에서 가장 활발하게 microarray를 이용하여 그 임상적 예후를 결정하려는 연구가 수행되었다.(18,19) 본 연구에 있어서는 그 대상이 된 환자의 수가 적어서 예후에 따라서 유전자를 분류해 내는 것은 어려웠다. 임상병기가 III기에 해당했던 3, 5, 9, 10번 환자들과 림프절 전이가 없는 IIA에 해당했던 1, 2, 4번 환자들간에 그 발현 정도를 구별할 수 있는 유전자

군 또한 발견되지 않았다.

## 결론

서울대학교병원에서 유방암절제술 후 얻은 7예의 침윤성 관암종 조직과 1예의 악성 염상 종양 조직, 그리고 유방암 세포주인 MCF7 세포주와 T 림프아형 세포주인 CCRF-CEM에 대하여 정상 유방조직을 대조 시료로 한 cDNA microarray를 시행한 후 유전자 발현 양상의 특성을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

(1) 침윤성 관암종 조직들과 염상 종양 조직 그리고 세포주들은 hierarchical clustering에 의해서 각각 명확하게 구분되며 각각 특이한 유전자 발현 양상을 보여주었다.

(2) 몇 개의 특징적인 클러스트들을 발견할 수 있었는데, 이들은 간질 조직과 관련된 클러스터, 면역 세포와 관련된 클러스터, 세포 증식 및 세포 주기와 관련된 클러스터, 그리고 FOS, JUNB를 포함하는 클러스터 등이었다.

(3) 염상 종양에서 특징적으로 관암종에 비해서 발현이 증가되거나 감소된 유전자군을 발견할 수 있었다.

(4) 면역조직화학적 검사상 c-erbB2 단백질이 높게 측정된 두 환자에서 ERBB2 유전자의 과발현이 관찰되었고, ERBB2와 함께 증폭되는 것으로 알려진 염색체 17q12 부위의 유전자들도 이 환자들에서 일치되는 과발현을 보였다.

본 연구는 한국인의 유방암의 유전자 발현을 관찰한 cDNA microarray 연구로서 의의를 가지며 예비 연구로서, 향후 더 많은 환자와 세포주들을 대상으로 한 연구에 기초자료가 될 수 있을 것이다. cDNA microarray를 이용한 유방암 조직에서 유전자 발현 양상의 규명은 그 특성에 따른 유방암의 분자적 분류를 가능하게 할 것이다. 또한 아직 그 기능이 잘 알려지지 않은 여러 유전자들의 규명을 가능하게 할 것이며, 현재까지 알려진 예후인자보다 더 정확하게 예후를 예측할 수 있는 유전자 프로필을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

## REFERENCES

- 1) Nowak R. Entering the postgenome era. Science 1995;270(5235):368-71.
- 2) DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. Nat Genet 1996;14(4):457-60.
- 3) Ramsay G. DNA chips: state-of-the art. Nat Biotechnol 1998; 16(1):40-4.
- 4) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet 1999; 21(1 Suppl):10-4.

- 5) Granjeaud S, Bertucci F, Jordan BR. Expression profiling: DNA arrays in many guises. *Bioessays* 1999;21(9):781-90.
- 6) Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(16):9212-7.
- 7) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(25):14863-8.
- 8) Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, Eisinger F, Adelaide J, Tagett R, et al. Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Hum Mol Genet* 2002;11(8):863-72.
- 9) Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
- 10) West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R, et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(20):11462-7.
- 11) Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(19):10869-74.
- 12) Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, Granjeaud S, Adelaide J, Tagett R, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000;9(20):2981-91.
- 13) Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 2001;61(16):5979-84.
- 14) Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, et al. Hampton GM. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(3):1176-81.
- 15) Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):125-38.
- 16) Kauraniemi P, Barlund M, Monni O, Kallioniemi A. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res* 2001;61(22):8235-40.
- 17) Wilson KS, Roberts H, Leek R, Harris AL, Geradts J. Differential Gene Expression Patterns in HER2/neu-Positive and -Negative Breast Cancer Cell Lines and Tissues. *Am J Pathol* 2002;161(4):1171-85.
- 18) Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, et al. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61(13):5168-78.
- 19) van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-6.