

URČOVÁNÍ NEBALANCOVANÝCH GENOVÝCH ZMĚN METODOU ARRAY KOMPARATIVNÍ GENOMOVÉ HYBRIDIZACE (ARRAY CGH) U NÁDORŮ.

DETERMINATION OF GENOMIC IMBALANCES USING ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (ARRAY CGH) IN CANCER GENOM.

JAROŠOVÁ M¹., POSPÍŠILOVÁ H¹., PLACHÝ R.¹, PAPAŽÍK T.¹, KOPTÍKOVÁ J²., INDRÁK K.²

¹HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF A FN OLOMOUC

²CENTRUM BIOSTATISTIKY A ANALÝZ, PŘF A LF MU BRNO

Souhrn

Nádory jsou onemocněním charakterizovaným genomovou instabilitou. Změny v počtu kopií DNA jsou jednou z mnoha abnormit, kterými může být ovlivněna exprese a funkce genů. Proto určení nebalancovaných změn, které představují především amplifikace a delece chromosomových oblastí a genů v nich lokalizovaných, dovoluje určit kritické geny a signální dráhy zahrnuté do vzniku a vývoje onemocnění. Určení takových nebalancovaných změn dovoluje molekulárně cytogenetická metoda komparativní genomové hybridizace (CGH). CGH se stala základem nedávno vyvinuté technologie, metody array komparativní genomové hybridizace (array CGH), která dovoluje detailní analýzu chromosomových oblastí, ve kterých došlo ke změně počtu kopií sekvencí DNA. V současnosti můžeme využít řady array CGH technologií, které významným způsobem zvyšují rozlišovací schopnost metody CGH a umožňují definovat v genomu oblasti, které mají vztah ke vzniku nádoru a dovolují rychle odhalit geny ležící v těchto oblastech.

Tato práce informuje o principu, významu a využití metody array CGH při určování nebalancovaných změn v nádorovém genomu.

Klíčová slova: CGH, DNA čip, array CGH, nádorový genom, onkogen, tumor supresorový gen

Summary

Cancer is a disease characterized by genomic instability. One of the mechanisms that changes gene expression and gene function is DNA copy number changes. These changes mostly include gains and losses of chromosomal regions, which can be detected by molecular cytogenetic method: comparative genomic hybridization (CGH). On the basis of CGH a new method has been recently developed called array comparative genomic hybridization (array CGH). Array CGH improves the resolution of CGH and enables detailed analysis of chromosomal regions, detecting DNA sequence copy number changes. Modern array CGH technologies possess increased sensitivity and are able to define genomic regions related to cancer, and to identify genes lying within these regions. Such genes may be involved in critical signaling pathways and may play role in cancer development and progression. This work informs about the principle, significance and usage of array CGH method in detection of imbalanced aberrations of cancer genome.

Key words: CGH, DNA chip, array CGH, tumor genom, oncogene, tumor suppressor gene

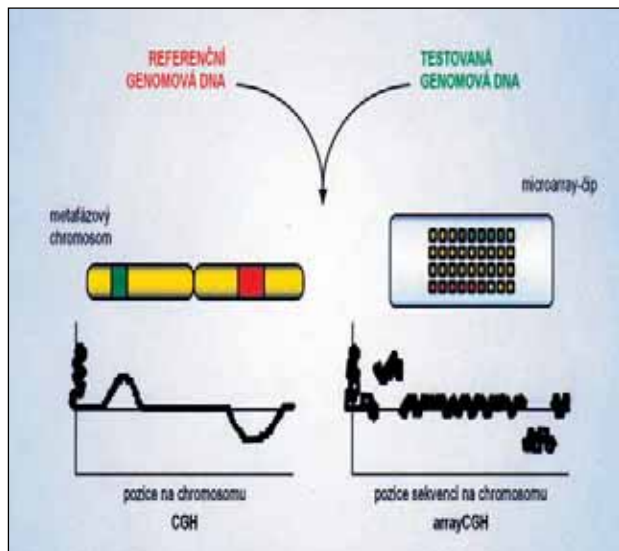
Úvod

Molekulárně cytogenetické metody představují revoluční a dnes již potvrzený způsob určování chromosomových změn. Jednou z takových technologií, která byla vyvinuta především pro vyšetřování nádorových buněk, je metoda komparativní genomové hybridizace (CGH). CGH (obr. č. 1) byla vyvinuta pro měření změn počtu kopií sekvencí DNA v celém genomu v jednom vyšetření (1, 2). Principem metody je komparativní neboli poměrná hybridizace dvou odlišně značených genomových DNA s normálními metafázovými chromosomy. Genomové DNA jsou izolovány ze dvou buněčných populací, normální a nádorové, a jsou značené rozdílnými fluorochromy, obvykle červeným a zeleným. Po skončení hybridizace jsou měřeny intenzity obou fluorescencí podél každého chromosomu a poměr intenzit červené a zelené fluorescence pak určuje relativní poměr počtu kopií ve vyšetřovaném genomu. Jedna z genomových DNA je vždy normální, označená

jako referenční, takže poměr přímo mapuje změny počtu kopií v testovaném genomu. Je důležité si uvědomit, že CGH samotná určuje pouze změny počtu kopií, ale ne absolutní počet kopií. Přesně tetraploidní buněčná populace bude tedy dávat konstantní poměr v genomu a bude nerozlišitelná od výsledku získaného z diploidní testované populace.

Metoda CGH má své omezené rozlišovací schopnosti a dovoluje určit nebalancované změny na chromosomech, které se pohybují od 3 megabází (Mb) pro ztráty genetického materiálu a 7–10 Mb pro určení přítomnosti nadbytečného genetického materiálu (3). Zvýšit citlivost metody, která v jediné hybridizační reakci dovoluje analyzovat celý nádorový genom, se podařilo zavedením metody array komparativní genomové hybridizace (array CGH). Cíl hybridizace, metafázové chromosomy metody CGH, byly nahrazeny fragmenty klonované DNA různých genů. Tyto fragmenty byly speciální technikou umístěny – tištěny na povrch skla, kde k nim referenční

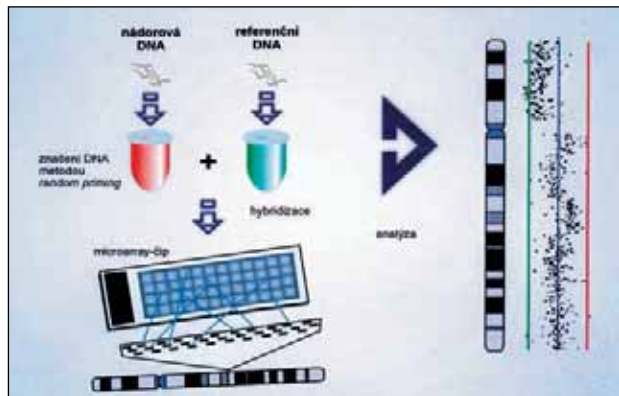
a zkoumaná DNA hybridizují. Každý fragment klonované genomové DNA zaujímá své přesně určené místo na povrchu skla. Takto připravené speciální sklo bylo označeno microarray neboli čip (obr. 1).



Obrázek č. 1: A. Komparativní genomová hybridizace (CGH). Princip metody CGH je založen na hybridizaci dvou rozdílně značených genomových DNA, které hybridizují s normálními chromosomy. Poměr fluorescenčních intenzit určuje oblasti na chromosomu, ve kterých došlo ke ztrátám nebo zmožnění genetického materiálu. B. Stejná hybridizace dvou rozdílně značených genomových DNA s DNA čipem. Počty kopií klonů na čipu jsou určeny poměrem naměřených intenzit fluorescence a jejich určení závisí také na velikosti klonů a jejich lokalizaci na chromosomu.

Princip metody array CGH

Technologie array CGH, také označována jako matrix CGH, byla zpočátku použita pro určení segmentálních změn – tj. změn, které se týkaly chromosomových oblastí o velikosti několika megabází, (Mb), a které byly lokalizované ve specifických chromosomových oblastech spojených s určitým onemocněním. Salinos-Toldo a spolupracovníci (4) použili microarray technologii k určení nebalancovaných chromosomových změn. V metodě CGH nahradili cíl hybridizace, metafázové chromosomy, microarray neboli čipem, který obsahoval klony s velkými inzerty (large insert clones – LIC) pokrývajícími chromosom 13q14 a další oblasti. Analýza řady buněčných linií a nádorového genomu v práci těchto autorů ukázala, že tento přístup dovoluje zvýšit citlivost metody CGH z 10 megabází (Mb) na 75–130 kilobází (kb).



Obrázek č. 2: Schematické znázornění principu array komparativní genomové hybridizace (detailní popis v textu).

Základním principem metody array CGH je hybridizace (Obr. č. 2). Vzorky normální a nádorové genomové DNA jsou pomocí molekulárně genetické metody random priming PCR ozna-

čeny rozdílnými fluorochromy a takto rozdílně značené DNA hybridizují s čipem obsahujícím fragmenty genomové DNA vybraných genů. Výsledek hybridizace je hodnocen pomocí speciálního přístroje, umožňující měření intenzity fluorescence hybridizované normální a nádorové DNA. Rozdíl v poměru intenzity červené a zelené fluorescence určuje nebalancované změny v nádorovém genomu. Pro vyhodnocení výsledků hybridizace se používají speciální programy zabudované přímo v čtecím zařízení a statistické vyhodnocení je prováděno pomocí dalších samostatných softwarových nástrojů.

Array CGH slouží ke zvýšení přesnosti, rozlišení a rozsahu změn ve srovnání s klasickou metodou CGH a měření může být porovnáno přímo k pozici genomové sekvence (5).

Čip pro array CGH je připraven z mapovaných BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) a dalších genomových klonů nebo jsou na hybridizačním skle umístěny fragmenty komplementární DNA genů (cDNA) a nebo oligonukleotidy. V případě použití BAC array, vyžaduje hybridizační reakce několik stovek nanogramů genomové DNA, ale více jak jeden mikrogram DNA je potřebný pro cDNA array a některé specifické BAC čipy (6, 7). Jednotlivé typy čipů mají své přednosti, ale i svá omezení. Například, vyšší rozlišení je dosaženo použitím oligonukleotidových čipů, které jsou připraveny technikou spotování na sklo (8) nebo přímou syntézou na sklo nebo silikonové substráty (9), které obsahují více jak 500 000 elementů. Čipy pro určení nukleotidového polymorfismu (Single nucleotide polymorphism array-SNP) jsou vysoce citlivé čipy dovolující určit i ztrátu heterozygotizace jednotlivých nukleotidů i změny počtu kopií (10). SNP čipové sondy jsou sestavené z 25-merových oligonukleotidů a každý SNP má jak sense tak antisense řetězec. Intenzita sondy tak odpovídá dvěma alelám a umožňuje tak určit celkem tři genotypy – AA, BB nebo AB. Na rozdíl od BAC čipu hybridizuje k SNP čipu pouze jedna genomová DNA a změny počtu kopií jsou určeny na základě srovnání s nezávislou předchozí kontrolní hybridizací. Pomocí tohoto přístupu například Raghavan a spol. (10) určili velkou oblast vykazující uniparentální disomii u nemocných s leukémií, kteří měli normální karyotyp. Tento náález měl velký vliv na pochopení genových změn u leukémií a ukázal, že SNP čipy budou mít významné místo také při určování změn v nádorovém genomu.

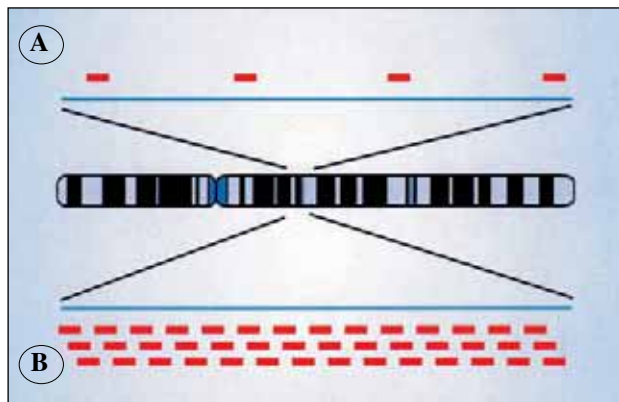
Další možností je použití tzv. long oligonucleotide array. Metoda, která je označena jako ROMA – representational oligonucleotide microarray analysis, představuje přístup, ve kterém je genomová DNA rozštěpena pomocí restričního enzymu, nejčastěji BglII, který je následován linker-mediated polymerázovou řetězovou reakcí, a výsledkem jsou fragmenty o délce menší jak 1,2 kilobáze (kb). Tento přístup dovoluje určení změn, které jsou menší jak jedna megabáze (8).

Tiling array

Přesto, že je možné konstruovat čipy s různým počtem klonovaných DNA v jednotlivých chromosomových oblastech, je výběr četnosti klonů velmi individuální. Může totiž vést k tomu, že některé oblasti zůstanou nepokryté. Pro úplné porozumění významu nebalancovaných změn v nádorovém genomu potřebujeme takové čipy, které skutečně pokrývají celý genom.

Ishkanian a spol. (11) dosud jako jediní, sestavili čip pro array CGH pokrývající skutečně celý genom (Obr. 3). Toto tzv. sub-megabázové rozlišení, sestavené ze sady překrývajících se klonů, bylo označeno „SMRT“ (Submegabase resolution tiling set). Tento čip je tvořen celkem 32 433 překrývajícími se BAC klony, které jsou naspotovány v triplicátech na celkem dvě hybridizační skla. Významem těchto citlivých konstrukcí tkví v tom, že takovým čipem mohou být detekovány mikrozmeny, které při použití jiných čipů zůstanou neodhalené. Avšak takové vysoké rozlišení má svá úskalí. Tento čip, na rozdíl od jiných s menším rozlišením, obsahuje i klony, které hybridiz-

zují s vysoce homologními sekvencemi v genomu, a proto je vyhodnocení takových čipů velmi náročné a vyžaduje značné znalosti a zkušenosti.



Obrázek č. 3: Znáornění možností volby klonů pro konstrukci čipu. A – Rozlišení čipu je dáno počtem a vzdáleností jednotlivých vybraných klonů v daných oblastech. B – Příklad volby klonů pro konstrukci tzv. tiling array, ve kterém se jednotlivé klony vzájemně překrývají.

Požadavky na kvalitu a kvantitu DNA

Pro získání kvalitních a validních výsledků je při použití metody array CGH zapotřebí dodržet dnes již přesně stanovené podmínky každé hybridizace. Významným faktorem, ovlivňujícím již na počátku výsledek hybridizace, je kvalita a kvantita vyšetřované DNA. Problémy se získáním potřebného množství DNA se mohou objevit především u materiálu získaného z malých biopsií, zatímco problém s kvalitou se může objevit u formalinem fixovaných tkání nebo u parafinových řezů. Dnes již víme, že tzv. „large insert“, klony s velikostí kolem 150 kb, jsou poměrně citlivé a hybridizace je úspěšná i při použití méně kvalitní DNA. To však neplatí pro oligonukleotidové čipy a čipy tvořené malými PCR fragmenty. Většina BAC čipů vyžaduje pro hybridizaci 200–400 ng DNA, zatím co oligonukleotidové a cDNA čipy vyžadují až 1 mikrogram vysoce kvalitní DNA.

Další limitací pro array CGH je heterogenita tkáně (12). Nádorové buňky v nádorovém vzorku vedou k posunu v poměru signálů spojených s genetickými změnami v nádorových buňkách. Garnis a spol. (13) napodobili tento fenomén experimentálně a potvrdili, stejně jako Davies a spol. (14), že pravděpodobnost určení změn určité velikosti není závislá jen na počtu klonů přítomných na čipu, ale také na jejich velikosti. Větší klony jsou identifikovány s větší pravděpodobností než klony malé.

Důležitý je také vhodný výběr referenční DNA. Používá se DNA jak od jedince opačného pohlaví, tak stejného pohlaví. Referenční DNA je směsí DNA různých jedinců nebo jde o DNA pouze jednoho jedince. Výběr závisí také na zkušenosti laboratoře.

Analýzy dat získaných metodou array CGH

Rychlý rozvoj metody array CGH vedl k vyvinutí řady softwarových systémů pro statistické hodnocení a vizualizaci dat. Prvním krokem vizualizace je konverze obrazových dat získaných z příslušného čtecího zařízení do číselného vyjádření lokus-specifického poměru počtu kopií. Program, který to umožňuje, je součástí softwarového vybavení řady skenerů. Druhým krokem je přiřazení elementů naspotovaných na čipu k jejich pozici v genomu. Speciální program dokáže na základě informace o sekvenci jednotlivých BAC klonů určit jejich vztah k lidskému genomu. Každý klon zastoupený na čipu je pak přesně graficky lokalizován na své genomové místo (obr. 2).

Určení nebalancovaných změn vyžaduje statistické vyhodnocení získaných dat. Programy vhodné k tomuto účelu jsou jak volně dostupné, tak je možné je zakoupit od specializovaných softwarových firem. Avšak použití softwarových programů

vyžaduje v praxi velmi dobrou znalost jejich principu. Neznalost by mohla vést k nesprávnému použití a interpretaci výsledků. Příkladem volně dostupných programů, které jsou schopné hodnotit jednotlivé experimenty, jsou např. ArrayCyCHt (genomics.catholic.ac.kr/arrayCGH), Caryoscope (caryoscope.stanford.edu/ a nebo SeeGH (www.ArrayCGH.ca) (15). Sofistikovanější programy, které dovolují vyhodnotit více experimentů, jsou např. CGHPro (http://www.molgen.mpg.de/~abtro/molecular cytogenetics/ArrayCGH/CGHPRO) nebo CGHAnalyzer (http://guanine.genomics.upenn.edu/people/faculty/weberb/douwnloads.htm cgh/html/).

Pro vlastní vyhodnocení výsledku hybridizace je nutné znát také aktuální informace o polymorfismech v lidském genomu a tyto informace využít při hodnocení výsledků (15).

Určování změn v nádorovém genomu metodou array CGH

V posledních 5 letech byla publikována řada studií využívajících metody array CGH pro určování změn počtu kopií zaměřených na specifické oblasti, o kterých bylo známo, že jsou často zahrnuté do nebalancovaných aberací. Například byl zkonstruován čip pro chromosom 3p tvořený 535 BAC klony a byl použit pro definování často deletovaných a amplifikovaných oblastí u nádorů dutiny ústní (16) a nádorů plic (17) nebo 5p čip s 491 BAC klony pokrývajících 50 Mb na chromosomu 5p (18) a čip pro chromosom 1p s celkem 642 BAC klony pokrývajících 120 Mb, zase pomohl při objevu genů podílejících se na tumorigenезě plic (19).

Význam použití čipů s vysokým rozlišením byl potvrzen na studiích provedených u lymfomu pláštěvé zóny (MCL), který je charakterizován translokací t(11;14)(q13;q32). Tato změna je příčinou zvýšené exprese cyklinu D1. Pro maligní transformaci jsou nutné přidatné genetické změny. Tyto změny a jejich frekvence byly studovány metodou array CGH s různými typy čipů. Kohlhammer a spol. (20) použili čip s rozlišením 15 Mb a detekovali průměrně 6,7 změn na jeden vyšetřený případ MCL. Určili tak o 50 % více změn, než bylo určeno klasickou metodou CGH. V této práci bylo určeno celkem 6 oblastí s kandidátními geny, které jsou cílem dalších výzkumů. Ve studii Schraderse a spol. (21) byl u MCL použit čip s rozlišením 800 kb a bylo určeno 15,4 změn na jeden případ a celkem 15 oblastí s kandidátními geny. Další významná data byla získána ze studie de Leeuw a spol. (22). Analýza buněčné linie MCL s použitím SMRT čipu dovolila určit v průměru 35 změn v genomu se stejným množstvím jak ztrát genetického materiálu, tak zmnožení, a potvrdila opakující se změny menší jak 130 kb (22). Ačkoliv byla tato studie provedena na buněčné línii, kde některé změny mohou souviset s kulturačními artefakty, detekci celkem 35 změn je možné považovat za velmi významnou. Navíc byly některé změny submegabázové velikosti a zahrnovaly pouze 1–2 kandidátní geny. Použitím tohoto velmi citlivého čipu se ukázalo, že delece na chromosomu 8p21, u které určili Kohlhammer a spol. (20) velikost 2,4 Mb, je ve skutečnosti delece o velikosti 730 kb a zahrnuje tři kandidátní tumor supresorové geny, jako např. TNFRSF10B – gen tumor necrosis factor.

Použití metody array CGH s čipy s vysokým rozlišením přináší významné informace o kandidátních genech, které jsou zahrnuty do patogenezе onemocnění. Právě použití citlivých čipů dává možnost odhalit a následně analyzovat malé oblasti v genomu. Příkladem je trisomie chromosomu 12 u MCL. Ve studii de Leeuw a spol. (22) se ukázalo, že nejde o kompletní trisomii chromosomu 12, ale bylo objeveno 6 oblastí na chromosomu 12, které byly duplikované na krátkém i dlouhém rameni chromosomu 12, přičemž jedna duplikace z nich byla menší jak 370 kb a obsahovala pouze 2 geny. To je důkaz, že se vzrůstající rozlišovací schopností array CGH technologií vzrůstá také pravděpodobnost snadnějšího odhalení dosud neznámých nádorových genů.

Genetické změny spojené s progresí nádorů

Použití array CGH technologií přispělo také k porozumění některým změnám, které pozorujeme v době progresu onemocnění. Martinez-Climent a spol. (23) použili čip s 2400 klonů s rozlišením 1,4 Mb pro studium změn buněčné linie folikulárního lymfomu (FL) a několika pacientů s transformací FL do velkobuněčného B lymfomu (DLBCL). Genomový profil byl porovnán s jejich expresním profilem a bylo potvrzeno, že transformace je provázána vznikem dalších genomových změn a změna exprese řady genů odpovídala jejich genomovým změnám.

Jiná studie byla zaměřena na určení genetických změn v souvislosti s progresí premaligního stádia nádoru do plně maligní formy. Weiss a spol. (24) studovali metodou array CGH hyperplastické polypy žaludku a žaludeční adenomy a výsledkem srovnání bylo zjištění, že existují pravděpodobně dvě rozdílné patogenetické cesty vzniku nádorů žaludku.

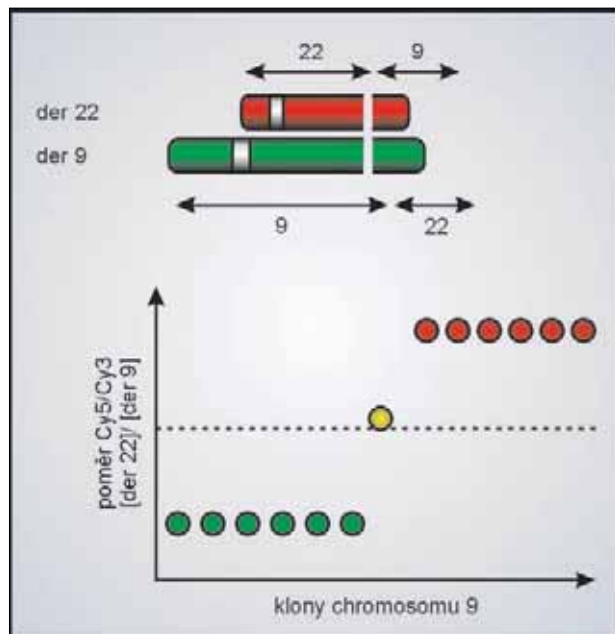
Výsledky práce Nyante a spol. (25) u nádorů prsu ukázaly, že na základě nebalancovaných změn můžeme odlišit podtypy nádorů prsních s odlišným klinickým průběhem.

Všechny tyto studie ukázaly, že pozdější nádorová stádia jsou charakterizována vyšším výskytem změn ve srovnání s jejich předchozími stádii. Předpokládá se, že právě tyto přídavné změny jsou odpovědné za progresi onemocnění. Tyto nálezy mohou také přinést důležité prognostické informace o budoucím klinickém chování onemocnění. Například, korelace array CGH výsledků s klinickým průběhem onemocnění u lymfomu plášťové zóny (MCL) ukázala, že delece na chromosomech 8p a 13q14 je vždy spojena se špatnou prognózou onemocnění (20).

Čipová technologie pro určení translokací

Metoda array CGH dovoluje určit změny počtu kopií sekvenčí DNA. Nedovoluje určit chromosomové změny typu inverze a balancované translokace, ve kterých nedochází ke změně počtu kopií. Pro určení balancovaných změn byla vyvinuta modifikace metody array CGH a byla označena array painting (26). Array painting využívá průtokové cytometrie k sortování a separaci abnormálních chromosomů, které jsou výsledkem translokace nebo inverze, pomocí změny velikosti a poměru párů bází. Následuje izolace DNA z těchto abnormálních chromosomů. DNA obou aberantních chromosomů jsou označeny rozdílnými fluorochromy a hybridizují s čipem. V případě balancované translokace rozdílně značené DNA dvou derivovaných chromosomů ukazují sekvence, které jsou pro-

ximálně vzhledem ke zlomu značené jednou barvou, zatímco sekvence, které jsou distálně ke zlomu, jsou značeny jinou barvou (Obr. 4). Kombinací metod array CGH a array painting je možné stanovit jak změny počtu kopií DNA, tak balancované translokace.



Obrázek č. 4: Schematické znázornění principu metody paintig array (detailní popis v textu).

Závěr

V této práci jsme se zaměřili na molekulární cytogenetickou metodu array CGH dovolující určení změn počtu kopií sekvenčí DNA, na její princip a význam u nádorů. Změny počtu kopií DNA jsou jedním z mnoha mechanismů, které se mohou podílet na změně exprese genů, která vede ke vzniku nádoru. Využití této technologie pro studium změn nádorového genomu je příslibem významného pokroku v určení nádorových genů. Jejich následné analýza přinese nové informace o jejich roli a podílu na vzniku a vývoji nádorů a jejich možné cílené léčbě.

Práce je podporována grantem MŠM 6198959205.

Literatura:

- Kallioniemi A., Kallioniemi OP., Sidar D. et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 1992, 818-821.
- Du Manoir S., Speicher MR., Joos S. et al.: Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic hybridization. *Human Genet* 90, 1993, 590-610.
- Lichter P., Joos S., Bentz M. et al.: Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol* 37, 2000, 348-357.
- Solinas-Toldo S., Lampel S., Stilgenbauer S. et al.: Matrix-based comparative genomic hybridization biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 1997, 399-407.
- Pinkel D., Seagraves R., Sudar D. et al.: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 1998, 207-211.
- Pollack JR., Perou CM., Elizadeh AA. et al.: Genome-wide analysis of DNA copy number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23, 1999, 41-46.
- Carvalho B., Ouwerkerk E., Meijer GA., Ylstra B.: High resolution microarray comparative genomic hybridization analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 57, 2004, 644-646.
- Lucito R., Healy J., Alexander J. et al.: Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res* 13, 2003, 2291-2305.
- Zhou X., Cheng Li J., Paez G., et al.: An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism array. *Cancer Res* 64, 2004, 3060-3071.
- Raghavan M., Lillington DM., Skoulakis S. et al.: Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65, 2005, 375-378.
- Ishkanian S., Malloff CA., Watson SK. et al.: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of human genome. *Nat Genet* 36, 2004, 299-303.
- Pettus JA., Cowley BC., Maxwell T. et al.: Multiple abnormalities detected by dye reversal genomic microarrays in prostate cancer: a much greater sensitivity than conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 154, 2004, 110-118.
- Garnis C., Rosin MP., Zhang L., Lam WL.: Comparing canonical non-small cell lung squamous and adenocarcinoma model genomes. *Int J Cancer* 116(5), 2005, 813-819.
- Davies JJ., Wilson IM., Lam WL.: Array CGH technologies and their applications to cancer genom. *Chromosome Research*, 13, 2005, 237-248.
- Lockwood WW., Chari R., Chi B., Lam WL.: Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *E J Human Genetics*, 14, 2005, 139-148.
- Garnis C., Baldwin C., Zhang L. et al.: Use of complete coverage array

- comparative genomic hybridization to define copy number alteration on chromosome 3p in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 63, 2003, 8582-8585.
17. Garnis C., Campbell J., Davies JJ. et al.: Involvement of multiple developmental genes on chromosome 1p in lung tumorigenesis. *Hum Mol Genet*, 14, 2005, 475-482.
 18. Coe BP., Henderson LJ., Garnis C. et al.: High-resolution chromosome arm 5p array CGH analysis of small cell lung carcinoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 42, 2005, 308-313.
 19. Henderson LJ, Coe BP., Lee EH. et al.: Genomic and gene expression profiling of minute alteration of chromosome arm 1p in small cell lung carcinoma cell. *Br J Cancer* 92, 2005, 1553-1560.
 20. Kohlhammer H., Schaenen C., Wessendorf S. et al.: Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood*, 104, 2004, 795-801.
 21. Schraders M., Pfund R., Straatman HM. et al.: Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood*, 105, 2004, 686-1693.
 22. de Leeuw RJ., Davies JJ., Rosenwald A. et al.: Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet* 13, 2004, 1827-1837.
 23. Martinez-Climent JA., Alizadeh AA., Seagraves R. et al.: Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 101, 2003, 3109-3117.
 24. Weiss MM., Kuipers EJ., Postma C. et al.: Genome wide comparative genomic hybridization analysis of premalignant lesions of the stomach. *Mol Pathol* 56, 2003, 293-298.
 25. Nyante SJ., Devries S., Chen YY. et al.: Array-based comparative genomic hybridization of ductal carcinoma *in situ* and synchronous invasive lobular cancer. *Hum Pathol.* 35, 2004, 759-763.
 26. Fiegler H, Gribble SM., Burford DC. et al.: Array painting: a method for a rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 40, 2003, 664-670.