

설편평상피암에 있어서의 고밀도 SNP Genotyping 어레이를 이용한 전체놈복제수와 헤테로접합성 소실의 분석

黑岩 司·山本信治·恩田健志·別所央城·藥師寺 孝·片倉 朗·野伸夫·柴原孝彦

동경치과대학 구강외과학과

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011;37:550-5)

Analysis of copy number abnormality (CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma

Kuroiwa Tsukasa, Yamamoto Nobuharu, Onda Takeshi, Bessyo Hiroki,
Yakushiji Takashi, Katakura Akira, Takano Nobuo, Shibahara Takahiko

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Dental College

Chromosomal loss of heterozygosity (LOH) is a common mechanism for the inactivation of tumor suppressor genes in human epithelial cancers. LOH patterns can be generated through allelotyping using polymorphic microsatellite markers; however, owing to the limited number of available microsatellite markers and the requirement for large amounts of DNA, only a modest number of microsatellite markers can be screened. Hybridization to single nucleotide polymorphism (SNP) arrays using Affymetrix GeneChip Mapping 10 K 2.0 Array is an efficient method to detect genome-wide cancer LOH. We determined the presence of LOH in oral SCCs using these arrays. DNA was extracted from tissue samples obtained from 10 patients with tongue SCCs who presented at the Hospital of Tokyo Dental College. We examined the presence of LOH in 3 of the 10 patients using these arrays. At the locus that had LOH, we examined the presence of LOH using microsatellite markers. LOH analysis using Affymetrix GeneChip Mapping 10K Array showed LOH in all patients at the 1q31.1. The LOH regions were detected and demarcated by the copy number 1 with the series of three SNP probes. LOH analysis of 1q31.1 using microsatellite markers (D1S1189, D1S2151, D1S2595) showed LOH in all 10 patients (100). Our data may suggest that a putative tumor suppressor gene is located at the 1q31.1 region. Inactivation of such a gene may play a role in tongue tumorigenesis.

Key words: Tongue squamous cell carcinoma, Loss of heterozygosity, Copy number abnormality, Single nucleotide polymorphism, tumor suppressor gene

I. 제 언

발암의 탐색은 게놈 복제수의 이상(copy number abnormality, CNA)이나 헤테로접합성 소실(loss of heterozygosity, LOH) 등 세포 자체가 억제 불능상태로 무질서하게 증식하는 원인인 유전자 변화의 검출로부터 시작된다. 대부분의 암의 경우, 이러한 변화는 암화를 촉진하는 암유전자의 활성화 혹은 암억제 유전자의 비활성화에 의해서 발생한다. 이러한 유전자의 복제수 측정법은 지금까지 비교적 큰 영

역에 대한 comparative genomic hybridization (CGH)에 한정되었기 때문에 작은 결실이나 증폭의 검출은 어려운 실정이었다. LOH 해석 또한 비교적 소수의 마이크로 새틀라이트 마커의 제노타이핑에 한정되어 있었다.

최근 대규모 단일염기다형(single nucleotide polymorphism, SNP) 타이핑용으로 개발된 고밀도 올리고 뉴클레오티드(GeneChip Mapping 10 K Array, Affymetrix)가 개발되어 암 세포 게놈에 발생하는 다양한 변화를 총체적으로 해석 가능한 어레이로서 주목받고 있다¹. 우리는 지금까지 구강편평상피암의 발생 과정에 대해 제2번^{2,4}, 3번^{5,6}, 21번^{7,8} 염색체상의 결실상황을 LOH법 이용을 통해 대립유전자 불균형의 해석을 실행해 왔다. 그 결과 40증례의 구강편평상피암환자로부터 2 q에서 2개소, 3 p에서 3개소, 21 q에서 4개소에 공통 결실영역의 동정을 명확히 함으로써 이러한 염색체 좌위에는 이 종양의 발생에 관여하는 중요한 암억

柴原 孝彦

동경치과대학 구강외과학과

Shibahara Takahiko

Department of Oral and Maxillo-Facial Surgery, Tokyo Dental College 5-2-

14-605 Inagekitaan, Mihama-ku, Chiba 261-0005, Japan

TEL: +81-43-247-1902 FAX: +81-43-247-1902

E-mail: tkuroiwa@m7.gyao.ne.jp

*본 논문은 일본구강외과학회지 2008년 54권 5호에 게재되었으며 한일 논문교류 목적으로 이차출판하기로 상호간 허용되었음.

제 유전자가 존재하고 있음을 시사하였다.

GeneChip Mapping 10K Array를 이용한 DNA mapping array 해석은 유방암⁹⁻¹³, 방광암^{14,15}, 전립선암^{16,17}, 골육종¹⁸, 폐암^{10,19,20} 등에 그 유용성이 보고되었지만 구강암을 대상으로 한 연구는 거의 이뤄지지 않았다. 이런 연유로 이 연구는 GeneChip Mapping 10K Array를 이용하여 구강암에서 빈도가 높은 설편평상피암을 대상으로 전 게놈상의 CNA와 LOH에 대하여 검토하였다.

II. 대상증례 및 연구방법

2004년부터 2006년까지 2년간 동경치과대학 치바병원 구강외과의 검진을 통해 설편평상피암으로 진단받은 28명 중, 시료 채취가 가능한 10명의 환자를 대상으로 하였다.(Table 1) 또한 이번 연구는 본 대학의 윤리 위원회의 승인을 받은 후, 모든 증례에 환자 본인 및 환자 가족을 대상으로 동의를 받아 실행하였다. 검체는 수술 시(모든 증례에서 화학요법·방사선요법등의 수술 전 치료는 실시하지 않았다) 또는 생검 시에 채취한 원발 종양조직 10검체와 대응하는 정상 DNA로 동일 환자의 말초 정맥혈(약 10 mL)을 이용하였다. 절제 조직을 2개로 나누어, 한 쪽은 종양 조직으로부터 정상 조직을 신중히 절제한 후 즉시 동결하여 DNA 추출까지 -80°C에 보존하였다. 다른 한편은 10% 포르말린으로 고정하여 병리 조직진단을 실시하였다. 병리 조직학적 진단은 국제종양분류에 준하여 동경치과대학 병리학교실이 실시하였다²¹. 임상 병리학적 stage 평가는 UICC TNM Stage 평가 시스템을 기준으로 하였다²².

DNA의 추출법 병리 조직학 검사를 통해 모든 환자는 설편평상피암인 것으로 확인되어 DNA 추출을 위한 종양 검체는 80% 이상 종양으로 구성된 것을 확인하였다. 채취된 종양 조직, 혈액은 즉시 액체 질소에 보존하여 신선 동결표본으로 가공·조정하였다. 우선 조직을 액체 질소에서 분쇄한 다음, 게놈 DNA를 TNES buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)·150 mM NaCl·10 mM EDTA·0.1% SDS) 1,000 µL에

proteinase K (100 µg/mL)를 30 µL 더해 교반·분해하여 50°C의 온욕조에서 하룻밤 소화하였다. 페놀·클로로포름 추출법에 의해 추출·정제한 후 에탄올 침전법으로 세정·농축하였다.

이에 대응하는 정상 DNA는 말초 정맥혈로부터 채취한 후, Dr. GenTLE (TakaraBIO Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 농도를 분광 광도계 (spectrophotometer)로 측정하여 각 DNA 샘플을 50 ng/µL의 농도로 조정하여 -80°C에서 동결 보존하였다.

1. GeneChip Mapping 10 K Array를 이용한 DNA Mapping array해석

설편평상피암 10증례 중 3증례(증례 1, 2, 3)에 대해 GeneChip Mapping 10 K Array를 이용한 DNA Mapping array해석을 실시하였다. SNP Genotyping 어레이를 이용한 게놈 복제수의 원리와 개략을 Fig. 1에 제시한다.

Affymetrix Single Primer Assay 프로토콜에 따라 전 게놈 DNA (250 ng)를 제한 효소 Xba I (New England Biolabs) 10 unit로 37°C, 2시간 소화하였다. 그 다음 70°C로 20분간 가열 처리한 후, 소화 산물을 standard ligation buffer (New England Biolabs)에서 아답터(0.25 µM)를 DNAligase (New England Biolabs)에 의한 라이게이션 반응을 실행하였다. 반응후의 샘플에 대해 70°C, 20분 간의 조건으로 열 실행 처리한 후, 라이게이션 반응 산물을 주형으로 한 PCR 반응으로 타겟 DNA의 증폭을 실행하였다. 반응액은 0.75 µM의 프라이머, 2.5 mM MgCl₂·250 µM dNTP·10 unit AmpliTag Gold (Applied Biosystems)으로 조성하였다. PCR의 조건은 최초 95°C, 3분간의 열변성을 실시한 후, 95°C 30초간, 59°C 30초간, 72°C 30초간을 35 사이클 반복한 후, 마지막에 72°C, 7분간의 조건으로 신장 반응을 실행하였다. PCR 증폭 반응액을 2%TBE 아가로스 겔상에서 120 V, 1시간의 조건으로 전기 영동하였다. 그리고 샘플을 0.24 unit의 Fragmentation Reagent (Affymetrix)으로 37°C, 30분간 소화

Table 1. Summary of clinicopathological features in 10 SCCs

Case	Gender	Age	Region	T	N	Stage	Differentiation	Mode of invasion	pN	Final
1	M	41	Tongue	3	2b	IV	Well	4C	-	Alive
2	M	58	Tongue	1	1	III	Well	3	+	Alive
3	M	63	Tongue	1	0	I	Well	4C	/	Alive
4	M	33	Tongue	1	0	I	Well	4C	+	Alive
5	F	60	Tongue	4	2c	IV	Well	4C	+	Alive
6	F	63	Tongue	2	1	III	Well	1	-	Alive
7	M	42	Tongue	1	0	I	Poor	4C	/	Alive
8	M	68	Tongue	1	0	I	Well	4C	+	Died
9	M	56	Tongue	2	0	II	Well	4C	+	Alive
10	M	38	Tongue	1	0	I	Poor	4C	/	Alive

(M, Male; F, Female; pN, pathological Node; Well, well differentiated; Poor, poorly differentiated)

Kuroiwa Tsukasa et al: Analysis of copy number abnormality (CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

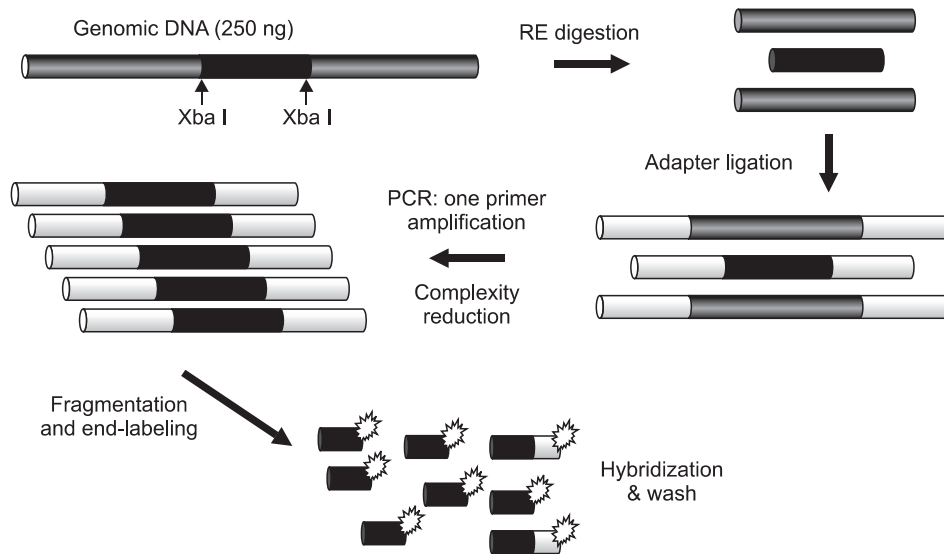


Fig. 1. DNA labeling, hybridization, washing and staining of the Affymetrix 10K SNP Mapping Array were performed according to the standard Single Primer GeneChip Mapping 10K Assay protocol (Affymetrix). The array was scanned with a GeneChip Scanner 3000, and the scanned array images were processed with GeneChip Operating software. Kuroiwa Tsukasa et al: Analysis of copy number abnormality (CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

Table 2. Microsatellite markers used in our LOH study

Markers	Locations	Size of PCR products (bp)	Sequence of primers
DIS1189	1q31.1	341	5'-CTGAACCTAACACGGAGAAAC-3' 5'-GTAGACTGTAAAAGAAGAGC-3'
DIS2151	1q31.1	260	5'-CTGTATAAAGAGCGCTGTGGG-3' 5'-GGATGGGGCAGTGAGAAG-3'
DIS2595	1q31.1	102	5'-GGGCGTCCAATACTTAGAGG-3' 5'-AGGACACCACAAGTCCAGG-3'

(LOH: loss of heterozygosity)

Kuroiwa Tsukasa et al: Analysis of copy number abnormality (CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

한 후, 95°C, 15분간의 조건으로 열실활 처리를 실행하였다. 4%TBE 아가로스 겔상에서 120 V, 30분-1시간의 조건으로 전기영동한 후, 하이브리다이제이션 믹스 190 µL (0.056 M MES buffer·5.0%DMSO·2.5×Denhardt's Solution·5.77 mM EDTA·0.115 mg/mL HSDNA·1×origo-nucleotide control [Affymetrix]·Human Cot-1 [11.5 µg/mL]·0.0115%Tween-20·2.69 M TMACL)으로 라벨화한 타겟 DNA를 혼합하여 하이브리다이제이션 카테일을 조제 후, 95°C, 15분간의 조건으로 열 변성시켜 마이크로 어레이 카트리지에 주입, 45°C, 16-18시간의 조건으로 인큐베이션하였다. 마지막으로 어레이상에서 10 µg/mL의 Streptavidin phycoerythrin과 반응시켜 non-stringent wash buffer로 세정한 후, 5 µg/mL의 비오틴화 Streptavidin 항체와 인큐베이션하여, non-stringent wash buffer로 세정하였다. Gene Chip Mapping 10 K 2.0 Array에 의한 스캔 이미지는 Affymetrix Genotyping Tools software을 이용하여 해석하였고²³, 복제수 0.8-1.2를 LOH 영역으로 판정하였다^{24,25}.

2. PCR 및 마이크로 새틀라이트 해석법

GeneChip Mapping 10 K 2.0 Array를 이용한 DNA 매핑

어레이 해석을 통해 CNA로 분류된 마이크로 새틀라이트 영역(Table 2)을 PCR-LOH 해석을 이용하여 10중례 전체를 검증하였다. PCR 및 전기 영동, 밴드 염색은 본 강좌가 이전부터 실행해 온 방식에 준하여 실시하였다⁴.

LOH가 인정된 각 증례의 결과에 재현성이 있음을 확인하기 위해, 다시 한 번 PCR 마이크로 새틀라이트 분석을 실시하였다.

3. 헤테로접합성소실의 평가법

획득한 마이크로 새틀라이트 밴드를 컴퓨터상에 스캔한 후 NIH image (version 1.62)에 의해 그 강도를 수치화하였다. 종양 DNA의 시그널 강도를 대응되는 정상 DNA와 비교하여 시그널 강도가 50% 이하를 LOH로 판정하였다.

III. 결 과

1. GeneChipMapping 10 K Array를 이용한 DNA 매핑 어레이 해석의 평가

설편평상피암환자 10중례 중 3중례(증례 1, 2, 3)에 대

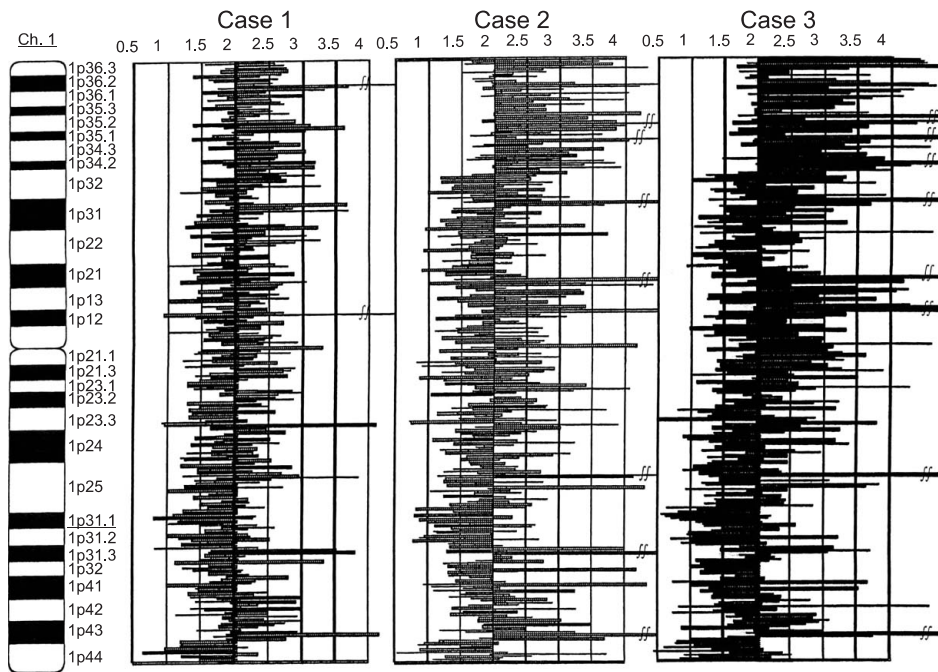


Fig. 2. Analysis of copy number abnormality (CNA) on 1q31.1 region. Physical positions of each SNP probe are shown at the vertical axis. The copy number of each SNP probe is shown at the horizontal axis. In the region of 1q31.1, genome copy numbers from 0.8 to 1.2 were confirmed for continual SNP probes in all of the 3 cases.

Kuroiwa Tsukasa et al: Analysis of copy number abnormality (CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

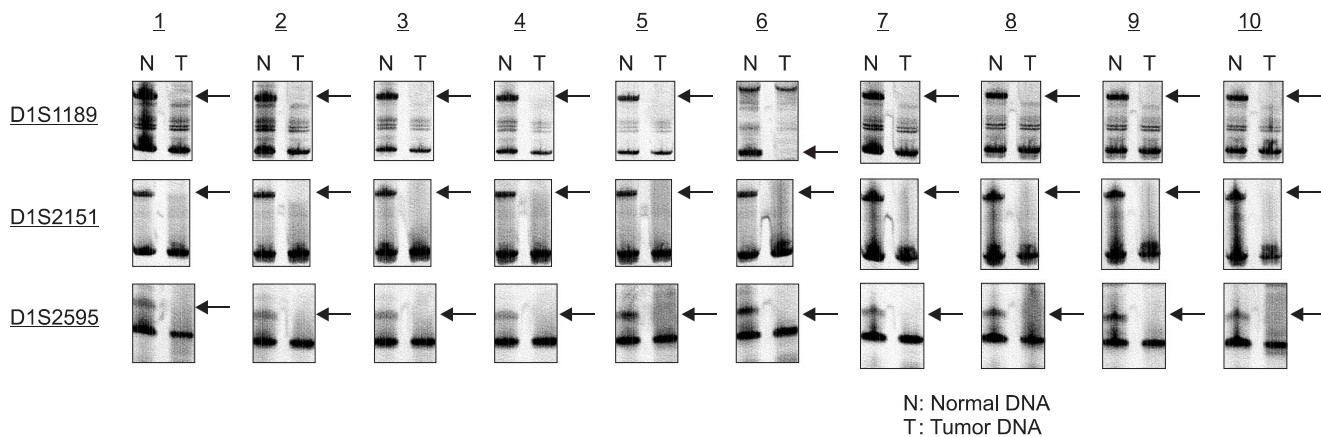


Fig. 3. Analysis of LOH using microsatellite markers (D1S1189, D1S2151, D1S2595). Case numbers are shown at the top and locus symbols on the left. Paired normal (N) and tumor (T) samples for all of 10 patients demonstrating loss of the upper allele (LOH).

Kuroiwa Tsukasa et al: Analysis of copy number abnormality (CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

하여 GeneChip Mapping 10 K Array를 이용한 전염색체 상의 DNA 매핑 어레이 해석을 실시, CNA와 LOH의 유무에 대해 검토하였다. 그 결과, 3종래 모두 1 q31. 1 영역 (D1S1189, D1S2151, D1S2595)에 게놈 복제수 0.8-1.2의 연속이 3개의 SNP 프로브로부터 인정되어 CNA와 LOH를 나타내는 염색체 영역이 동정되었다.(Fig. 2)

2. LOH의 평가

DNA 매핑 어레이 해석에 있어 CNA와 LOH가 동정된 1 q31. 1 영역(D1S1189, D1S2151, D1S2595)에 대하여

PCR-LOH법을 이용하여 10종래 전체를 검증하였다. 그 결과, 3 마커 모두 10종래 전체(100%)에 LOH가 인정되었다. Fig. 3에 LOH 해석 결과를 표시하였다.

IV. 고 찰

본 강좌에서는 지금까지 구강편평표피암을 대상으로 한 LOH 해석을 실행하여 구강편평표피암의 발생 및 진전에 관여하는 미확인 암억제 유전자의 후보좌위의 국재를 규명해 왔다²⁶. 그러나, 종래의 LOH법을 이용한 염색체 분석은 숫자와 부위의 염색체 이상 영역의 동정에 한정되어 전염

Table 3. Reports of copy number abnormality (CAN) using single nucleotide polymorphism (SNP)

	Reporters	Regions
Breast cancer	Wang, et al. ¹²	10q23-24, 11q23-24, 13q14, 14q32, 16q23-24, 17p13, 17q11.2-12, 17q21
Bladder cancer	Primdahl, et al. ¹⁴	Ch6, 8, 9, 11, 17
Prostate cancer	Hoque, et al. ¹⁵	1p, 2q, 12q, 16p
	Lieberfarb, et al. ¹⁶ Dumur, et al. ¹⁷	1p33-34, 3q27, 8p21, 10q23, 15q12, 16q23-24, 17p13 1p31.2, 3p12.1-22.1, 6p25.1-25.3, 8p22-23.2, 10q11.21, 10q22.1, 11q22.1-24.2, 12p13.1, 16p23.1-23.2, 17p13.3, 17q21.31, 19q13.12-13.42
Osteosarcoma	Wong, et al. ¹⁸	6q12-13, 6q14-27
Lung cancer	Lindblad-Toh, et al. ¹⁹	3p, 4q, 5q, 13q, 15q, 16q, 22q
	Jänne, et al. ²⁰	2p24.1, 2p22.2, 2p15, 2p12, 4q28.2, 6q22.31-23.1, 7q31.2, 7q31.31, 7q36.2, 8p12, 11p14.1, 11p12, 15q26.3, 16q11.1-11.2
Oral SCC-derived cell lines	Zhou, et al. ²³	3p35.3, 11q13.5, 14p14.1-13, 11p, 11q14.3-22.2

(Ch: Chromosome, p: pter, q: qter)

Kuroiwa Tsukasa et al: Analysis of copy number abnormality (CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

색채상을 망라한 해석과 유전자의 동정은 이루어지지 않았다.

최근 개발된 GeneChip Mapping 10 K 2.0 Array는 전염색체상에서 단일염기 변이 다형(SNP) 10, 204개소를 제노타이핑함으로써 각각의 SNP 프로브에 대응하는 게놈 복제수 변화의 검출이 가능하게 되었다. 즉, 종양 게놈중의 유전자 복제수의 변화를 1회 해석을 통해 전염색체 영역에서 검색할 수 있는 탁월한 수단이라 하겠다. 통상 염색체는 부모로부터 1개씩 계승하여 복제수는 2가 되지만, 염색체 혹은 유전자의 일부가 결실되면 복제수의 감소가 발생한다. 연속된 SNP 프로브에 복제수 1이 연속하는 경우, 이 영역에 LOH가 존재하게 된다.

이번 연구는 설편평상피암환자 10증례 중 3증례(증례 1, 2, 3)를 대상으로 GeneChip Mapping 10 K Array를 이용한 전염색체상의 DNA 매핑 어레이 해석을 실시, 3증례 모두에서 1 q31. 1 영역(D1S1189, D1S2151, D1S2595)에 CNA와 LOH를 나타내는 염색체 영역을 동정하였다. 또한 10증례에 PCR-LOH 해석을 실시하여 밴드를 시그널 강도로 검증한 결과, 3 마커 모두 10증례 전체에 LOH가 인정되는 흥미로운 결과를 얻게 되었다.

기타 장기의 GeneChip Mapping 10 K Array를 이용한 전염색체상의 DNA 매핑 어레이 해석에 관한 지금까지의 보고를 Table 3에 제시한다.

이번 동정된 1 q31. 1 영역은 아직 어떤 유전자도 클로닝되지 않고 있어 이 영역에는 신규 미확인 암억제 유전자가 존재하고 있을 가능성이 시사되었다.

이번 연구를 통해 설편평상피암에 있어서의 고밀도 SNP Genotyping 어레이를 이용한 전 게놈상의 복제수와 헤테로접합성의 소실에 대해 해석하였다. 향후 증례수를 증가시켜 임상 지표와의 관련 및 1 q31. 1 영역의 상세한 염색체 해석과 이 영역에 존재하는 암관련 유전자의 해석을 아울러

실시함으로써 설편평상피암의 발생·진전에 관여하는 암관련 유전자군을 결정지으려 한다. 또한 증례수의 증가를 통해 1 q31. 1이외 영역의 복제수와 헤테로접합성소실의 검색도 가능할 것으로 생각된다.

V. 결 어

설편평상피암 10증례를 대상으로 3증례(증례 1, 2, 3)에서 전 게놈상의 DNA 매핑 어레이 해석을 실시하여, 3증례 모두 1 q31. 1 영역(D1S1189, D1S2151, D1S2595)에 CNA와 LOH가 동정되었다. 실험 결과를 바탕으로 10증례에 대해 D1S1189, D1S2151, D1S2595를 PCR-LOH법을 이용하여 검증한 결과, 10증례 전체에 LOH가 인정되었다. 이번 연구의 결과 1 q31. 1 영역은 설편평상피암의 발생에 관여하는 유전자좌위임이 시사되어 본 영역에는 신규 미확인 암억제 유전자가 존재하고 있음이 시사되었다.

이 논문의 요지는 제51회 일본구강외과학회총회(2006년 10월, 北九州시)에 발표되었다.

References

- Ogawa S. Analysis of DNA copy number. Blood Frontier 2006;16:35-42.
- Yamamoto N, Mizoe JE, Numasawa H, Yokoe H, Uzawa K, Shibahara T, et al. Allelic loss of chromosome 2 in human oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis. Oral Oncol 2003;39:64-8.
- Numasawa H, Yamamoto N, Katakura A, Shibahara T. Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome 2q in human oral squamous cell carcinoma. Bull Tokyo Dent Coll 2005;46:17-25.
- Kakimoto Y, Numasawa H, Yamamoto N, Takeda E, Yamauchi T, Shibahara T. Loss of heterozygosity and microsatellite instability on the long arm of chromosome 2 in human oral squamous cell carcinoma. Jap J Oral Maxillofac Surg 2005;51:374-81.

5. Arai K, Shibahara T, Yamamoto N, Yakushiji T, Tanaka C, Noma H. Frequent allelic loss/imbalance on the short arm of chromosome 3 in tongue cancer. *Bull Tokyo Dent Coll* 2001;42:151-7.
6. Arai K, Shibahara T, Yamamoto N, Noma H. The presence of candidate tumor suppressor gene loci at chromosome 3p for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2002;38:763-71.
7. Yamamoto N, Uzawa K, Miya T, Watanabe T, Yokoe H, Shibahara T, et al. Frequent allelic loss/imbalance on the long arm of chromosome 21 in oral cancer: evidence for three discrete tumor suppressor gene loci. *Oncol Rep* 1999;6:1223-7.
8. Yamamoto N, Noma H, Shibahara T. Allelic imbalance on the long arm of chromosome 21 in human oral squamous cell carcinoma: relationship between allelic imbalances (LOH and MSI) and clinicopathologic features. *Bull Tokyo Dent Coll* 2001;42:211-23.
9. Huang J, Wei W, Zhang J, Liu G, Bignell GR, Stratton MR, et al. Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics* 2004;1:287-99.
10. Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Jänne PA, Chen TH, et al. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004;64:3060-71.
11. Schubert EL, Hsu L, Cousens LA, Glogovac J, Self S, Reid BJ, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis of flow-sorted epithelial cells from frozen versus fixed tissues for whole genome analysis of allelic loss in breast cancer. *Am J Pathol* 2002;160:73-9.
12. Wang ZC, Lin M, Wei LJ, Li C, Miron A, Lodeiro G, et al. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Res* 2004;64:64-71.
13. Paez JG, Lin M, Beroukhi R, Lee JC, Zhao X, Richter DJ, et al. Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e71.
14. Primdahl H, Wikman FP, von der Maase H, Zhou XG, Wolf H, Orntoft TF. Allelic imbalances in human bladder cancer: genome-wide detection with high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:216-23.
15. Hoque MO, Lee CC, Cairns P, Schoenberg M, Sidransky D. Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single-nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Res* 2003;63:2216-22.
16. Lieberfarb ME, Lin M, Lechpammer M, Li C, Tanenbaum DM, Febbo PG, et al. Genome-wide loss of heterozygosity analysis from laser capture microdissected prostate cancer using single nucleotide polymorphic allele (SNP) arrays and a novel bioinformatics platform dChipSNP. *Cancer Res* 2003;63:4781-5.
17. Dumur CI, Dechsukhum C, Ware JL, Cofield SS, Best AM, Wilkinson DS, et al. Genome-wide detection of LOH in prostate cancer using human SNP microarray technology. *Genomics* 2003;81:260-9.
18. Wong KK, Tsang YT, Shen J, Cheng RS, Chang YM, Man TK, et al. Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele (SNP) array with whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e69.
19. Lindblad-Toh K, Tanenbaum DM, Daly MJ, Winchester E, Lui WO, Villapakkam A, et al. Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* 2000;18:1001-5.
20. Jänne PA, Li C, Zhao X, Girard L, Chen TH, Minna J, et al. High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2004;23:2716-26.
21. World Health Organization. International Histological Classification of Tumours. No. 4. Histological Typing of Oral and Oropharyngeal Tumours. Geneva: WHO; 1971:9-28.
22. UICC: TNM Classification of Malignant Tumours. 4th ed. Berlin: Springer; 1987:16-18.
23. Zhou X, Mok SC, Chen Z, Li Y, Wong DT. Concurrent analysis of loss of heterozygosity (LOH) and copy number abnormality (CNA) for oral premalignancy progression using the Affymetrix 10K SNP mapping array. *Hum Genet* 2004;115:327-30.
24. Wang J, Meza-Zepeda LA, Kresse SH, Myklebost O. M-CGH: analysing microarray-based CGH experiments. *BMC Bioinformatics* 2004;5:74.
25. Lin M, Wei LJ, Sellers WR, Lieberfarb M, Wong WH, Li C. dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics* 2004;20:1233-40.
26. Yamamoto N, Mizoe J, Numasawa H, Tsujii H, Shibahara T, Noma H. Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;39:796-805.