

Comparative Genomic Hybridization을 이용한 자궁경부암의 유전적 변이 조사

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과학교실, 유전학연구실*, 병리학교실**
정환욱·최수경*·김영미*·김진미*·홍성란**·김태진·임경택·
이기현·박인서·심재욱·박종택

-Abstract-

Mapping of Multiple Genetic Alteration Sites of Cervical Carcinomas by Comparative Genomic Hybridization

Hwan Wook Chung, Soo Kyung Choi*, Young Mi Kim*, Jin Mi Kim*,
Sung Ran Hong**, Tae Jin Kim, Kyung Taek Lim, Ki Heon Lee, In Sou Park,
Jae Uk Shim, Chong Taik Park

Genetic Research Laboratory, Department of Pathology**, Department of Obstetrics and Gynecology,
Samsung Cheil Hospital Sungkyunkwan University School of Medicine*

Comparative Genomic Hybridization (CGH) is a recently developed molecular cytogenetic technique, which makes it possible to detect chromosomal alteration in solid tumors. To determine whether chromosome alterations are related to cervical carcinoma, we have analyzed 33 cases (24 squamous cell carcinomas and 9 adenocarcinomas, stage Ib-IIIb) from tumor tissues and paraffin embedded tissues by CGH. The cut off value of CGH profiles was 1.15 and 0.85 (green/red ratio). Chromosomal aberrations were detected in 30 out of 33 cases (90.9%). In 32 cases, chromosome 3q was most frequently affected and had greater copy numbers in 20 of the 33 cases (60.6%). Interestingly, out of those 20 cases, 10 cases were shown to have a high-level of amplification of chr 3q. In addition to chr 3q, chromosomal gains were observed in chr 1q, 1p, 5p, 8q, 12p, 15q, 19q, 20q, Xp, and Xq. Furthermore chromosomal loss was detected, most commonly in chromosome 11q (11/33). Although less frequent, common losses were also detected in chr 2q, 4p, 4q, 5q, 11p, 17p, and 18p. In addition, there were cases of gross chromosome loss for chr 4, 6, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 and X. In cases involving whole arm deletion, we utilized fluorescence in situ hybridization (FISH) using specific probes α -satellite. We performed HPV typing for 16 and 18 using polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot analyses. Out of 33 tumor samples, 24 cases (72.7%) were HPV 16 positive, while only 6 cases were positive for HPV 18. two cases were positive for both HPV 16 and 18. We believe that a gain of chromosome 3q as a recurrent chromosomal aberration may contribute to the tumorigenesis of cervical cancer.

However, we could not correlate a pattern of chromosomal aberration with tumor stage or histologic type in cervical cancer.

Key Words: CGH, Chromosomal alteration, Cervical cancer, FISH, HPV

I 서 론

지난 30년 동안 구미에서는 자궁경부암의 발생률 및 사망률이 계속 감소하였으나 우리 나라에서는 아직도 여성에서 발생하는 악성 암 중 수위이다.¹⁾ 최근의 연구에 의하면 인유두종바이러스 (HPV)가 자궁경부암의 암화과정 중 초기 단계에 중대한 역할을 하고 되고 있음이 밝혀졌다.^{2,5)} 자궁경부암의 발생 및 진행 과정에 대한 이해를 위해서는 암화과정 중 필수적인 염색체의 이상에 대한 연구가 필요하다. 염색체의 변이에 관한 보고는 많지 않은데 이는 염색체 연구를 위하여 필요한 암세포의 배양 및 증기세포 관찰이 자궁경부암을 비롯한 고형암에서는 어려웠기 때문이다. 또한 배양에 성공한다 하여도 염색체의 변이가 매우 다양하여 분석하기 어려운 문제도 있다.³⁾ 1992년 Kallioniemi 등에 의해 개발된 Comparative Genomic Hybridization (CGH) 방법은 이러한 고형암에서의 염색체 분석에 따른 어려움을 극복할 수 있는 방법으로 평가되고 있다. 암세포를 배양하지 않고도 DNA 만으로도 염색체의 변이를 알 수 있는 장점이 있고 또한 자체 소프트웨어로 각 염색체의 양의 감소와 증가를 분석할 수 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 본 연구는 본원에서 진단 받은 자궁경부암 환자의 암 조직에서 추출한 DNA를 이용하여 CGH를 실시한 후 염색체의 변이가 세포 병리학적인 진단이나 HPV의 감염과 어떠한 연관성이 있는지를 알아봄으로써 자궁경부암의 암화과정을 이해하려는 목적이어서 고안되었다.

II 연구 방법

연구 대상

본 연구는 1993년 3월부터 1994년 3월까지 1년간 본원에서 자궁경부암으로 진단 받은 FIGO 병기 I 기에서 III기 환자 33 명으로부터 얻은 암 조직을 이용하여 Comparative Genomic Hybridization(CGH), 인유두종바이러스 검사, Fluorescent in situ hybridization(FISH)를 시행한 연구이다.

Comparative Genomic Hybridization

중기상 염색체 슬라이드를 만들기 위하여 정상인 여성과 남성의 혈액을 이용하였다.³⁾ 정상인의 DNA는 염색체 분석 결과가 정상인 여성의 전혈과 환자에서 추출한 암조직에서 Sambrook 등의 방법을 응용하여 추출하였다.⁴⁾ Nick translation kit(Vysis)를 이용하여 labelling 하였는데, 정상인 여성의 DNA는 Biotin-16-dUTP로 환자의 DNA는 Digoxigenin-11-dUTP로 labelling 하였다. 전기영동으로 확인된 500~2000bp의 DNA를 500ng씩 그리고 Cot1 DNA를 20 µg를 섞어 probe를 준비하였다. probe 변성은 75℃에서 5분간(50% deionized formamide, 2X SSC, 10% dextrane sulfate) 슬라이드의 염색체의 변성은 70℃에서 2분간(70% formamide/2X SSC)하였다. hybridization은 36℃ humid box에서 이틀간 하였으며 anti-digoxigenin-fluorescein fab fragment와 treptoavidin-sulforhodamin 101로 각각 detection하였다. DAPI (250ng/ml)로 counter stain하였다.

Cytovision을 이용한 CGH 분석

hybridization되어 염색된 슬라이드를 현미경으로 관찰 한 후 hybridization이 잘 된 phase를 골라서 10 phase 이상 분석하였다. 최종 분석은 profile로 하였으며 cut-off value는 1.15와 0.85로 정하여 1.15 이상은 증폭으로 0.85이하는 결실로 하였다.

Fluorescent in situ hybridization(FISH)

CGH 실험상 whole arm 결실로 확인된 예의 조직을 2-7µm 두께로 잘라 슬라이드를 준비하였다. 준비된 슬라이드는 Xylene을 이용하여 파라핀을 제거하고 알코올 탈수와 proteinase K 처리를 한 후 각 염색체의 centromeric Probe 혼합액(Vysis)을 10ul 놓고 c커버글래스를 덮어 용액이 마르지 않도록 밀봉하고 90℃ 교잡반응기에서 12분 동안 변성시킨 후 37℃ 배양기에서 18-24시간동안 교잡 반응시켰다. 교잡반응이 끝난 슬라이드는 DAPI 용액으로 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

HPV genotyping

자궁경부암 조직으로부터 추출된 genomic DNA를 이용하여 HPV type 16및 18을 결정하기 위한 PCR을 수행하였다.

III 결과

대상 환자의 평균 나이는 49.1 세였다. 총 33 예

중 24예는 편평상피암 (squamous cell carcinoma)이고 9예는 선암 (adenocarcinomas)이었다. FIGO 임상 병기는 Ib 기에서 IIIB 기까지로 다양하였다.(Table 1)

Table 1. Summary of the Clinical Data and Results of HPV Genotyping, and CGH in Invasive Cervical Cancer

Case	Age	Histologic Diagnosis	Clinical Stage	HPV		CGH
				16	18	
1	68	ISCC, LCNK	Ila1	+	-	12q, +3q, -4, -5p13.2-ter, -5q31.3-ter, -6q23.1-ter, -8p21-ter, -9q, -9q21-31.1, -10, -11p14-ter, 1221.1-ter, +1524-ter, -17p12-ter, +19q, +20, -21q11.2-21
2	51	IAC, Mod	Ib	-	-	+3q26.2-ter, -8q24.1-ter, -1123.2-ter, -21q22.1-ter, -22q13.1-ter
3	53	ISCC, LCNK	Ila1	-	-	+1q21.1-22, +513.3-15.1, -18q, ++22q
4	56	ISCC, LCK	Ib	+	-	+6p, +8q22-ter, +11q13.2-23.2, +16q, +2111.2-21, +X
5	61	ISCC, LCNK	Ib	+	-	+1, +2, +3q, -4p, +4q, +6q, +7, +8q, +9q+, +10q22.3-ter, +11q13.1-22.3, -11q23.1-ter, +12p, +12q, +14, -16p13.2-ter, +18q, -X
6	39	ISCC, LCNK	Ib	+	-	+1q, -2q34-ter, +3q, -4q12-22, -6p21-ter, 11q11-14, -11q23-ter, +13q32-ter, +1522-ter, 16q12.1-22, +18q12-21, +22
7	43	ISCC, LCK	Ila	+	-	+1q, -2q33-ter, 3p-, +3q21-ter, -4, +5p, -7q22-ter, +8q13-ter, -11p13-ter, -11q23-ter, 12q24.1-ter, -16, -17, -19
8	58	ISCC, LCNK	IIIB	+	-	2q36-ter, -11q23-ter
9	38	IAC, Well	Ib	+	-	+6q12-24, -7q22-ter, -8q24.3-ter, 9q, -11q
10	61	ISCC, LCK	Ila1	+	-	2p, +2q11.2-22, +3q, -6p22-ter, +8q22-ter
11	68	IAC, Poor	IIIB	-	+	-1p33-ter, -2q35-ter, -8q24.1-ter, -9q, -10p13-ter, -10q22-ter, -11q12-14, -11q23-ter, -20, -22
12	57	IAC, Poor	Ib	-	+	+2p23-ter, +3q23-ter
13	55	ISCC, LCNK	IIIB	+	-	+1q21-ter, +3q, +5p, -5q, -11, +12, -16q, +20
14	37	IAC, Poor	Ila1	+	-	normal
15	42	ISCC, LCNK	Ila1	+	-	+1, +2, +3q, +7q, +10q, +16, +20q
16	41	IAC, Poor	Ib	-	+	+1p31-ter, +1q31-ter, +2p22-ter, +2q22-ter, +3p14-ter, +4p15.2-ter, +5p15.1-ter, +6p21.3-ter, +6q25-ter, +7p15-ter, +7q21-ter, +8p21-ter, +8q23-ter, +9q22-ter, +10, +11, +12q22-ter, +13q32-ter, +14q23-ter, +15, +16, +17q, -18p, +18q, +19q, +20q, +21, +22
17	29	ISCC, LCK	Ib	+	-	+1, +2p, +2q11.2-22, -2q24-ter, +3p12-21, +3q, -4p, +4q, +5p, -5q, +6p11.2-21.3, +6q, +7, +8q+, +9, -11q23-ter, +12, -13, -14, +15, +16p11.2-12.2, +16q
18	37	ISCC, LCNK	Ila1	+	-	3q+, -17p, -18p, +19q
19	61	ISCC, LCNK	IIb1	+	-	+1p31-ter, +3p21-ter, +3q21-23, +3q27-ter, +5q14-ter, +5q33-ter, -8q, +9p22-ter, +9q34-ter, -10p11.1-12, +12q24.1-ter, +1723-ter, -18, +19q, +20q
20	42	ISCC, LCNK	Ib	+	-	+1, +4p15.2-ter, +5p15.1-ter, +5q23-ter, 8q23.1-ter, +9q22-ter, +10q23-ter, +15q22-ter
21	34	ISCC, LCK	Ib	-	-	normal
22	32	ISCC, LCK	Ib	+	-	+1, +2q31-33, +3q22-ter, +4, +5, +7, -8p21.2-22, +8q, +9p21-ter, +9q, +13, +14, +15, +17, +18, +19, +X
23	40	ISCC, LCNK	Ib2	-	-	normal
24	66	IAC, Well	Ila	-	+	+1, +3q, -4p, -4q24-ter, +5p, +8q23-ter, +9q22-ter, +12q, +13q22-ter, +15, -16q13-ter, -17, +19q, +20, -21, +X
25	35	ISCC, LCK	Ib1	+	-	+1q, -2q36-ter, +3q25-ter, -5q33-ter, -14q31-ter, -16, -19q13.2-ter, -22
26	56	ISCC, LCK	Ila	-	-	+8, +13q21-ter, +X
27	61	ISCC, LCNK	IIb	+	+	+7p14-11.2, +7q11.2-22, +8, +12, +19p11-13.2, +19q11-12.2, +X
28	45	ISCC, LCNK	Ib	+	-	-3q, +11p14-ter, -11q12-14
29	47	ISCC, LCNK	Ib	+	-	+1, +3q
30	57	ISCC, LCNK	IIb	+	-	+1p32-ter, -p31-13, +q, -2q33-ter, -3p, +3q21-26.3, -4, -5, -7q31-ter, +10q23-ter, -11q14-ter, +15q21-24, +19q13.1-13.2, +20, +22, +X
31	51	IAC, Mod	IIIB	+	+	+1, +3, +8p, +9, +10q, +11q, +15, +16, +17, +20q, +22, +X
32	38	IAC, Poor	Ib1	+	-	+3, +12p11.1-11.2, +12q11-23, +X
33	60	ISCC, LCK	Ila	+	-	+1p, +3q, +5p14-ter, -5q31-ter, +13q21-ter, +19q

ISCC; Invasive squamous cell carcinoma IAC; Invasive adenocarcinoma LCK; Large cell keratinizing LCNK; Large cell nonkeratinizing Well; Well differentiated Mod; Moderately differentiated Poor; Poorly differentiated

CGH분석 결과 총 33예 중 30예(90.9%)에서 염색체의 이상을 발견하였다.(Table 1, Fig. 1) 염색체의 이상 중에서 가장 특징적인 변화는 3번 염색체의 장완(3q)의 증폭으로서 모두 20예(60.6%)에서 관찰되었다.(Fig. 2) 이 중에서 4예는 현저한 증폭을 나타내었다. 3q이외에도 1p(11/33), 1q(16/33), 5p(10/33), 8q(11/33)도 증폭을 나타내었으며 그 밖에 12p, 15q, 19q, 20q, Xp, Xq에서도 염색체의 증폭이 관찰되었다.

염색체의 결실은 11q가 33예 중 11예에서 관찰되었고(Fig. 3), 2q(8/33), 4p(5/33), 4q(4/33), 5q(5/33), 11p(3/33), 17p(4/33), 18p(3/33)에서도 관찰되었다. CGH의 결과 결실이 의심스러운 5예에 대하여는 alpha-satellite 탐색자를 이용한 FISH를 수행하여 95%(68/75cell)의 세포에서 염색체 장완 또는 단완의 전 염색체가 결실되었음을 확인하였다.(Fig. 4)

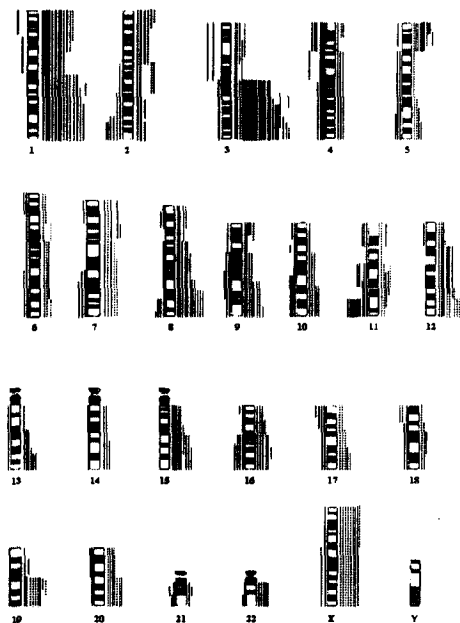


Fig 1. Summarized Karyogram of gains and losses in 33 cases of cervical carcinoma. Vertical lines on the left side of each chromosome ideogram represent loss of genetic material in the tumor, whereas those on the right side correspond to a gain. High-level copy-number increases are represented as solid bars.

모든 대상에서 HPV16, 18형의 감염여부를 확인하기 위하여 암 조직에서 추출된 CGH에 사용되었던 같은 DNA를 이용하여 PCR과 Southern blot 분석을 시행한 결과 모두 28예(84.8%)에서 감염을 관찰하였다. 이 중 24예(72.7%)는 16형이었고, 5예에서 HVP 음성을 보였다.(Table 1)

IV 고찰

CGH(Comparative Genomic Hybridization)가 개발되기 전에는 고형암에서 염색체의 변이를 조사하려면 배양한 세포로부터 얻은 염색체의 특징을 banding 기술에 주로 의존하여 관찰하였다. 그러나 암세포는 배양이 잘 안고, 배양에 성공하여 증기상

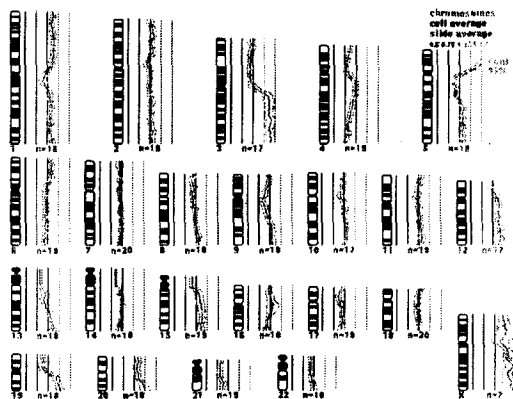


Fig 2. CGH profile shows 3q amplification for case 1

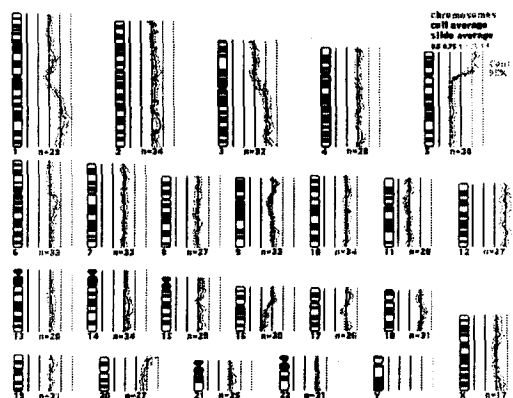


Fig 3. CGH file shows 11q deletion for case 13

Fig 4. FISH analysis of interphase cells of case 1 and 23 containing whole arm deletion of chromosome 4 and 18 detected by CGH. Each white dots show centromeric probe signals of ch.4 (A) and ch.18 (B). Nucleus are counterstained with PI(red)(A) and DAPI(blue)(B)

세포를 얻는다 하여도 암세포의 염색체 변이는 매우 다양하고 복잡하여 체계적인 분석을 하는데 한계가 있었다.¹³⁾ CGH의 장점은 어렵게 세포를 배양하지 않고도 생검조직은 물론 포르말린에 고정된 조직이나 파라핀에 포매된 조직 등 DNA를 얻을 수 있는 조직이라면 추출된 DNA를 이용하여 각 염색체의 유전자의 증폭 및 감소의 유무 및 그 정도를 분석 소프트웨어를 이용하여 알아 낼 수 있다는 데 있다.^{14,15)}

본 연구에서는 자궁경부암 33예의 조직으로부터 추출한 DNA로 CGH를 이용하여 자궁경부암 세포의 염색체의 변이를 관찰하였다. 염색체 변이의 결과는 다양하게 나타났으며 병리진단이나 임상병기, HPV의 감염여부와는 연관 관계없이 다양한 증폭이나 결실을 보였다. 이 중에서 공통적으로 보이는 가장 특징적인 염색체의 변이는 3q의 증폭이며 공통 부위는 q26.3로서 모두 20예(60.6%)에서 관찰되었다. 이는 Heselmeyer(1997) 등이 진행된 자궁경부암 30예 중에서 관찰한 3q26-27 부위의 공통적인 증폭의 결과와 같다.¹⁶⁾ Heselmeyer 등은 염색체 3q의 증폭이 암화과정의 초기 단계에서 발생하고 1q나 5p의 증폭이 관여하면서 점차 진행한다고 보고하였다.¹⁷⁾ 본 연구에서도 3q 증폭과 임상병기나 병리진단 및 HPV의 감염 여부와는 연관성을 보이지 않았지만 전반적으로 많은 예에서 존재하고 있었으며, 3q의 증폭 이외에도 1p, 1q 5p, 8q의 염색체 증폭이

관찰되었다.

Teyssier는 1989에 자궁경부암의 염색체 분석 결과 1, 3, 11 그리고 17번에서 가장 흔하게 염색체 이상을 보인다고 보고하였으며,¹⁸⁾ 염색체 1번이 자궁경부암에서 특징적 변화로 관찰된 예는 Sreekantaiah의 연구에서 이미 언급 된바있다.^{19,20)} 다른 악성암의 연구에서도 염색체 1번의 이상을 관찰 할 수 있는데, Atkin 등은 isochromosome i(4p)나 i(5p)로 보이는 염색체가 전체 이상의 70%를 차지하고 염색체 1의 이상이 60%를 차지한다고 보고하였다.²¹⁻²⁴⁾

본 연구에서 가장 많이 관찰된 염색체의 결실은 11q23-ter 부위였으며 11예에서 관찰되었다. 염색체 11의 결실에 관련된 보고 또한 여러저자에 의하여 보고되었다.²⁵⁻²⁸⁾ Sreekantaiah 등은 자궁경부암에서 염색체의 breakpoint가 11q23에서 높은 빈도로 발생함을 보고하였고, Bethwaite 등은 microdissection과 minisatellite/PCR법을 이용하여 이 부위에서 높은 빈도의 allele loss가 있음을 관찰하였다.²⁹⁾ 이러한 11q23-ter 부위의 소실은 3q의 증폭과 함께 암화과정의 진행에 관여 할 것으로 추측된다.

본 연구에 이용된 자궁경부암 33예 중 5예를 제외한 28예에서 HPV의 감염을 확인하였으나 감염된 HPV 아형과 염색체 변이의 연관성은 찾기 어려웠다. HPV 16, 18형은 자궁경부암의 암화과정의 초기 단계에 관여하는 주요한 요인이 이미 알려져 있다.³⁰⁾ Cannizzaro 등은 자궁경부암 세포주에서 HPV

의 DHA가 8q21에 침입한다고 보고하였다. 본 연구에서 관찰된 8q의 증폭은 모두 11예로 한 예를 제외하고는 모두 HPV에 감염되어 있었다.

본 연구에서 염색체의 증폭이나 결실을 보이지 않는 정상 CGH profile을 보인 예도 3예가 있었는데, 두 예는 임상 병기 Ib의 편평상피암이었고, HPV 음성이었다. 나머지 한 예는 분화가 좋지 않은 선암으로 HPV16 형에 감염되어 있었다. CGH에 정상 염색체로 나온 결과는 실제 염색체의 변이가 없다고 해석할 수 있고, 정상조직의 오염으로 위음성을 보였을 가능성도 배제할 수 없다. 일반적으로 환자로부터 직접 채취한 암 조직에는 상당량의 정상 조직이 포함 되어있을 수 있기 때문이다.

본 연구의 결과 3q의 증폭이나 11q의 결실이 자궁경부암에서 특징적으로 관찰되는 염색체의 변화였으며 이 부위의 염색체가 암화과정에 관여하고 있음을 추측할 수 있었다. 그러나 기존에 알려진 암의 예후와 관계 있는 현미경적 특성 및 HPV의 감염 여부 등과 염색체의 이상은 연관성이 없어 보인다. 염색체의 변이가 암화과정에서 진행되는 필요한 조건인지 아니면 암화과정에서 생긴 결과인지는 알기 어렵다. 그러나 좀더 많은 예의 암 조직을 대상으로 하여 임상적 특성이 같은 대상을 모아 염색체 변이를 조사할 필요가 있다. 자궁경부암의 비교적 긴 전암단계를 고려할 때 침윤암에서의 염색체 변이뿐만 아니라 다양한 종류의 상피이형증에서의 염색체 변이를 관찰한다면 자궁경부암의 암화과정과 염색체 이상의 연관성을 찾을 수 있을 것으로 본다.

V 요약

1. 본 연구는 1993년 3월부터 1994년 3월까지 자궁경부암으로 FIGO 병기 I 기에서 III기 환자 33명을 대상으로 Comparative Genomic Hybridization (CGH), 인유두종바이러스 검사, Fluorescent in situ hybridization(FISH)를 시행한 연구이다.
2. 대상 환자의 평균 나이는 49.1세였다. 총 33예 중 24예는 편평상피암(Squamous cell carcinoma)이고 9예는 선암(adenocarcinomas)이었다. FIGO임상 병기는 Ib기에서 IIIb기까지로 다양하였다.
3. CGH분석 결과 총 33예 중 30예(90.9%)에서 염색

체의 이상을 발견하였다. 염색체의 이상 중에서 가장 특징적인 변화는 3번 염색체의 장완(3q)의 증폭으로서 모두 20예(60.6%)에서 관찰되었다.

4. 염색체의 결실 중 가장 많은 빈도를 보인 것은 11q로서 33예 중 11예에서 관찰되었다.
5. 모든 대상에서 HPV16, 18형의 감염여부를 확인하였고 모두 28예(84.8%)에서 감염을 관찰하였다. 이 중 24예(72.7%)는 16형이었고, 5예에서 HPV음성을 보였다.
6. CGH로 관찰된 자궁경부암의 염색체 변이는 환자의 나이, 병리학적인 세포의 특성, 임상병기, HPV의 감염의 유무 등과 연관성을 보이지 않고 있다.

-참고문헌-

1. National Cancer Institute. Cancer statistics review, 1973-1995. Bethesda, Maryland
2. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal carcinogenesis. Cell 1990; 61:759-67.
3. Zur Hausen H: Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix. Lancet 1994;343:955-7.
4. Zur Hausen H: Paillomavirus in anogenital cancer as a model to understanding and the role of viruses in human cancer. Cancer Res 1989;49:4677.
5. Wright TC, Richart RM: Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. Gynecol Oncol 1990;37:151.
6. Zimonjic LB, Simpson S, Popescu NC et al: Molecular cytogenetics of human papillomavirus-negative cervical carcinoma cell lines. Cancer Genet Cytogenet 1995; 82:1-8.
7. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D et al: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992;258:818-21.
8. Atkin NB, Fox MF, Baker M: A comparison of the number of X-chromatin bodies and X chromosomes in 19 carcinomas of the cervix uteri. Cytobios 1989; 60: 111-4.
9. Atkin NB, Baker MC, Fox MF: Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. Cancer Genet Cytogenet 1990;44:229-41.
10. Reid T, Knutzen R, Steinbeck R et al: Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of

- colorectal tumors. *Genes Chromosome Cancer* 1996; 15:234-45.
11. Verna RS, Babu A: Human chromosomes. Principles and techniques. 2nd ed. MacGraw-Hill, inc. 1995; 99: 8-14.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning; A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY. 1989.
13. Mitra AB, Murty VVVS, Li RG et al: Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4481-7.
14. Speicher MR, du Manoir S, Cremer T et al: Molecular cytogenetic analysis of formalin fixed, paraffin embedded solid tumors by comparative hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1907-14.
15. Isloa J, Devries S, Chu L et al: Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994;45:1301-8.
16. Heselmeyer K, Macville M, Schrock E et al: Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes Chromosomes & Cancer* 1997;19:233-40.
17. Heselmeyer K, Schrock E: Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:479-84.
18. Teyssier JR: The chromosomal analysis of human solid tumors: a triple challenge. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 37:103-25.
19. Atkin NB, Baker MC: Chromosome 1 in 26 carcinomas of the cervix uteri: Structural and numerical changes. *Cancer* 1979;44:604-13.
20. Sreekantaiah C, Bhargava MK, Shetty NJ: Chromosome 1 abnormalities in cervical carcinoma. *Cancer* 1988; 62:1317-24.
21. Atkin NB, Baker MC: Numerical chromosome changes in 165 malignant tumors-Evidence for a nonrandom distribution of normal chromosomes 1991.
22. Barbich M, Slavutsky I, Larripa I et al: Translocation t(1:5) in a case of carcinoma of the cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 1985;16:269-74.
23. Popescu NC, DiPalo JA: Cytogenetics of cervical neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;60:214-5.
24. Sreekantaiah C, Braekeler MD, Haas O: Cytogenetic findings in cervical carcinoma- A statistical approach. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;53:75-81.
25. Srivatsan EX, Misra BC: Loss of heterozygosity for alleles on chromosome 11 in cervical carcinoma. *Acta Oncol* 1991;34:171-5.
26. Bosch FX, Schwarz E, Boukamp P et al: Suppression in vivo of human papillomavirus type 18 E6-E7 gene expression in nontumorigenic HeLa fibroblast hybrid cells. *J Virol* 1990;64:4743-54.
27. Jesudasan RA, Rahman RA, Chandrashekarappa S et al: Deletion and translocation of chromosome 11q23 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Amer J hum Genet* 1995;56:705-15.
28. Southern SA, Herrington CS: Interphase karyotypic analysis of chromosomes 11, 17 and X in invasive squamous-cell carcinoma of the cervix: Morphological correlation with HPV infection. *Int J Cancer* 1997; 70: 502-7.
29. Bethwaite P, Koreth J, Herrington CS et al: Loss of heterozygosity occurs at the D11S29 locus on chromosome 11q23 in invasive cervical carcinoma. *Brit J Cancer* 1995;71:814-8.
30. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H et al: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984;3:1151-7.
31. Cannizzaro LA, Durst M, Mendes MJ et al: Regional chromosome location of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;33:93-8.