

مطالعه باز آرایه‌های کروموزومی و بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های دخیل در بروز سرطان

القایی پستان به وسیله DMBA در رت و شناسایی مناطق سینتیک آنها

در کروموزوم‌های انسان

احمد همتا^{۱*}، سید محمدعلی شریعت‌زاده^۲، ملک سلیمانی^۳، فاطمه سیفی^۴

خلاصه

مقدمه: سرطان پستان شایع‌ترین نئوپلاسم در بین زنان و با شیوع فزاینده است. این سرطان علت عمده مرگ زنان در سنین کمتر از ۵۵ سال است. با توجه به گزارش ثبت موارد سرطان در ایران این سرطان رتبه اول را در بین زنان داشته است. مطالعه حاضر با هدف تعیین محتمل‌ترین ژن‌های دخیل در سرطان پستان انجام شده است. روش: ۱۰ mg از ماده سرطان‌زای DMBA از طریق خوراکی به رت‌های نژاد SD تحت آزمایش خوراندن شد. به منظور شناسایی و تعیین نوع سرطان‌های حاصل که برای کشت سلولی نیز به کار رفتند از روش‌های هیستوپاتولوژی و ایمنو‌هیستوشیمی استفاده و سپس اقدام به تهیه کروموزوم‌های متافازی گردید و نواربندی‌های کروموزومی توسط رنگ آمیزی گیمسا انجام شد. فراوان‌ترین و مشترک‌ترین تغییرات کروموزومی ثبت گردید. بر اساس چگونگی تغییرات و محل آنها و با کمک پایگاه‌های اطلاعاتی و تعیین توالی‌های نوکلئوتیدی و مقایسه ژنومیک بین رت و انسان، لیستی از ژن‌های موجود در نواحی که به احتمال زیاد با تغییرات خود سبب بروز تومور شده‌اند تهیه شد.

یافته‌ها: تغییرات کروموزومی ایجاد شده طیف وسیعی از ناهنجاری‌های عددی را شامل می‌گردید و به طور واضح، کروموزوم‌های شماره ۱، ۳ و ۹ دچار افزایش و کروموزوم‌های شماره ۸ و ۱۵ دچار گم‌شدگی در تعداد کروموزوم‌ها گردیده بودند. علاوه بر این، تغییرات ساختاری از جمله حذف‌شدگی در کروموزوم‌های شماره ۲، ۵، ۸، ۱۶ و ۱۹ هم‌چنین اضافه‌شدگی در کروموزوم‌های ۲، ۱۲ و ۱۹ به طور غیر اتفاقی مشاهده شد. نتیجه‌گیری: با استفاده از روش مقایسه ژنومیک مشخص شد که احتمالاً ژن‌های HSPA8، KLF4، DAB2، ZFX3، HSPA8، LSM1، FGFR1، ASH2L، ALDOB، ABCA1، AQP3، ALDH2، CHFR، HPR، CALB2، CDKN2A و SFRP1 می‌توانند از جمله مهم‌ترین ژن‌ها در بروز سرطان پستان باشند و به عنوان ژن‌های پیشنهادی برای مطالعات دقیق‌تر ارائه می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: موش صحرایی، سرطان پستان، تغییرات کروموزومی، DMBA، نواربندی گیمسا

۱- استادیار ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک ۲- استاد جین‌شناسی و بافت‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک

۳- دانشیار جین‌شناسی و بافت‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک ۴- دانش‌آموخته زیست‌شناسی سلولی - تکوینی

* نویسنده مسؤول، آدرس: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، سردشت، اراک • آدرس پست الکترونیک: a-hamta@araku.ac.ir

مقدمه

تقلید کننده سرطان را بوجود می آورد (۶). برخی از سویه های رت از جمله اسپراگ داوولی (SD) مستعد تشکیل تومور به وسیله مواد سرطانزای شیمیایی مانند DMBA می باشند (۹،۱۰). کشف تغییرات ژنتیکی که در تغییر شکل سلول های نئوپلاستیک همکاری داشته اند، یکی از اهداف مهم در تحقیقات سرطان می باشد (۱۱). تاکنون تحقیقات زیادی بر روی تومورهای القایی توسط DMBA انجام شده است ولی هیچ کدام از آنها بر روی موش صحرایی نژاد SD و به منظور شناسایی تغییرات کروموزومی آن در اثر ابتلا به سرطان پستان نبوده است. در این تحقیق با ایجاد سرطان پستان توسط DMBA در موش های صحرایی نژاد SD، ناهنجاری های کروموزومی ایجاد شده در رت های مبتلا مورد بررسی قرار گرفت و نواحی مشابه آنها در انسان شناسایی گردید و محتمل ترین ژن های دخیل به عنوان ژن های کاندید برای مطالعات دقیق تر ارائه شد.

روش بررسی

رت های ماده از نژاد SD با میانگین وزنی (150 ± 10 gr) از موسسه سرم سازی رازی خریداری شد. قبل از شروع آزمایش، رت ها جهت سازگاری با محیط به مدت یک هفته در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت 3 ± 22 سانتی گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا در اتاق حیوانات نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی به ۲ گروه تقسیم شدند که پس از نشانه گذاری، وزن اولیه آنها اندازه گیری شد. به گروه کنترل ($n=10$) ۰/۵ml روغن کنجد به صورت گاوژ دهانی داده شد. به گروه تیمار ($n=10$) محلول حاوی ۱۰mg DMBA حل شده در ۰/۵ml روغن کنجد به صورت گاوژ داده شد. رت ها هر روز از نظر ایجاد تومور مورد معاینه دقیق قرار می گرفتند. پس از رشد تومور به اندازه ی حدود ۲/۵ سانتی متر و با رعایت قوانین اخلاقی، حیوانات توسط دی اتیل اتر بی هوش

سرطان پستان شایع ترین نئوپلاسم در بین زنان می باشد و شیوع این بیماری هم در کشورهای توسعه یافته و هم در حال توسعه به طور مستمر رو به افزایش است (۱). با توجه به گزارش ثبت موارد سرطان در ایران این سرطان رتبه اول را در بین زنان داشته است (۲). اگرچه از بین عوامل مختلف ایجاد سرطان پستان ۱۰ درصد به عوامل ژنتیکی نسبت داده می شود، ولی علت اصلی بروز این سرطان ناشناخته است. در بین عوامل مختلف نقش مواد شیمیایی موجود در محیط بسیار اهمیت دارد. از جمله مهم ترین این مواد هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (Polycyclic aromatic hydrocarbons: PAH) می باشند که به فراوانی در دود سیگار، گوشت سرخ کرده، مواد غذایی دود داده شده، آلودگی های مختلف در هوا و همچنین سایر منابع محیطی مانند قیر یافت می شوند. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که DNA سلول های سرطانی پستان نسبت به سلول های طبیعی واکنش بیشتری را با PAH داشته اند (۳). ماده سرطانزای DMBA به عنوان یک مدل از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای می باشد (۴،۵) که استفاده از آن از طریق خوراکی در رت به طور انتخابی ایجاد سرطان پستان می نماید که این نقش احتمالی PAH را در افزایش خطر بروز سرطان پستان نشان می دهد (۳). مدل های حیوانی آزمایشگاهی برای مطالعه تغییرات ژنتیکی در بروز سرطان پستان بسیار مفید می باشند (۶). بیشترین تحقیقات پیرامون سرطان پستان در مدل آزمایشگاهی جوندگان از جمله رت به انجام رسیده است (۷). DMBA 7,12-dimethylbenz(a)anthracene یک هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای و سنتتیک است که به طور گسترده در بسیاری از آزمایشگاه های تحقیقاتی برای مطالعه سرطان به کار می رود (۸). القای شیمیایی سرطان پستان در رت توسط این ماده سرطانزا یکی از مفیدترین مدل های

حدود ۴۰ میکرولیتر از محلول کلشی سین $10 \mu\text{g/ml}$ به محیط کشت حاوی سلول اضافه شد و به مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفت. بعد از جداسازی سلول‌های کشت شده از فلاسک، داخل لوله سانتریفوژ ریخته شدند و با دور ۱۲۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند و بر روی رسوب محلول $0.1\% \text{ KCl}$ اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در هوای اتاق قرار داده شد. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی برداشته شد و روی رسوب فیکساتیو کارنوی (۳:۱ متانول-اسیداستیک) اضافه شد و سپس سانتریفوژ گردید. این عمل ۳ بار تکرار شد. بعد از ۳ بار شستشو با فیکساتیو، پلیت سلولی در مقدار مناسبی از فیکساتیو حل گردید. سپس سه تا چهار قطره از محلول حاوی سلول‌های متافازی توسط پیپت پاستور از فاصله ۳۰ cm بر روی لام چکانده شد و پس از خشک شدن برای رنگ آمیزی به روش G-banding بکار برده شد. لام‌ها درون تریپسین 37°C به مدت ۳۰-۱۰ ثانیه قرار گرفته و سپس برای شستشو به ظرف حاوی بافر سرد PBS منتقل شدند و سپس در محلول رنگ گیمسا به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت با بافر PBS مجدداً شستشو و پس از خشک شدن با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX41 از گستره‌های متافازی دارای شرایط مطلوب برای آنالیز کروموزومی عکس برداری شد. سپس عکس‌ها به وسیله نرم‌افزار Leica CW4000 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از تشخیص و تعیین نواحی کروموزومی تغییر یافته در مجموعه‌های کروموزومی سلول‌های سرطانی، اقدام به تعیین توالی‌های نوکلئوتیدی آنها با استفاده از پایگاه اطلاعاتی مانند Ensembl و NCBI شد. با استفاده از امکانات همان سایت‌های اینترنتی، توالی‌های به دست آمده با توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم انسان BLAST و مقایسه گردید و نواحی متناظر آنها در انسان مشخص شد. لذا بدین طریق اطلاعات به دست

شدند، ناحیه‌ی اطراف تومور تراشیده و در شرایط استریل تومور به طور کامل خارج شد و یک سوم تومور حاصل برای مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ایمنو هیستوشیمی در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد و دو سوم آن برای کشت سلول و تهیه کروموزوم‌های متافازی استفاده گردید.

به منظور مطالعات هیستوپاتولوژیکی و ایمنو هیستوشیمیایی تومور به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت و ادامه کار طبق مراحل زیر انجام گردید.

پاساژ بافتی به منظور مطالعه هیستوپاتولوژیکی - تکنیک ایمنو هیستوشیمی

تومورها با استفاده از دستگاه اتوماتیک (اتوتکنیکون مدل Leica Histokinette) مورد پاساژ بافتی قرار گرفتند و از تومور، مقاطعی به ضخامت ۳-۵ میکرومتر تهیه و سپس رنگ آمیزی با هماتوکسین ائوزین (H&E) انجام گرفت. در این پژوهش از دو آنتی بادی P53 Protein و Von Willebrand factor خریداری شده از شرکت Dako استفاده گردید. مراحل انجام این تکنیک با توجه به دستور العمل شرکت سازنده آنتی بادی انجام گرفت و نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

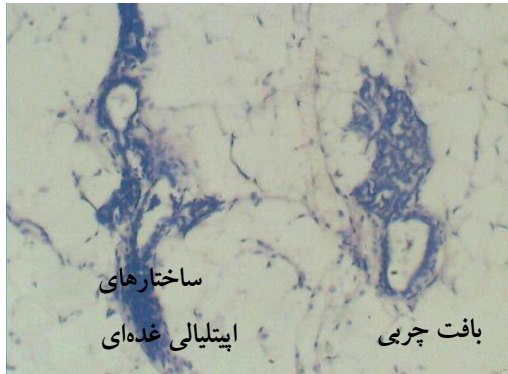
مشاهدات ماکروسکوپی

پس از حدود ۱۲ هفته اولین نشانه‌های ظهور تومور در رت‌ها مشاهده شد و در هفته سیزدهم، هنگامی که تومورها به حدی رسیدند که قابل نمونه برداری بودند حیوان توسط اتر بی‌هوش شده و بافت‌های توموری خارج شدند و از آنها در پژوهش حاضر استفاده گردید.

کشت و تهیه سلول از بافت توموری

کشت سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و در فلاسک‌های ۲۵ ml انجام گردید. بعد از تکثیر سلول‌ها و به منظور افزایش کروموزوم‌های متافازی یا mitotic index

می گردد سلول های توموری واکنش قوی را با آنتی بادی VWF نشان داده اند.



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۱. (الف) برشی از بافت طبیعی پستان، بزرگنمایی $100\times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین (ب) برشی از بافت توموری پستان، بزرگنمایی $100\times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین (ج) برشی از بافت توموری پستان، بزرگنمایی $400\times$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین

آمده از موش های صحرایی مبتلا به سرطان، به قطعات کروموزومی انسانی متناظرشان منتقل شد. سپس با استفاده از همان پایگاه اطلاعاتی اقدام به تهیه لیست ژن های موجود در نواحی مربوطه نموده و به عنوان ژن های پیش فرض برای بررسی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت.

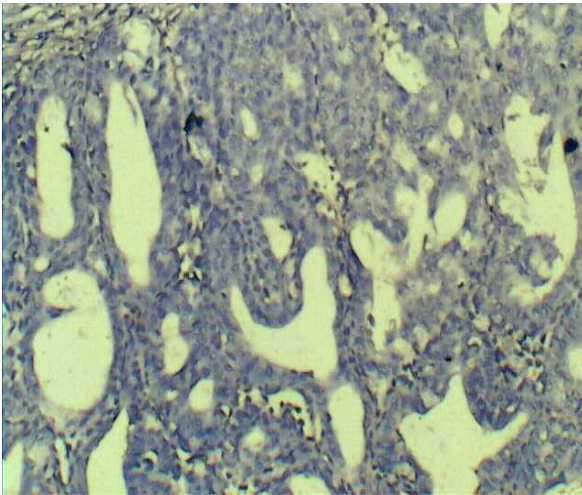
نتایج

نتایج به دست آمده از مطالعه هیستوپاتولوژیکی تومورهای القایی برش های تهیه شده از بافت های طبیعی و توموری با روش هیستوپاتولوژی مورد مطالعه قرار گرفت، که همگی با توجه به خصوصیات مرفولوژیکی بافتی مؤید بافت تومورال بدخیم و از نوع کارسینوما بود. همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می شود مجراها و لوبول ها به صورت جزایری در بافت چربی قرار دارند و در شکل ۱-ب فضاهای غدد مانند و تغییر شکل یافته ای دیده می شود، که به وسیله سلول های اپیتلیال توموری در یک ردیف قرار گرفته اند و تمایل به تمایز غده ای بافت توموری دارند و هر دو از نشانه های تشخیصی آدنو کارسینوما می باشد. در شکل ۱-ج، سلول های توموری نشان دهنده هستک های بزرگ و برجسته و الگوی کروماتینی وزیکولی می باشند. در بررسی پاتولوژیکی، تومورهای مورد مطالعه تمایز یافته، و به صورت دستجات نامنظم سلول های توموری و حالت کپه ای داشته، و تمایز به سمت تشکیل غدد فراوان و پیشرفته داشتند.

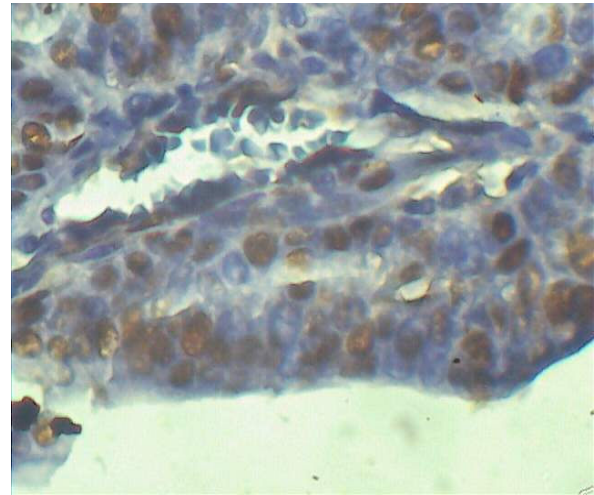
نتایج حاصل از مطالعات ایمنو هیستوشیمی (IHC) توسط

آنتی بادی های P53 و VWF

سلول های توموری با رنگ پذیری شدید هسته ها برای آنتی بادی P53 در شکل ۲ نشان داده شده است. پیکانها مبین سلول های در حال تقسیم میتوزی می باشند که حاوی محصولات ژن P53 جهش یافته می باشند. سلول های تومورال بافت پستان موش صحرایی که با آنتی ژن VWF واکنش مثبت داشتند در شکل ۳ نشان داده شده اند. چنانچه ملاحظه



شکل ۳. سلول‌های تومورال بافت پستان با بزرگنمایی $100\times$ در حضور آنتی‌بادی VWF و ماده‌ی رنگ‌زای DAB دیده می‌شوند.



شکل ۲. سلول‌های اپی‌تلیال در بافت تومورال پستان در واکنش با آنتی‌بادی p53 بزرگنمایی $400\times$ پیکان‌ها مبین سلول‌های توموری می‌باشند.

۶۶ مجموعه از سلول‌های مطالعه شده در مدل کروموزومی دیپلوئیدی (۳۵~۴۸ کروموزوم) و ۴۶ عدد سلول متافازی مطالعه شده در مدل کروموزومی تریپلوئیدی (۵۰~۷۵) و ۵۲ عدد از مجموعه کروموزوم‌های متعلق به سلول‌های سرطانی مطالعه شده که دارای کروموزوم‌های متافازی بودند، نیز در مدل کروموزومی تتراپلوئیدی (۷۸~۸۸) قرار داشتند. این تغییرات عددی نشان می‌دهند که توده‌های سلولی سرطانی تمایل به افزایش عدد کروموزومی به سوی تتراپلوئیدی را دارند. تغییرات کروموزومی ایجاد شده طیف وسیعی از ناهنجاری‌های ساختاری را نیز شامل می‌گردید و به‌طور واضح، کروموزوم‌های شماره ۱، ۳ و ۹ دچار افزایش (gain) و کروموزوم‌های شماره ۸ و ۱۵ دچار گمشدگی (Loss) در تعداد کروموزوم‌ها گردیده بودند (منوزومیک یا نالی زومیک Nullisomic). علاوه بر این، تغییرات ساختاری از جمله حذف‌شدگی در کروموزوم‌های شماره ۲، ۵، ۸، ۱۶ و ۱۹ و اضافه‌شدگی در کروموزوم‌های ۲، ۱۲ و ۱۹ به‌طور غیراتفاقی و مکرر مشاهده شد (جدول ۱ و

مطالعه سیتوژنتیکی تومورهای القایی

آنالیز کروموزومی بر روی اسلایدهای حاوی گستره‌های متافازی تهیه شده از سلول‌های توموری با استفاده از روش G-binding انجام گرفت. بسیاری از دسته‌های کروموزومی در مجموعه‌های سلولی مختلف و به‌طور مکرر و غیراتفاقی دچار تغییرات عددی و یا ساختمانی شده بودند. چنانچه به‌طور میانگین از ۸ رت مبتلا شده به سرطان (دو عدد قبل از نمونه‌برداری مردند)، که دارای تغییرات کروموزومی مشابه بودند، تغییرات سیتوژنتیکی حاصل در مجموعه کروموزوم‌های سلول‌های سرطان به‌طور خلاصه در جدول ۱ نشان داده شده است. تغییرات از نوع HSR که از نظر سیتوژنتیکی نشانه‌ای از فزون‌یابی ژن‌هایی در آن ناحیه می‌باشد، بر روی کروموزوم شماره ۱۰ سلول‌های متافازی گروه تتراپلوئیدی شناسایی گردید (جدول ۱). عدد کروموزومی سلول‌های طبیعی موش صحرایی برابر با $2n=42$ می‌باشد ولی مجموعه سلول‌های سرطانی مطالعه شده در این پژوهش، در سه مدل کروموزومی قرار گرفتند (جدول ۱). از این میان

با توالی های ژنوم انسان (BLAST) شد و مکان های سیتوژنتیکی آنها در کروموزوم های انسانی (جدول ۱) و هم چنین ژن های مستقر در آنها نیز مشخص گردید.

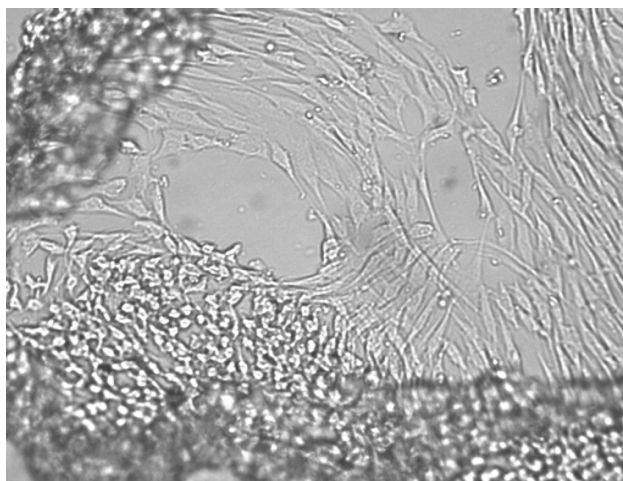
شکل ۷). با استفاده از پایگاه های اطلاعاتی (NCBI) اقدام به مقایسه توالی های نواحی آسیب دیده در کروموزوم های موش صحرایی مبتلا به سرطان پستان

جدول ۱. تغییرات کروموزومی مشاهده شده در سلول های متافازی تومورهای حاصل از القای سرطان در موش های نژاد SD

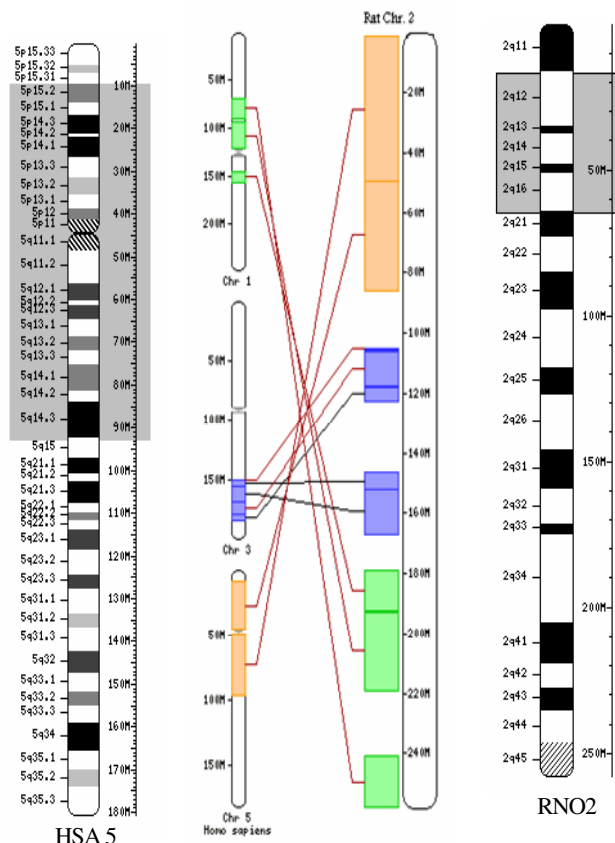
تعداد ژن ها در انسان	همولوژی در انسان	انحرافات عددی		تغییرات ساختاری	تعداد سلول مطالعه شده	عدد کروموزومی		ردیف
		افزایش	کاهش			طف	مدل	
					N=۶۶	۳۵~۴۸	دیپلوئید	
۲۲۲	5(p15.2;q14.3)			Del(2)(q12;q16)	۱۷			۱
۲۶۱	16(q22.2;qter)			Add(19)(q12)	۱۸			۲
-----	پراکنده بر روی کروموزوم های ۳ قطعات ۱۳، ۵، ۸ و ۴			Add(2)(q21;q31),t(3,5)	۳۱			۳
					N=۴۶	۵۰~۷۵	تریپلوئید	
۱۲۴ و ۱۵۰	9(p12;p23), 9(q31;q33)	۱		Del(5)(q22;q32)	۲۵			۴
۷	11(q24;qter)			Del(8)(q12;q21)	۲۱			۵
					N=۵۲	۷۸~۸۸	تراپلوئید	
۱۸۷	قطعات پراکنده بر روی کروموزوم های ۷، ۱۲ و 12(q24.1;qter)	HSR (10)(q24;q26)	۳ و ۹	Add(12q)	۱۷			۶
۸۴	8(p11.1;p21.1)		۸ و ۱۵	Del(16)(q12.1;q12.4)	۱۳			۷
۶۰	16(q12;q21)			Del(19)(p13;p11), mar	۲۲			۸

عملکردی مشخص و معین بود. با بررسی های انجام شده در سایت های معرفی کننده ژن های سرطانی مشخص گردید که، از بین ۱۱۶۵ ژن یافت شده در نواحی تغییر یافته، تعداد ۵۰۶ ژن (۴۳٪) آنها به عنوان ژن های سرطانی به ثبت رسیده اند لذا آنها می توانند به عنوان ژن های کاندید در این ناحیه مورد بررسی مولکولی قرار گیرند.

به عنوان مثال یکی از تغییرات مشاهده شده در جدول ۱ حذف شدگی در بازوی بلند کروموزوم ۲ رت (q12;q16) می باشد که در شکل ۵ با RNO2 نشان داده شده است. این قطعه معادل بخش پروکسیمال بازوهای کوچک و بزرگ کروموزوم ۵ انسانی (HSA5)، با آدرس سیتوژنتیکی (5(p15.2;p14.3) همولوژی دارد (شکل ۵). بر طبق اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI تا زمان انجام این تحقیق حدود ۲۲۲ ژن در این قطعه کروموزومی وجود داشت که دارای



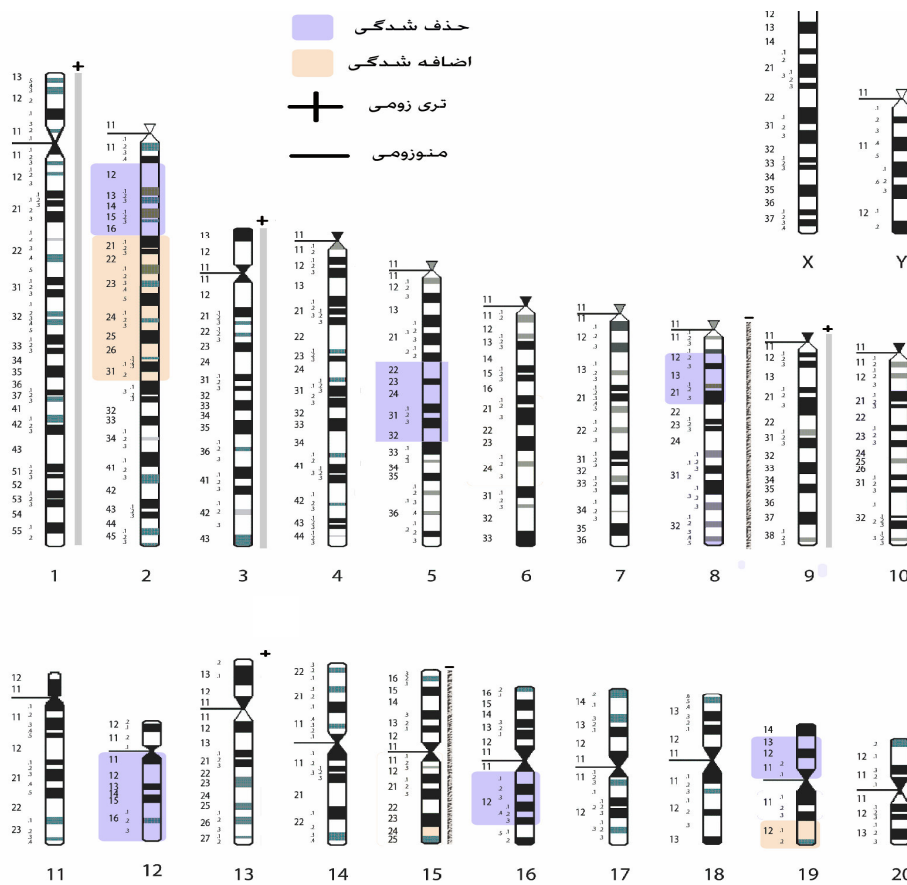
شکل ۴: تصویری از سلول‌های توموری در حال تکثیر و رشد در محیط کشت که برای تهیه اسلایدهای حاوی کروموزوم‌های متافازی استفاده شدند.



شکل ۵. حذف‌شدگی در بازوی بلند کروموزوم ۲ رت (RNO2) را نشان می‌دهد که همولوژی با بخش پروکسیمال بازوهای کوچک و بزرگ کروموزوم ۵ انسانی (HSA5) دارد. ایدئوگرام سمت راست متعلق به رت کروموزوم ۲ می‌باشد که با RNO2 مشخص شده است. تصویر میانی بر اساس مقایسه توالی ناحیه کروموزومی تغییر یافته با توالی‌های ژنوم انسان و یافتن ترادف‌های مشابه رسم گردیده‌است و تصویر سمت چپ نیز ایدئوگرام کروموزوم ۵ انسان (HSA5) را نشان می‌دهد. نواحی تیره رنگ بر روی هر دو ایدئوگرام نواحی مشابه را بر اساس تصویر وسط مشخص نموده است.



شکل ۶. یک مجموعه از کروموزوم های متافازی حاصل از سلول های سرطانی القا شده توسط DMBA که به روش G-banding نواری بندی شده است. بیگان ها حذف در ناحیه (q21-q31) در کروموزوم ۲ (RNO2) موش صحرایی نژاد SD را نشان می دهد



شکل ۷. مجموعه تغییرات ساختاری و عددی مشاهده شده در این پژوهش بر روی ایدئوگرام رت نشان داده شده است.

بحث

بررسی آنتی‌بادی‌های P53 و VWF (VonWillebrand Factor) در این مطالعه دو آنتی‌بادی برای روش IHC به کار برده شد. ژن P53 به عنوان ژن سرکوبگر تومور شناخته شده است. فعالیت این ژن از شکل گیری تومورها جلوگیری می‌کند. در سلول پروتئین P53 به DNA باند شده، و سلول را به ساخت پروتئینی به نام P21 تحریک می‌کند، که با نوعی پروتئین محرک تقسیم سلولی (Cdk2) واکنش دهد. زمانی که P21 با Cdk2 ترکیب شد، سلول نمی‌تواند به مرحله بعد تقسیم سلولی گذر کند. هنگامی که P53 جهش می‌یابد، نمی‌تواند به DNA باند شود، در نتیجه پروتئین P21 به عنوان سیگنال توقف تقسیم سلولی تولید نمی‌شود، و در نتیجه سلول‌ها به طور غیر قابل کنترلی تقسیم می‌شوند و تومور شکل می‌گیرد. در بسیاری از سرطان‌ها جهش‌های مختلف این ژن گزارش شده است، که می‌تواند نشان‌دهنده نقش کلیدی و مؤثر آن در بروز و پیشرفت بیماری‌ها باشد (۱۲). آنتی‌بادی P53، که در آزمایش ایمونوهیستوشیمی این پژوهش استفاده گردید، واکنش شدیدی را با آنتی‌ژن مربوطه در سلول‌های تومورال نشان داد. در حقیقت محصول ژن P53 که در سلول‌های سرطانی دچار تغییر شده‌اند، با این آنتی‌بادی قابل شناسایی است و می‌تواند نشانه دخالت این ژن در پیشرفت بیماری و تغییرات ژنتیکی احتمالی آن باشد (۱۳). نقش اولیه VWF اتصال به سایر پروتئین‌ها به ویژه پروتئینی به نام فاکتور VIII است که در مناطق آسیب دیده اهمیت دارد و در مکانیسم انعقاد خون به ویژه با اتصال به گیرنده‌های موجود در پلاکت نقش اصلی را بازی می‌کند. فاکتور VIII تا زمانی که در چرخه غیرفعال است به VWF باند شده و با عمل ترومبین از آن آزاد می‌شود. این پروتئین در سلول‌های اندوتلیال و مگاکاریوسیت‌ها تولید می‌شود. بیان ایمونوهیستوشیمیایی VWF ابزار مفیدی برای تشخیص تومورهای با منشأ اندوتلیالی است. در فرایند تومورزایی پیشرفته، هم گام با

رشد بافت توموری، فرایند رگ زایی نیز در تومور رخ می‌دهد (۱۴) و بیان VWF نقش مهمی در مکانیسم آنژیوژنز (رگ‌زایی) بافت تومورال دارد. نتایج به دست آمده با این آنتی‌بادی، نشان داد که نمونه تومورال واکنش مثبت شدیدی را دارد بنابر این نمونه توموری استفاده شده برای کشت سلولی و سپس مطالعات سیتوژنتیکی در مرحله رشد کامل و پیشرفته بوده‌اند (۱۵). مطالعه با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی نشان داد که الگوی مثبت بودن واکنش آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌های موجود در تومورهای بافتی استخراج شده از غدد پستانی رت‌های تیمار شده با DMBA که در این پژوهش بکار برده شده است، شباهت کاملی به سرطان پستان ایجاد شده در انسان دارد و از نظر هیستوپاتولوژیکی و ایمونوهیستوشیمی مشابه تومورهای پستانی در انسان می‌باشند، که با نتایج Russo (۷) هماهنگی دارد. بنابراین از دیدگاه ژنتیکی نیز بایستی تشابهات زیادی بین تومورهای پستانی ایجاد شده در رت و تومورهای انسانی وجود داشته باشد که با توجه به تعداد بسیار زیاد مکانیسم‌های ایجاد کننده سرطان و ژن‌های بسیار زیاد دخیل در آن، این امر محتمل به نظر می‌رسد. ولی به هر حال موش صحرایی نژاد SD با توجه به Inbreed بودن از پیچیدگی‌های ژنوم انسان بدور است، و هم چنین بسیاری از فاکتورهای محیطی نیز در مطالعه سرطان مورد نظر نیز حذف و یا کاهش می‌یابد.

مطالعه و مقایسه تغییرات سیتوژنتیکی مشاهده شده

در دهه‌های اخیر، مطالعه بر روی مدل‌های بیولوژیکی که از قرابت‌های ژنتیکی با انسان برخوردار می‌باشند، در بیماری‌های پیچیده ژنتیکی مانند سرطان، توسعه و وسعت زیادی یافته است. این مدل‌های بیولوژیکی که بیماری‌های انسان را تقلید می‌کنند، تفاوت‌های ژنتیکی کمتری با یکدیگر دارند، لذا از پیچیدگی‌های ژنتیکی که مربوط به تفاوت‌های فردی می‌باشد، جلوگیری به عمل می‌آید. دلیل

بر اساس مقالات منتشر شده دلایلی مبنی بر هم‌خوانی تغییرات کروموزومی ایجاد شده در سلول‌های سرطانی در این تحقیق، با ژن‌هایی که به علت اثرشان در بروز سرطانی خاص در گروه ژن‌های سرطانی نام گذاری شده‌اند ارائه می‌گردد. اگرچه دخالت یا عدم دخالت این ژن‌ها و سایر ژن‌های مستقر در این نواحی در بروز سرطان بایستی از نظر آزمایشگاهی مشخص گردد.

حذف‌شدگی در ناحیه ی (q12→q16) کروموزوم ۲

این حذف‌شدگی در شکل ۶ نشان داده شده است. از مجموع ۶۶ سلول دارای مدل کروموزومی دیپلوئید مطالعه شده در این تحقیق که دارای ویژگی‌های مناسب برای آنالیز بودند، ۱۷ سلول (۲۶٪) دارای این تغییر ساختاری بود. این قطعه کروموزومی معادل با بخش پروکسیمال بازوهای کوچک و بزرگ کروموزوم ۵ انسانی (p15.2→q14.3) می‌باشد، این ناحیه حدود ۲۲۲ ژن دارد و بر اساس مقالات بررسی شده دارای ژن‌های مسبب سرطان است که در سرطان‌های مختلف نقش دارند. مثلاً ژن DAB2 [Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)] در سرطان پستان و به‌ویژه در تخمدان به عنوان ژن سرکوبگر تومور عمل می‌کند (۱۶، ۱۷). از آنجایی که ژن‌های سرکوبگر توموری (TSG) هنگامی که دچار حذف‌شدگی باشند، قادر به جلوگیری از بروز تومورها نمی‌باشند و وجود ژن سرکوبگر در ناحیه‌ای که در ناهنجاری‌های گزارش شده در پژوهش حاضر، دچار حذف‌شدگی شده است، تأکید به دخالت مؤثر این قطعه کروموزومی در بروز و پیشرفت سرطان در موش‌های مبتلا دارد، لذا می‌تواند حاوی ژن‌های مهم کاندیدی باشد که برای بررسی و مطالعه دقیق‌تر پیشنهاد می‌شود.

بسیار مهم دیگر آنکه، با توجه به انتشار توالی‌های نوکلئوتیدی موجودات مختلف در پایگاه‌های اطلاعاتی در اینترنت، امکان تعمیم اطلاعات ژنتیکی و تغییرات کروموزومی ایجاد شده در یک موجود بر اثر بیماری به موجود دیگر، فراهم شده است.

در پژوهش حاضر نواحی سیتوژنتیک درگیر در کروموزوم‌های رت تعیین و با نواحی مشابه آن در انسان مقایسه شده است و با توجه به محل این توالی‌ها بر روی کروموزوم‌های انسانی به صورت مقایسه ژنومی و بیوانفورماتیکی و با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی ژن‌های آنها نیز مشخص گردید. سپس برای تایید دخیل بودن مؤثر قطعات کروموزومی گزارش شده و به کمک بررسی مقالات به دست آمده از پایگاه‌های اینترنتی حضور و دخالت برخی از این ژن‌ها در سرطان‌های مختلف انسانی نشان داده شد. این ژن‌ها و هم‌چنین سایر ژن‌های مستقر در این نواحی که عده‌ای از آنها با روش‌های مقایسه ژنومیک بین موش‌های صحرایی و انسان تعیین شده‌اند، برخی دارای عملکرد مشخص در یک موجود می‌باشند و احتمال می‌دهند که همان کارکرد را در موجود دیگر داشته باشند، ولی برخی دیگر از این ژن‌ها، هنوز به صورت نام‌های کدگذاری شده در سایت‌های اینترنتی وجود دارند و فقط به دلیل آنکه ساختاری شبیه به ژن داشته‌اند این کدها به آنها اطلاق شده است و احتمالاً بعدها نام کاملی را به خود اختصاص خواهند داد. تمامی این گروه از ژن‌ها که تعداد زیادی از آنها نیز در سایت‌هایی مانند Atlas of Genetics and Cytogenetics به عنوان ژن‌های سرطانی لقب گرفته‌اند در این مناطق دچار ناهنجاری کروموزومی، مستقر می‌باشند و لذا می‌توانند ژن‌های کاندید مناسبی برای بررسی نحوه اثرشان در سرطان پستان باشند، اگرچه عده‌ای از آنها شناخته شده‌اند ولی بسیاری از آنها نیز ناشناخته می‌باشند. در ذیل به ترتیب ناهنجاری‌های کروموزومی مشاهده شده در رت‌های مبتلا مورد بحث قرار می‌گیرند و

اضافه‌شدگی در بازوی بلند کروموزوم ۱۹ جایگاه (q12)

با مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی، نواحی کروموزومی دچار تغییر در موش‌های صحرایی مورد آزمایش و توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم انسان، نواحی مشابه کروموزومی در انسان مشخص گردید و ژن‌های موجود در این توالی‌ها تعیین شدند. مجموعه این اطلاعات در جدول ۱ نشان داده شده است. این جایگاه سیتوژنتیکی تا زمان انجام این پژوهش دارای حدود ۲۶۱ ژن بوده است که با توجه به مقالات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی ژن‌های سرطانی آن به شرح زیر می‌باشد. ژن CALB2 Calbindin 2 که به‌عنوان یک انکوژن شناخته می‌شود و در سرطان‌های مختلفی نظیر روده بزرگ دخیل می‌باشد (۱۸). از آنجایی که ناحیه سیتوژنتیکی این ژن بر روی کروموزوم ۱۹ رت نیز دچار افزایش گردیده است، لذا می‌تواند نقش مؤثری نیز در بروز سرطان در رت‌های مورد مطالعه داشته باشد. ژن HPR (Haptoglobin-related protein) نیز به‌عنوان یک انکوژن در سرطان‌های اولیه و متاستاتیک پستان در انسان اهمیت دارد، بیان HPR پتانسیل بدخیمی تومور را افزایش می‌دهد (۱۹). اضافه‌شدگی این ناحیه کروموزومی و ارتباط آن با این ژن می‌تواند تأکیدی بر اهمیت این قطعه کروموزومی در بروز سرطان پستان باشد. ژن ZFH3 (Zinc finger homeobox 3) در سرطان‌های پستان (۲۰) و دستگاه گوارش (۲۱) دچار افزایش در بیان پروتئین تحت کنترل خود می‌شود و چون این ناحیه در مطالعه حاضر نیز در محدوده اضافه‌شدگی واقع شده، انتظار می‌رود که با این تغییر، بیان ژن‌های دخیل در این نواحی نیز افزایش یابد و لذا تغییرات سیتوژنتیکی مشاهده شده در این پژوهش تأییدکننده نتایج به‌دست آمده در مقالات فوق بوده و احتمالاً اهمیت این نواحی را در تشکیل و پیشرفت سرطان پستان نیز نشان می‌دهد.

اضافه‌شدگی در قطعه‌ی (q21→q31) کروموزوم شماره ۲

ژن‌های موجود در این بخش از کروموزوم به صورت قطعات مختلفی بر روی کروموزوم‌های شماره ۵، ۸، ۳، ۴ و ۱۳ انسانی قرار گرفته است و به‌دلیل پراکندگی قطعات هومولوگ بر روی کروموزوم‌های انسانی و هم‌چنین کوچک بودن این قطعات، امکان مقایسه توالی بخش‌های هومولوگ بین رت و انسان وجود نداشت.

حذف در کروموزوم ۵ ناحیه (q22→q32)

از ۴۶ سلول تریپلویدی مطالعه شده، ۲۵ سلول دارای این ناهنجاری کروموزومی بودند (جدول ۱). این ناحیه کروموزومی رت معادل بخش p12→p23 بازوی کوچک کروموزوم ۹ انسانی و باندهای q31→q33 از بازوی بلند کروموزوم ۹ انسانی می‌باشد، که به‌ترتیب ۱۵۰ و ۱۲۴ ژن تاکنون در آنها بر اساس پایگاه‌های اطلاعاتی شناسایی شده است. در مقالات بررسی شده، نشان داده شده است که ژن‌های زیر به‌عنوان ژن‌های سرطانی در این قطعه کروموزومی مستقر هستند که در ادامه به ذکر آنها می‌پردازیم. ژن CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) با جایگاه 9p21.3 و 5q32 به‌ترتیب در انسان و رت، به‌عنوان نقطه بازرسی (Checkpoint) در گذر از فاز G1 به S چرخه سلولی میتوزی عمل کرده و هم‌چنین نقش منفی در چسبندگی ماتریکس سلولی داشته و در قطعه قطعه شدن DNA در هنگام آپوپتوز نیز نقش دارد. این ژن هم‌چنین در سرطان‌هایی نظیر سرطان دستگاه گوارش (۲۲) و ریه (۲۳) مؤثر است. در سرطان ریه به‌عنوان ژن سرکوبگر تومور ارتباط آن با ژن RB در تشخیص زود هنگام این سرطان بررسی شده است. مستقر بودن ژن سرکوبگر CDKN2A در ناحیه q32 کروموزوم ۵ رت که در موش‌های صحرایی تیمار شده دچار حذف‌شدگی شده است می‌تواند، تأکیدی بر دخالت این ژن و یا ژن‌های مهم دیگری در این ناحیه، در بروز سرطان پستان در موش‌های تیمار شده باشد. ژن

اضافه شدن بازوی بلند کروموزوم ۱۲ می باشد. این بازوی کروموزومی دارای همولوژی با قطعات مختلفی بر روی کروموزوم های ۲۲، ۱۲ و ۷ انسانی است. که در کروموزوم ۱۲ در قطعه ی (q24.11→qter) با ۱۸۷ ژن بررسی می شود. ولی به علت پراکندگی قطعات بر روی کروموزوم های ۲۲ و ۷ امکان شناسایی ژن های این منطقه نیست. ژن ALDH2 (mitochondrial) (Aldehyde dehydrogenase 2 family) یکی از ژن های مربوط به ناحیه (q24.11→qter) ۱۲ می باشد، که در سرطان مری (۳۴) به عنوان یک انکوژن عمل می نماید. ژن CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains) نیز در این قطعه کروموزومی واقع شده و در سرطان ریه (۳۵) و سرطان قسمت انتهایی روده بزرگ (۳۶) دخالت داشته و نقش انکوژنی دارد. مشاهده اضافه شدگی در ناحیه (q24.11→qter) کروموزوم ۱۲ در موش های تیمار شده در این پژوهش، و وجود گزارش های فراوان مبنی بر وجود ژن های انکوژن در این ناحیه تاکید مکرری بر وجود ژن های کلیدی در این قطعه کروموزومی است که در بروز و پیشرفت سرطان پستان دخالت دارند.

حذف شدگی از ناحیه q12.1 تا q12.4 کروموزوم ۱۶

حذف در ناحیه (q12.1;q12.4) کروموزوم ۱۶ رت معادل بخش های پراکنده ای بر روی بازوی کوچک (p11.1-p21.1) کروموزوم ۸ انسانی با ۸۴ ژن می باشد. تاکنون مشخص شده است که در این قطعه کروموزومی ژن های ASH2L در لوسمی (۳۷)، LSM1 در سرطان پروستات (۳۸) و FGFR1 در آدنوکارسینوما ی پانکراس (۳۹) دخالت دارند. هم چنین کاهش بیان ژن SFRP1 (Secreted frizzled-related protein 1) در سرطان پستان با پیشرفت بیماری و پیش آگهی ضعیف در مراحل اولیه ایجاد تومور، مرتبط اعلام شده است (۴۰، ۴۱). هم چنین مقالات نشان می دهند حذف شدگی در این ناحیه کروموزومی با بروز سرطان مثانه (۳۸)، ارتباط دارد. بنابراین ملاحظه

سرکوب گر توموری AQP3 (Aquaporin 3) نیز که در این ناحیه مستقر است در ایجاد تومورهای پوستی (۲۴)، نقش دارد. هم چنین ژن ALDOB (Aldolase B) در سرطان سلول های هپاتوسیت به عنوان مارکرهای تشخیصی در سطوح پیشرفته و پیش آگهی ضعیف و زود هنگام بیماری عمل می کند (۲۵). ژن ABCA1 (ATP-binding cassette, sub-family A) نیز در سرطان های مانند پروستات (۲۶) و سلول های کارسینومایی هپاتوسیت (۲۷) نقش و دخالت دارد. ژن KLF4 (Kruppel-like factor 4) در سرطان های دستگاه گوارش همانند روده بزرگ (۲۸) مری (۲۹) و انتهای روده بزرگ نقش ژن سرکوب گر تومور را بازی می کند (۳۰)، لذا می توان نتیجه گیری کرد که حضور حداقل سه ژن سرکوبگر در ناحیه (q22→q32) ۵ و اثبات حذف شدگی این ناحیه در موش های مبتلا به سرطان پستان در این تحقیق، نقش و اهمیت قطعه یاد شده و ژن های هدف مهمی که در خود دارد را مشخص می سازد.

حذف شدگی در قطعه (q12→q21) کروموزوم ۸

حذف شدگی در ناحیه (q12→q21) کروموزوم ۸ رت معادل بخش (q24;qter) کروموزوم ۱۱ انسانی می باشد. در این ناحیه، حدود ۷۷ ژن شناسایی شده است و در مقالات بررسی شده فقط ژن HSPA8 (Heat shock 70kDa protein 8) به عنوان ژن سرطانی این ناحیه معرفی شده است. این ژن در سرطان های مختلفی از جمله سرطان پستان (۳۱)، انتهای روده بزرگ (۳۲) و ریه (۳۳)، اثر سرکوبگر توموری دارد. بنابراین حذف در ناحیه ی q12-21 کروموزوم ۸ موش های مبتلا به سرطان پستان در این تحقیق می تواند توجیه کننده ژن سرکوب گر توموری مهمی در این ناحیه باشد.

اضافه شدگی در بازوی بلند کروموزوم 12

از جمله تغییرات مشاهده شده در بین مجموعه کروموزومی سلول های متافازی با مدل تتراپلوئیدی،

که به طور مستقیم در بروز سرطان مربوطه دخیل بوده‌اند نیاز به پروژه‌های تحقیقاتی زیادی بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌باشد. بدین طریق که ژن‌های هر یک از نواحی آسیب‌دیده کروموزومی بر اساس روش‌های Reverse Genetics مورد بررسی دقیق قرار گیرند. در این تحقیق برای بخش‌هایی از کروموزوم که دچار تغییرات مختلف شده‌اند، بیش از ۱۱۶۵ ژن تا زمان نوشتن این مقاله در سایت‌های اینترنتی مختلف (مانند NCBI و Ensembl) شناسایی و گزارش شده است که ساختار ژنی دارند ولی عملکرد بسیاری از آنها ناشناخته می‌باشد. این تغییرات در کروموزوم‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۸، ۹، ۱۲، ۱۶، ۱۵ و ۱۹ موش‌های صحرایی مبتلا به سرطان پستان مشاهده گردید. در هر ناحیه با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی، ژن‌های سرطانی که در سرطان‌های مختلف انسانی دخالت داشته‌اند، آورده شد. در بین این ژن‌ها، ژن‌های زیادی به عنوان ژن‌های سرکوب‌گر توموری مانند DAB2، KLF4، HSPA8، CDKN2A و ژن‌های انکوژن مانند CALB2، HPR، CHFR، ALDH2 وجود داشت و هم‌چنین ژن‌های AQP3، ABCA1، ALDOB، ASH2L، LSM1، FGFR1 و SFRP1 نیز به عنوان ژن‌های دخالت‌کننده و مؤثر در سرطان‌های مختلف معرفی گردیدند. عملکرد این ژن‌ها در سرطان‌های مختلف نشان دهنده نقش مؤثر این ژن‌ها در مکانیسم‌ها و مسیرهای مختلف منتهی به تغییر رفتار سلول طبیعی به سلول سرطانی می‌باشد. ژن‌های شناخته شده و ناشناخته بسیاری در این قطعات کروموزومی مستقر می‌باشد که تغییرات ایجاد شده در آنها مربوط به ژن‌های سرکوب‌گر توموری و یا انکوژن‌های مستقر در آنها بوده و یا در همسایگی آنها ژن‌هایی وجود دارد که این تغییرات را باعث شده‌اند و یا تلفیقی از هر دو مورد می‌باشد. تطابق و همراهی رفتار این گروه از ژن‌ها و محل سیتوژنتیکی آنها با تغییرات کروموزومی مشاهده شده در این پژوهش می‌تواند دلیلی بر نقش احتمالی آنها در بروز و پیشرفت

می‌گردد که در این قطعه کروموزومی تاکنون ژن‌های مهمی کشف شده‌اند که در بروز انواع مختلف سرطان‌ها نقش کلیدی و مهم داشته‌اند. در این تحقیق نیز قطعه q12.1;q12.4 دچار حذف شدگی شده است که می‌تواند محل ژن‌های مهم دیگری باشد که تاکنون کشف نشده‌اند ولی با حذف ال خود در بروز سرطان پستان نقش مهمی دارند.

حذف‌شدگی در قطعه (p11→p13) کروموزوم ۱۹

حذف در ناحیه (p11→p13) کروموزوم ۱۹ رت معادل بخش‌های پراکنده‌ای بر روی بازوی بلند کروموزوم (q21→q12) ۱۶ انسانی می‌باشد. این محدوده دارای ۶۰ ژن است که در جستجو و بررسی مقالات در ارتباط با این ۶۰ ژن، مقاله‌ی خاصی در ارتباط با ژن‌های موجود پیدا نشد. این امر می‌تواند نشان‌دهنده یک تغییر سیتوژنتیکی اختصاصی برای بروز سرطان فقط در موش صحرایی باشد. با توجه به اینکه در تحقیقات و اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی ژن خاصی در این ناحیه تاکنون برای سرطان‌های انسانی پیدا نشده است، تحقیقات بیشتری در این زمینه لازم است.

با استناد به مطالب ذکر شده پیرامون قطعات مستقر در کروموزوم‌های موش صحرایی نژاد SD مبتلا به سرطان پستان (که بر اساس بسیاری از شواهد آزمایشگاهی سرطانی شبیه به سرطان انسانی می‌باشد) می‌توان نتایج این پژوهش را به شکل زیر خلاصه نمود:

ناهنجاری‌های مشاهده شده بر روی کروموزوم‌های مختلف که در این تحقیق ثبت و گزارش شده است، تغییراتی ثابت بوده که در بروز سرطان پستان در رت‌ها مؤثر بوده و لذا بایستی انعکاسی از تغییرات در ژن‌های موجود در این نواحی باشد که به عنوان مثال تعدادی از آنها برای تأکید بر اتفاقات و بازآرایی‌های ژنومی، بیان شده است ولی حقیقتاً برای یافتن ژن‌های این مناطق آسیب دیده

پستانی می‌گردد. ولی برای رسیدن به چنین مرحله‌ای نیاز به مطالعه دقیق با استفاده از تکنیک‌هایی نظیر FISH، توالی DNA و غیره می‌باشد تا رفتار و نقش هر یک از ژن‌های مستقر در نواحی کروموزومی تغییر یافته مورد مطالعه و بررسی دقیق قرار گرفته و هم‌چنین ارتباط آنها با یکدیگر به منظور پیدایش و پیشرفت سرطان پستان مشخص شود.

سرطان پستان در موش‌های تیمار شده باشد. لذا می‌تواند موضوع تحقیقات بیشتری واقع گردد تا نقش دقیق آنها در تومورهای پستانی مشخص گردیده و در نهایت بتوان اقدام به تهیه ووگل-گرام (Vogelstein or Vogelgrams) احتمالی برای سرطان پستان نمود و یا به عبارت دیگر اتفاقات ژنتیکی را توضیح داد که منجر به پیدایش تومورهای

Chromosomal Rearrangement and Bioinformatic Studies of the Involved Genes in DMBA-Induced Breast Cancer in SD Rat Strains and Verification of their Syntenic Segments in Human Chromosomes

Hamta A., Ph.D.^{1*}, Shariatzadeh S. M. A., Ph.D.², Solimani M., Ph.D.³, Saifi, F., M.Sc.⁴

1. Assistant Professor of Molecular Genetics, Biology Dept., Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
2. Professor of Embryology & Histology, Biology Dept., Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
3. Associate Professor of Embryology & Histology, Biology Dept., Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
4. Master of Science in Cell and Developmental Biology

* Corresponding author, e-mail: a-hamta@araku.ac.ir

(Received 19 August 2009 Accepted 13 Jan. 2010)

Abstract

Background & Aims: Breast cancer is the most common malignant neoplasm in women and has an increasing rate in both developed and developing countries. According to Iranian National Cancer Registration report, breast cancer has the first rank in women. Breast cancer is the major cause of mortality in women under 55 years old. The present study was performed to find the most probable involved genes in breast cancer.

Methods: In this work, we have gavaged 10 mg DMBA solved in 0.5 ml sesame oil to the DMBA-treated SD rat strains. Before proceeding to cell culture, samples were verified in pathological and immunohistochemistry approaches, and then we performed metaphase chromosomal preparations and finally performed G-banding staining. The most common chromosomal changes were recorded and genes in affected area were determined and a genes-list by comparing genome of rat and human in chromosomal changed segments were prepared.

Results: Our data showed a wide range of numerical and structural changes in different chromosomes. We found recurrently gain in chromosomes no. 1, 3, 9 and loss in chromosomes no. 8 and 15 and also deletion in chromosomes no. 2, 5, 8, 16, 19 and addition in chromosome no. 2, 12 and 19.

Conclusion: According to these chromosomal changes and based on bio-informatics studies we predicted that the DAB2, KLF4, HSPA8, CDKN2A, CALB2, HPR, CHFR, ALDH2, AQP3, ABCA1, ALDOB, ASH2L, LSM1, FGFR1, HSPA8, ZFH3 and SFRP1 are probably involved in the development of breast cancer.

Keywords: Breast neoplasms, chromosome Aberrations, Chromosome – banding, DMBA, Rats, Inbred strains

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2010; 17(3): 191-207

References

1. Barros ACS, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon CHT, Iriya K, Giocondo G, et al. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz (a) anthracene. *Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo* 2004; 59(5): 257-61.
2. Iranian annual of national cancer registration report. Ministry of health and Medical Center for Disease control noncommunicable Deputyducatin. Cancer control Office. 2004 [Persian].
3. Li D, Wang M., Dhingra K, Hittelman W.N. Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. *Cancer Res* 1996; 56: 287-93.
4. Steele V.E., Moon R.C., Lubet R.A, Grubbs C.J, Reddy B.S, Wargovich M, et al. Preclinical efficacy evaluation of potential chemopreventive agents in animal carcinogenesis models: methods and results from the NCI Chemoprevention Drug Development Program. *J Cell Biochem Suppl* 1994; 56(S20): 32-54.
5. Qing W.G., Conti C.J., LaBate M., Johnston D., Slaga T.J., MacLeod M.C. Induction of mammary cancer and lymphoma by multiple, low oral doses of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 1997; 18(3): 553-9.
6. Russo J, Russo I. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000; 5: 187.
7. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39(1):7-20.
8. Miyata M., Furukawa M., Takahashi K., Gonzalez F.J., Yamazoe Y. Mechanism of 7, 12-Dimethylbenz [a] anthracene- Induced Immunotoxicity: Role of Metabolic Activation at the Target Organ. *Jpn J Pharmacol* 2001; 86(3): 302-9.
9. Dias MF, Sousa E, Cabrita S, Patricio J, Oliveira CF. Chemoprevention of DMBA induced mammary tumors in rats by a combined regimen of alpha tocopherol, selenium, and ascorbic acid. *Breast J* 2000; 16:14-19.
10. Giullino PM, Pettingrew HM, Grantham FIT. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54: 401-14.
11. Calasanz M.J, Cigudosa C.J. Molecular cytogenetics in translational oncology: when chromosomes meet genomics. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(1):20-9.
12. Elledge R.M, Allred D.C. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 32(1): 39-47.
13. Bartley A.N, Ross D.W. Validation of p53 immunohistochemistry as a prognostic factor in breast cancer in clinical practice. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(4): 456-8.
14. Sehested M, Hou-Jensen K. Factor VIII related antigen as an endothelial cell marker in benign and malignant diseases. *Virchows Arch* 1981; 391(2): 217-25.
15. Weidner N, Semple J.P, Welch W.R, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1981; 324(1): 1-8.
16. Sheng Z., Sun W, Elizabeth S, Cynthia C, Sheng Z., Xu X.X. Restoration of positioning control following Disabled-2 expression in ovarian and breast tumor cells. *Oncogene* 2000; 19(42): 4847-54.

17. Mok S.C, Chan W.Y, Wong K.K, Cheung K.K, Lau C.C, Ng S.W, et al. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 1998; 16(18): 2381-7.
18. Vonlanthen S., Kawecki T.J., Betticher D.C., Pfeifferli M., Schwaller B. Heterozygosity of SNP513 in intron 9 of the human calretinin gene (CALB2) is a risk factor for colon cancer. *Anticancer Res* 2007; 27(6C): 4279-88.
19. Shurbaji M.S., Pasternack G.R., Kuhajda F.P. Expression of haptoglobin-related protein in primary and metastatic breast cancers. A longitudinal study of 48 fatal tumors. *Am J Clin Pathol* 1991; 96(2): 238-42.
20. Zhang Z., Yamashita H., Toyama T., Sugiura H., Ando Y., Mita K., et al. ATBF1-a messenger RNA expression is correlated with better prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(1): 191-8.
21. Cho Y.G., Song J.H., Kim C.J., Lee Y.S., Kim S.Y., et al. Genetic alterations of the ATBF1 gene in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(15 Pt 1): 4355-9.
22. Tsujie M., Yamamoto H., Tomita N., Sugita Y., Ohue M., Sakita I., et al. Expression of tumor suppressor gene p16^{INK4} products in primary gastric cancer. *Oncology* 2000; 58(2): 126-36.
23. Ye Y., Su C., Wang D., Guo W., Cheng X., Liu S., Liu Y., Liu B., Cao X., Shan X., Wu M. Relations of tumor suppressor gene p16 and RB to early diagnosis of lung cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2000; 38(12): 885-9.
24. Hara-Chikuma M., Verkman A.S. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Mol Cell Biol* 2008; 28(1): 326-32.
25. Peng S.Y., Lai P.L., Pan H.W., Hsiao L.P., Hsu H.C. Aberrant expression of the glycolytic enzymes aldolase B and type II hexokinase in hepatocellular carcinoma are predictive markers for advanced stage, early recurrence and poor prognosis. *Oncol Rep* 2008; 19(4): 1045-53.
26. Fukuchi J., Hiipakka R.A., Kokontis J.M., Hsu S., Ko A.L., Fitzgerald M.L., et al. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7682-5.
27. Moustafa M.A., Ogino D., Nishimura M., Ueda N., Naito S., Furukawa M., et al. Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and in liver with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2004; 95(6): 530-6.
28. Dang D.T., Chen X., Feng J., Torbenson M., Dang L.H., Yang V.W. Overexpression of Krüppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity." *Oncogene* 2003; 22(22): 3424-30.
29. Wang N., Liu Z.H., Ding F., Wang X.Q., Zhou C.N., Wu M. Down-regulation of gut-enriched Krüppel-like factor expression in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2002; 8(6): 966-70.
30. Zhao W., Hisamuddin I.M., Nandan M.O., Babbin B.A., Lamb N.E., Yang V.W. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 2004; 23(2): 395-402.
31. Håvik B., Bramham C.R. Additive viability-loss following hsp70/hsc70 double

- interference and Hsp90 inhibition in two breast cancer cell lines. *Oncol Rep* 2007; 17(6): 1501-10.
32. Erata G.O, Kanbağlı O., Durlanik O., Bulut T., Toker G., Uysal M. Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein 70 (ihsp 70) in patients with colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35(2): 74-8.
33. Frese S., Schaper M., Kuster J., Miescher D., Jäätelä M., Buehler T., Schmid R. Cell death induced by down-regulation of heat shock protein 70 in lung cancer cell lines is p53-independent and does not require DNA cleavage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126(3): 748-54.
34. Cai L., You N.C., Lu H., Mu L.N., Lu Q.Y., Yu S.Z., Le A.D., Marshall J., Heber D., Zhang Z.F. Dietary selenium intake, aldehyde dehydrogenase-2 and X-ray repair cross-complementing 1 genetic polymorphisms, and the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 106(11): 2345-54.
35. Takeshita M., Koga T., Tkayama K, Kouso H, Nishimura- Ikeda Y, Yoshino I, et al. Early detection and diagnosis CHFR expression is preferentially impaired in smoking-related squamous cell carcinoma of the lung, and the diminished expression significantly harms outcomes. *Int J Cancer* 2008; 123(7): 1623-30.
36. Kang H.C., Kim I.J., Jang S, Hong S, Hwang J, Shin H, et al. Coding region polymorphisms in the CHFR mitotic stress checkpoint gene are associated with colorectal cancer risk. *Cancer Lett* 2008; 260(1): 170-9.
37. Wang J., Zhou Y., Yin B, DU G, Huang X, Li G, et al. ASH2L: alternative splicing and downregulation during induced megakaryocytic differentiation of multipotential leukemia cell lines. *J Mol Med* 2001; 79(7): 399-405.
38. Takahashi S., Suzuki S., Inaguma S, Cho Y-M, Ikeda Y, Hayashi N, et al. Down-regulation of Lsm1 is involved in human prostate cancer progression. *Br J Cancer* 2002; 86(6): 940-6.
39. Kobrin M.S., Yamanaka Y, Friess H, Lopez M.E, Korc M. Aberrant expression of type I fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res* 1993; 53(20): 4741-4.
40. Klopocki E., Kristiansen G., Wild PJ, Klamann I, Castanos -Velez E, Singer G, et al. Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors. *Int J Oncol* 2004; 25(3): 641-9.
41. Stoehr R., Wissmann C., Suzuki H, Knuechel R, Krieg R.C, Klopocki E, et al. Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab Invest* 2004; 84(4): 465-78.

مقاله به فرمت مجله تبدیل و پرینت شد ۸۸/۱۱/۷ فروتن

تأییدیه زده شد

مقاله یک کمی تصحیح شد رفرنس ها و صفحه آرایی ایرانیا ۸۸/۱۱/۸

اصلاح شد ۸۹/۱/۳۱ فروتن

اصلاح انجام شد ۸۹/۲/۸ فروتن

اصلاح شد ۸۹/۲/۱۲ فروتن

اصلاح شد ۸۹/۲/۲۹ فروتن

اصلاح شد ۸۹/۳/۴ تصحیح و صفحه آرایی برای چاپ پرینت شد.