مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی سلول و بافت
جلد ۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ۲۴-۱۷

مطالعه انحرافات کروموزوم ۱۵ در مدل انتخابی مبتلا به سرطان اندومتریال آدنوکارسینوما با استفاده از روش FISH

احمد همتا Ph.D.[1*]، علی رضا شهرجردی M.D.[2]، علی رضا شایسته فر Ph.D.[1]، طاهره نصرآبادی Ph.D.[3]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
۲- دانشگاه پونه بخش علوم پزشکی. هندوستان
۳- دانشکده پرستاری دانشگاه آزاد زاهدان. ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: a-hamta@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۵/۲

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی رفتار ژن‌های موجود در نواحی است که در مسیر بروز و پیشرفت سرطان آندومتریوم دچار تغییر آللیک شده‌اند.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرائی ماده نژاد BDII/Han با نرهای دو نژاد از موش‌های صحرائی که دارای رخداد کمی برای ECA می‌باشند، آمیزش داده شد (SPRD-*Cu3*/Han & BN/Han). برای بدست آوردن زاده‌های نسل دوم، افراد نسل اول با هم آمیزش داده شد و همچنین رت های ماده نسل اول با والد پدری آمیزش داده شد تا زاده‌های بک کراس بدست آیند. به منظور بررسی تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در تمامی ۱۸ تومور مطالعه شده، از روش‌های سیتوژنتیک مولکولی (مانند FISH و Paint) استفاده شد.

نتایج: آنالیز انجام شده توسط تکنیک FISH در تومورها نشان داد که نواحی کوچکی دارای فزونی یابی ژنی می‌باشند.

نتیجه گیری: این تغییرات بطور مخفی می‌باشند به طوریکه در نواحی از کروموزوم که از نظر سیتوژنتیکی طبیعی به نظر می‌رسیدند مشاهده شد. در این پژوهش نشان داده شده که ناهنجاری‌های کروموزومی اختصاصی مانند فزونی‌یابی ژنی، حذف و جابجائی که منجر به تغییرات در نسخه‌های ژنی می‌گردند، در قطعات کوچکی از کروموزوم ۱۵ مشاهده گردیدند.

واژگان کلیدی: اندومتریال آدنوکارسینوما، FISH، Paint، موش صحرائی نژاد BDII.

مقدمه

سرطان آندومتریال (EC) از جمله سرطان‌های شایع در جهان و سومین عامل مرگ و میر بین زنان مبتلا به سرطان می‌باشد که سالانه در کشورهای صنعتی ۳۵۰۰۰ مورد جدید شناسائی می‌گردد. مهمترین نوع آندومتریال آدنوکارسینوما می‌باشد که بطور مشخص در چند دهه یائسگی ایجاد می‌گردد. رت‌های نژاد BDII از نظر ژنتیکی مستعد ایجاد سرطان آندومتریال Endometrial Cancer (EC) می‌باشند و به عنوان مدل‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این تحقیق به منظور آشکارسازی فاکتورهای ژنتیکی مداخله کننده در بروز سرطان آندومتریال از سلول‌های فریز شده برای کشت سلولی و از DNA استخراج شده زاده‌های حاصل از آمیزش طراحی شده مورد استفاده قرار گرفت. در این آمیزش رت‌های نژاد BDII و رت‌هایی که مستعد بروز این سرطان نبودند با یکدیگر کراس داده شدند و زاده‌های آنها با یکدیگر برای تولید نتاج F1 و با والد ماده نژاد BDII خود جهت انجام بک کراس آمیزش داده شدند(۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶). نتایج تحقیقات قبلی نشان داده بود که یک الگوی شایعی از تغییرات کروموزومی در تومورهای در حال رشد قابل مشاهده و ثبت می‌باشد. در این الگو ۶ کروموزوم بطور مشخص دیده می‌شد(۷). یکی از این کروموزوم‌ها کروموزوم شماره ۱۵ می‌باشد که حذف شدگی در بازوی کوتاه و اضافه شدگی در بازوی بلند آن قابل مشاهده می‌باشد. در تحقیق حاضر به منظور بررسی دقیق‌تر این تغییر ساختاری در کروموزوم شماره ۱۵ بر روی سلول‌های حاصل از کشت ۱۸ تومور آندومتریال آدنوکارسینوما Endometrial adenocarcinoma (EAC) با استفاده از روشهای سیتوژنتیک مولکولی مانند (FISH و Paint) بررسی و تحقیق انجام گرفت. با استفاده از این روش‌ها ناهنجاری‌های کروموزومی خاصی مانند جابجائی، حذف، فزونی یابی تشخیص داده شد این تغییرات اغلب در قطعات کوچک کروموزومی، منجر به تغییر در تعداد نسخه‌های ژنی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

نژاد پرورشی BDII مستعد بروز EAC می‌باشد(۸ و ۹). در این تحقیق موش‌های صحرائی ماده نژاد BDII/Han با موش‌های صحرائی نر از دو نژاد BN/Han و SPRD-*Cu3*/Han آمیزش داده شدند. به منظور تولید نسل F2 زاده‌های نسل F1 و برای تولید زاده‌های بک کراس نرهای نسل اول با موش‌های صحرائی ماده والد آمیزش داده شدند. برای مشخص شدن ظهور تومور در زاده‌ها، آنها بطور منظم مورد بررسی و معاینه قرار می‌گرفتند. هنگامی که تومور ظاهر می‌شد موش صحرائی را با رعایت حقوق حیوانات و با استفاده از اتاقک کلروفرم بیهوش نموده و سپس کشته می‌شدند. در این تحقیق ۱۸ تومور جدا شده از موش‌های مبتلا مورد مطالعه قرار گرفت و از نظر پاتولوژیکی نیز EAC تشخیص داده شد. قابل ذکر است که در بین زاده‌ها سایر انواع سرطان آندومتریال مشاهده شد که در این مطالعه مورد استفاده قرار نگرفتند.

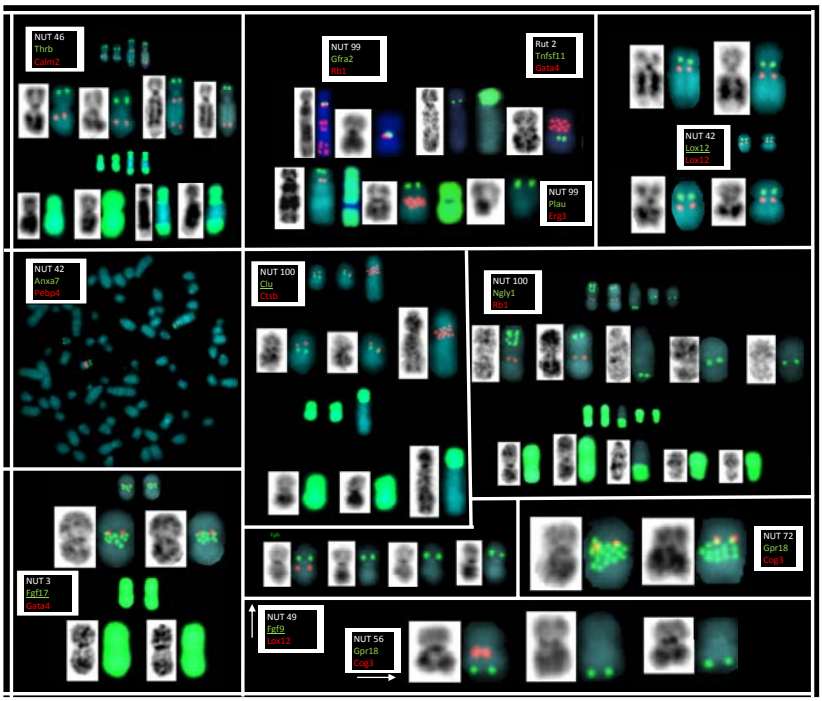
تکنیک‌های *FISH* و *painting*: برای تهیه کروموزوم‌های متافازی، به سلول‌های حاصل از کشت، کلشیسین (۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۰ دقیقه اضافه گردید. هاروست سلول‌ها با تکان دادن شدید فلاسک‌های کشت انجام گردید و سپس سلول‌ها توسط عمل سانتریفوژ ته نشین شدند. پلیت سلولی حاصل در ۰/۰۷۵ مول کلرید پتاسیم مجددا معلق گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در هوای آزمایشگاه قرار گرفت. عمل فیکس شدن سلول‌ها با فیکساتیو کارنوی (۱۰) انجام گرفت. اسلایدهای تهیه شده در هوای آزمایشگاه خشک شد و در الکل ۷۰درصد و در ۲۰- سانتی‌گراد تا زمان استفاده شدن نگهداری گردید. تکنیک Fluorescence in situ hybridization (FISH) به روش پینکل (۱۱) و با کمی اصلاحات انجام گرفت. کلون‌های BAC حامل ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از برنامه بک- فایندر در پایگاه اطلاعاتی Ratmap و به آدرس اینترنتی (http://ratmap.org/bacfinder/bacfinder/) تعیین گردید و سپس از BACPACorders@chori.org. خریداری شد. کلون‌های بک توسط بیوتین و دایگوکسینان (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) و با استفاده از روش نیک ترنسلیشن Nick translation (Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A) و در درجه حرارت ۱۶ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۹۰ دقیقه انجام گرفت. (Nick Translation System, GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD) پراب‌ها همراه با DNA موش صحرائی سونیکیت شده رسوب داده شد و دوباره در ۲۰ میلی‌لیتر بافر هیبریداسیون شامل فرمآمید ۵۰ درصد، سولفات دکستران ۱۰ درصد، و saline-sodium citrate (2xSSC) حل گردید. پراب‌ها برای مدت ۵ دقیقه در ۷۵ درجه سانتی‌گراد دناتوره شدند و بطور دو تایی به اسلایدهای حاوی کروموزوم‌های متافازی که قبلا در فرمآمید ۷۰ درصد و 2xSSC

برای مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد دناتوره شده بودند، اضافه گردید. هیبریداسیون پراب‌ها در اتاق مرطوب و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و به دنبال آن در فرمآمید ۵۰ درصد و 2xSSC به مدت ۱۵ دقیقه و در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد شستشو گردید. آشکارسازی پراب‌ها توسط اضافه کردن fluorescein isothiocyanate (FITC) کنجوگیت با آودین و رودامین آنتی‌دایگوکسی نین (Oncor inc, Gaithersburg, MD) انجام گرفت. سرانجام کروموزوم‌ها توسط DAPI (۶-۴-Diamidino-2-phenylindole) رنگ آمیزی گردید و تصاویر دیجیتالی متافازهای رنگ آمیزی شده با DAPI، FITC و رودامین توسط دوربین CCD تهیه گردید و آنالیز کروموزوم‌ها بوسیله نرم افزار لایکا Leica Q-FISH انجام شد. از آنجائیکه پراب اختصاصی Paint برای کروموزوم ۱۵ موش صحرائی (RNO15) وجود ندارد لذا از پراب‌های اختصاصی کروموزوم ۱۴ موش خانگی Mus musculus, (MMU14) برای این منظور استفاده شد. Cambio Ltd Cambridge CB23 8AR England. لازم به ذکر است که کروموزوم ۱۴ موش (MMU14) همولوژی زیادی با کروموزوم ۱۵ موش صحرائی Rattus norvegicus (RNO15) دارد (۱۲).

نتایج

به عنوان اولین مرحله، جهت مطالعه انحرافات کروموزوم ۱۵ در EAC روش سیتوژنتیک سنتی و سیتوژنتیک مولکولی با همدیگر ترکیب گردید. کروموزوم ۱۵ نرمال و یا نزدیک به حالت طبیعی به آسانی توسط روش G-banding قابل شناسائی می‌باشد. اما چون کروموزوم ۱۵، کروموزوم نسبتا کوچکی می‌باشد و همچنین مشخصه باندی منحصر به فردی ندارد لذا اغلب موارد شناسایی قطعاتی از آن در کروموزوم‌های مرتب شده، بسیار مشکل است. یک راه برای تعیین وجود این قطعات در ساختار کروموزوم‌های مارکر آن است که از پراب اختصاصی Paint برای کروموزوم ۱۵ استفاده گردد. متاسفانه پراب کروموزوم ۱۵ همراه با کروموزوم‌های ۱۳ و ۱۴ عرضه می‌گردد و چون سایز آنها بسیار بهم نزدیک است نمی‌توان آنها را بر اساس جدا کننده دستگاه فلوسایتومتر (Fluorescence-activated cell sorting) از هم جدا کرد. چون کروموزوم ۱۵ با کروموزوم ۱۴ موش (MMU۱۴) همولوژی دارد و بنابراین از نظر توالی با هم همپوشانی دارند (۱۳ و ۱۴) بنابراین توالی paint اختصاصی کروموزوم ۱۴ موش می‌تواند تمام طول کروموزوم ۱۵ موش صحرائی را رنگ نماید که از آنها به عنوان قطعات مثبت کروموزومی نام برده می‌شود. در این تحقیق پراب paint کروموزوم ۱۴ موش برای مجموعه ۱۸ تایی از تومورهای EAC بکار برده شد. بر اساس نتایج بدست آمده آرایش کروموزوم ۱۵ در هر یک از تومورها قابل شناسائی بود. نتایج نشان داد که اکثریت کروموزوم‌های پینت مثبت paint-positive به ظاهر کروموزوم‌های ۱۵ سالمی بودند همچنین کروموزوم‌های مشتق شده از کروموزوم ۱۵ (RNO15-derived) نیز بطور آشکار دچار نو آرائی مختلف، شامل حذف یا جابجایی شده بودند (شکل ۱). مجموعه‌ای از BAC ها که شامل ژن‌های مستقر بر کروموزوم ۱۵ بود برای تکنیک dual-color FISH بکار برده شد. به دلیل آنکه پراب‌ها تمامی طول کروموزوم ۱۵ را می‌پوشاندند لذا در این تحقیق این امکان فراهم شد تا قطعات مختلف این کروموزوم در تومورها مورد بررسی قرار گیرد و همچنین محل احتمالی شکستن کروموزوم ۱۵ در تومورهای مختلف هنگامی که یک کروموزوم مارکر مشتق شده از کروموزوم ۱۵ بوجود آمده بود، قابل شناسائی باشد. در بررسی کروموزوم‌ها اغلب موارد یک نوع مارکر خاص دیده می‌شد که گاهی نیمی از کروموزوم حذف (مارکر نوع حذفی) و یا اینکه به انتهای یک کروموزومی غیر از کروموزوم ۱۵ منتقل شده بود (مارکر نوع جابجایی). مثال‌هایی از این مارکرها در شکل ۱ مشاهده می‌شود که در آن نمونه‌های NUT 12 و RUT2 مارکرهای نوع جابجایی را نشان می‌دهد. آنالیز با پراب‌های اختصاصی ژن‌ها نشان داد که بیشتر این مارکرهای دارای حذف شدگی (۸ تا از ۱۲ نمونه) بعد از ایجاد شکستگی در ناحیه بسیار باریکی بین ژن‌های Fgf9 و Gata4 بوجود آمده است. این کروموزوم‌های مارکر برای تمامی ژن‌ها بکار رفته که بین ژن Gata4 (۴۲ Mb) و تلومر بازوی بلند کروموزوم (۱۰۹Mb) قرار دارند مثبت بوده در حالی که برای ژن‌های آزمایش شده‌ای که بین تلومر بازوی کوتاه کروموزوم ۱۵ (۰Mb) و ژن Fgf9 (۳۷Mb) قرار گرفته‌اند، منفی می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گیری کرد که در فاصله بین این دو ژن (Fgf9 و Gata4) با فاصله‌ای برابر با ۵Mb احتمالا نقطه شکستی وجود دارد. آنالیز نیمه کمی اطلاعات بدست آمده از تکنیک FISH نشان داد که برخی از ژن‌ها دارای افزایش تعداد نسخه‌های ژنی

داشتند در حقیقت ۹ تا از نمونه‌ها فزونی یابی ژنی برای یک یا چند ژن را در کروموزوم نشان دادند. گاهی این فزونی یابی به صورت خوشه‌ای از سیگنال‌ها بوده و گاهی تعداد این نسخه‌های ژنی متعادل تر بوده و معمولا بین ۱۰ تا ۳۰ افزایش تعداد را نشان می‌داد که مثال‌هایی از آن در شکل ۱ قابل مشاهده است. فزونی یابی اغلب در ناحیه سانترومر بازوی بلند کروموزوم ۱۵ دیده شد که ژن‌های Egr3 و Fgf17 که به ترتیب در ۵۰ Mb و ۵۱ Mb قرار دارند و در چند مورد نیز ژن Gfra2 (۵۱/۳Mb) این فزونی یابی را نشان داد. در دو نمونه مورد مطالعه ناحیه فزونی یابی در محل سانترومر و در ناحیه کوچکی بودند (RUT3, NUT72) و در برخی دیگر ناحیه فزونی یابی فقط یک ژن را شامل می‌شد. این بدین معنی است که این ناحیه بایستی طولی برابر با ۱ Mb و یا کمتر داشته باشد. این ناحیه فزونی یابی سانترومری، که شایع ترین حالت بین تومورهای مورد مطالعه را دارد در ۸ مورد از ۹ نمونه این فزونی یابی مشاهده گردید. فزونی یابی در سه ناحیه کروموزومی دیگر نیز مشاهده گردید: الف) در ۲ نمونه توموری، فزونی‌یابی در ژن Thrb مشاهده شد که در فاصله ۹/۳ Mb از تلومر بازوی کوتاه قرار داشت. ب) در یک نمونه توموری فزونی یابی در ژن Gata4 واقع در ۴۲ Mb کروموزوم ۱۵ مشاهده گردید و ج) در ۲ نمونه توموری فزونی یابی در ژن (۱۰۹ Mb) Fgf14 انجام شده بود که نزدیک به نوک بازوی بلند کروموزم قرار دارد. در تمامی این تومورها بجز یکی از دو نمونه ناحیه ج، فزونی یابی همچنین در ناحیه سانترومری کروموزوم نیز قابل مشاهده بود. قابل ذکر است که فزونی یابی بیشتر در کروموزوم هایی مشاهده می‌شد که از نظر شکل ظاهری کروموزوم در نواربندی G طبیعی به نظر می‌رسیدند. به عنوان یکی از مهمترین ژن‌های سرطانی در این تحقیق، به رفتار ژن Rb1 در این سرطان پرداخته شد. این ژن درست در زیر سانترومر کروموزوم ۱۵ که بیشترین فزونی یابی ها در این ناحیه باریک مشاهده می شود، قرار دارد. در یکی از نمونه‌های مطالعه شده (NUT99) این ژن دارای فزونی یابی بود. بدلیل آنکه در این تومور سایر فزونی یابی‌های ژنی مشاهده گردیده است لذا فزونی یابی ژن Rb1 کومپلیفیکاسیون نمی‌باشد. چون نسخه های اضافی Rb1 بر روی کروموزوم مارکر جداگانه ای نیز دیده می‌شد. (شکل ۱).



شکل ۱: نمونه‌هایی از اطلاعات بدست آمده از تکنیک FISH و Paint بر روی تومورهای EAC

ژن های مورد استفاده در این تحقیق همراه با راهنمای رنگ های آنها و همچنین نام برخی از تومورهای آنالیز شده در شکل نشان داده شده است. هیبریداسیون های مشاهده شده مربوط به ۹ تومور مختلف می‌باشد. چهار نمونه فزونی یابی ژنی و بقیه حداقل حذف یک آلل را نشان می‌دهند. قابل ذکر است که در بیشتر فزونی یابی‌ها هیچ علامت سیتوژنتیکی قابل مشاهده و تشخیص نمی‌باشد، مانند Homogeneously staining regions (Hsr) و فزونی یابی در کروموزوم های ۱۵ که طبیعی به نظر می رسیدند مشاهده می شد. در بسیاری از موارد فزونی یابی ژنی در نزدیکی لوکوس ژن دیده می‌شد، (مانند ژن Fgf17 در NUT3)، ولی در برخی دیگر از نمونه‌ها فزونی یابی ژنی بر روی کروموزوم پخش بودند، (مانند ژن Gpr18 در NUT72.

ولی آنچه که بیشتر در تومورها مشاهده می گردید این است که تعداد نسخه‌های ژن Rb1 در تومورها کاهش یافته بود. چنانچه در برخی از سلول‌های متعلق به ۱۱ تومور هیچ گونه سیگنالی برای ژن Rb1 و همچنین برای برخی از ژن‌های همسایه آن مانند (Htr2a, Tnfsf11) مشاهده نگردید. احتمالا این نشانه وقوع یک حذف هموزیگوت در ناحیه کوچکی (۵۹ Mb-۵۴) از کروموزوم ۱۵ می‌باشد. معمولا در تومورها فقدان سیگنال، تنها در زیر گروهی از جمعیت سلولی دیده می‌شد اما در تومور (RUT2) در هیچ یک از سلول‌های توموری سیگنالی برای ژن Rb1 مشاهده نگردید.

بحث

یافته‌های روش Comparative genomic (CGH) hybridization بر روی تومورهای EAC نشان داده است که RNO15 به کررات دچار انحرافات کروموزومی شده است بطوریکه حذف در بازوی کوتاه و محل قرارگیری تغییرات copy number در بازوی بلند کروموزوم بوقوع پیوسته است (۲ و ۷). در مطالعه قبلی یک مجموعه ۳۶ تائی از مارکرهای میکروساتلیت که طول کروموزوم ۱۵ (RNO15) را می پوشانند برای بررسی عدم تعادل آلیلیک Allelic imbalance (AI) مورد استفاده قرار گرفت (۱۵). در آن مطالعه چهار ناحیه کروموزومی که تحت تاثیر AI قرار گرفته بودند شناسائی گردید. دو ناحیه در بخش دیستال بازوی کوتاه، یک ناحیه در بخش میانی کروموزوم که احتمالا شامل سانترومر نیز می گردید و ناحیه چهارم در قسمت دیستال بازوی بلند کروموزوم واقع شده بود. در تحقیق حاضر ۲۱ ژن مستقر در این ناحیه مورد بررسی دقیق تر قرار گرفته است. آنالیز اطلاعات بدست آمده با استفاده از روش FISH نشان داد که محل قرار گیری تغییرات Copy number که در بازوی کوتاه کروموزوم مشاهده می‌شد بعلت تشکیل کروموزوم‌های مارکری بوده است که شامل بخش کوچکی از بازوی بلند کروموزوم یعنی تا محل ژن (۴۲ Mb) Gata4 می‌باشد. شکستگی کروموزوم ۱۵ که منجر به تشکیل این کروموزوم‌های مارکر گردیده است در قطعه کوچکی از کروموزوم قرار گرفته است. در حال حاضر اهمیت این کروموزوم مارکر در فرایند تشکیل سرطان را نمی‌توان حدس زد و نیاز به مطالعات دقیق‌تر دارد. با این وجود، یک احتمال آن است که افزایش نسخه‌های ژنی مشاهده شده در این تحقیق، احتمالا در تشکیل و پیشرفت سرطان EAC نقش کلیدی دارد. احتمال دیگر آن است که شکستگی که این کروموزوم‌های مارکر را بوجود می‌آورد موجب غیر فعال شدن یک ژن سرکوبگر توموری می‌گردد که در این جایگاه سیتوژنتیکی قرار گرفته و در حال حاضر ناشناخته است. وقوع یک فزونی یابی ژنی مخفی در کروموزوم ۱۵ بسیار مهم به نظر می‌رسد. چنانچه فزونی یابی ژنی معمولا همراه با برخی علائم سیتوژنتیکی خاص به وقوع می‌پیوندد. به عنوان مثال وجود homogeneously staining regions (hsr) یا نواحی رنگ آمیزی شده بطور یکنواخت در کروموزوم متافازی نوار بندی شده به روش G-banding و یا مشاهده دابل ماینوت (Double minutes) از جمله علائم سیتوژنتیکی هستند که نشانه فزونی یابی ژنی در نظر گرفته می‌شوند (۱۶). اما فزونی یابی ژنی مشاهده شده در کروموزوم ۱۵ (تحقیق حاضر) کاملا متفاوت به نظر می‌رسد. چنانچه در بیشتر موارد این فزونی یابی در جایگاه سیتوژنتیکی ژن و یا نزدیک به آن اتفاق افتاده است و منجر به هیچگونه تغییر آشکاری در مورفولوژی کروموزوم مربوطه نگردیده است. در یک مورد (ژن‌های Plau و Thrb در تومور NUT100) توالی فزونی یافته در طول کروموزوم مهاجرت کرده بطوریکه سیگنال های حاصل از ژن در سرتاسر کروموزوم ۱۵ مشاهده می‌شود ولی با این حال هیچگونه تغییر مورفولوژیکی در طول کروموزوم قابل مشاهده نمی‌باشد. قابل ذکر است که اکثریت فزونی یابی های مشاهده شد در بین پراب‌هایی که برای روش FISH بکار رفته است در منطقه III شناسائی شده در طول کروموزوم قرار دارد. در حقیقت اگر فرض کنیم که تمامی ۸ فزونی یابی مشاهده شده در ناحیه سانترومر یک هدف یکسانی داشته است، آن هدف بایستی در بین دو جایگاه ژنی Egr3 و Fgf17 قرار گرفته باشد. بر اساس جستجوی انجام شده در پایگاه های اطلاعاتی ژنومی، در این قطعه کروموزومی ۱۴ ژن شناخته شده تا زمان انجام این تحقیق وجود داشته است که تاکنون دخالت ۵ تای آنها در بروز سرطان‌های مختلف به اثبات رسیده است. همچنین سایر فزونی یابی های ژنی مشاهده شده در این تحقیق در سایر نواحی دارای AI قرار می‌گیرد. چنانچه دو فزونی یابی مشاهده شده برای ژن Thrb در ناحیه I و فزونی یابی مربوط به Gata4 در ناحیه III همچنین دو فزونی یابی مربوط به ژن Fgf14 در منطقه IV مستقر می‌باشد.

جدول ۱: وقوع فزونی یابی پنهان ژنی در ۱۳ نمونه تومور EAC. Am نشاندهنده فزونی یابی ژنی، ND نشاندهنده عدم وجود اطلاعات.

نام ژن	Mb	RUT3	NUT49	NUT56	NUT72	NUT100	NUT42	NUT46	NUT99	RUT2	NUT12	RUT30	NUT128	NUT50
15PTER	۰/۰													
Plau	۰/۴	*	*	*	*	Am	*	*	*	*	*	*	*	*
Anxa7	۴/۵	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ND	*	*
Thrb	۹/۳	Am	*	*	*	Am	*	*	*	*	*	*	*	*
Ngly1	۱۰/۷	*	*	*	ND	*	*	*	*	*	*	ND	*	*
Fhit	۱۷/۰	Am	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gmfb	۲۲/۷	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Apex1	۲۷/۰	*	ND	*	*	*	*	*	*	ND	*	*	*	*
Cebpe	۳۲/۰	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cideb	۳۳/۹	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Fgf9	۳۸/۰	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Gata4	۴۲/۰	*	*	*	Am	*	*	*	*	Am	*	*	*	*
Ctsb	۴۲/۴	*	*	*	Am	*	Am	*	*	Am	*	*	*	Am
Clu	۴۵/۰	Am	*	*	Am	*	*	*	*	*	*	*	*	*
15CEN	UN													
Loxl2	۵۰/۰۲	*	*	*	Am	*	*	*	*	Am	*	*	*	Am
Pebp4	۵۰/۳۴	Am	Am	*	*	*	*	*	*	Am	*	*	Am	*
Egr3	۵۰/۵	Am	*	*	Am	*	*	*	Am	Am	Am	Am	*	*
Bmp1	۵۰/۹	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Fgf17	۵۱/۰	*	*	*	Am	Am	*	*	Am	Am	Am	Am	*	Am
Gfra2	۵۱/۳	*	*	*	*	Am	*	*	*	*	*	*	*	*
Rb1	۵۴/۰	*	*	*	*	*	*	*	Am	*	*	*	*	*
Htr2a	۵۵/۵	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cog3	۵۶/۶	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tnfsf11	۵۹/۰	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Calm2	۶۴/۰	*	*	*	*	*	*	*	*	*	ND	*	*	*
Uchl3	۸۵/۶	ND	*	*	*	ND	*	*	*	*	ND	*	ND	*
Gpr18	۱۰۷/۰	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Fgf14	۱۰۹/۰	*	*	*	*	*	*	*	Am	*	*	*	Am	*
15QTER	۱۰۹/۷													

نتیجه گیری

آنالیز با روش CGH نشان داده بود کروموزوم ۱۵ محل تغییرات copy number در تومورهای EAC می باشد(۲). این تغییرات توسط روش FISH مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نشان داده شد که چندین مکانیسم مختلف (مانند حذف شدگی، جابجائی یک جانبه و فزونی یابی ژنی) در کروموزوم فعال گردیده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر محمدی جهت کمک در تهیه برخی از BAC ها مورد استفاده در این پژوهش و همچنین سرکار خانم فاطمه صدری که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Behboudi A, Levan G, Hedrich HJ, Klinga-Levan K. High-density marker loss of heterozygosity analysis of rat chromosome 10 in endometrial adenocarcinoma. Genes, Chromosomes and Cancer. 2001; 32: 330-341.

2. Helou KA, Walentinsson B, BeckmannÅ, Johansson H J, et al. Klinga-Levan and G. Levan. Analysis of genetic changes in rat endometrial carcinomas by means of comparative genome hybridization. Cancer Genetics and Cytogenetics. 2001; 127(2): 118-127.

3. Karlsson ÅK, Helou A, Walentinsson HJ, Hedrich C, et al. Amplification of Mycn, Ddx1, Rrm2, and Odc1 in rat uterine endometrial carcinomas. Genes, Chromosomes and Cancer. 2001; 31(4): 345-356.

4. Roshani LD, Wedekind J, Szpirer Z, Taib C, et al. Genetic identification of multiple susceptibility genes involved in the development of endometrial carcinoma in a rat model. International Journal of Cancer. 2001; 94(6): 795-799.

5.Walentinsson AK, Helou V, Wallenius H J, Hedrich C, et al. Independent amplification of two gene clusters on chromosome 4 in rat endometrial cancer: identification and molecular characterization. Cancer Research. 2001; 61(22): 8263-8273.

6. Roshani LP, Mallon E, Sjostrand D, Wedekind J, et al. Genetic analysis of susceptibility to endometrial adenocarcinoma in the BDII rat model. Cancer Genetics and Cytogenetics. 2005; 158: 137-141.

7. Hamta A, Adamovic T, Helou K, Levan G. Cytogenetic aberrations patterns in spontaneous endometrial adenocarcinomas in a rat model as revealed by chromosome banding and comparative genome hybridization. Cancer Genet Cytogenet. 2005; 159(2): 123-8.

8. Deerberg F, Kaspareit J. Endometrial carcinoma in BDII/Han rats: model of a spontaneous hormone-dependent tumor." Journal of the National Cancer Institute. 1987; 78: 1245-1251.

9. Kaspareit-Rittinghausen J, Deerberg F, Rapp K. Mortality and incidence of spontaneous neoplasms in BDII/Han rats." Zeitschrift für Versuchstierkunde. 1987; 30(5-6): 209-216.

10. Islam MQ, Levan G. A new fixation procedure for improved quality G-bands in routine cytogenetic work. Hereditas. 1987; 107: 127-130.

11. Pinkel DJ, Landegent C, Collins J, Fuscose R, et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specefic libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4." Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America. 1988; 85: 9138-9142.

12. Helou K, Walentinsson A, LevanG, Ståhl F. Between rat and mouse zoo-FISH reveals 49 chromosomal segments that have been conserved in evolution . *Mammalian Genome*. 2001; 12(10): 765-771

13. Grützner F, Himmelbauer H, Paulsen M, Ropers HH, Haaf T. Comparative mapping of mouse and rat chromosomes by fluorescence in situ hybridization. Genomics. 1999; 55(3): 306-313.

14. Helou K, Walentinsson A, Levan G, Stahl F. Between rat and mouse zoo-FISH reveals 49 chromosomal segments that have been conserved in evolution. Mammalian Genome. 2001; 12(10): 765-771.

15.Hamta A,Talebbeigy F. Recurrent Regional Allelic Imbalance in Chromosome 15 inRat Endometrial Adenocarcinomas. Yakhteh Medical Journal. 2010; 12(1), : 59-72.

16. Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. Seminars in Cancer Biology. 1999; 9(4): 319-325.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2011; 2(1): 17-24 *Research Article*

FISH study of chromosome 15 in a model effected with endometrial adenocarcinoma cancer

Hamta A, Ph.D.[1*], Shahrjerdie AR, Ph.D.[2], Shayesteh far AR, Ph.D.[1],

Nasr Abadie T, Ph.D.[3]

1- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2- University of Pune. Dept Medical Sciences. M.D. India

3- Member Faculty Zahedan Islamic Azad University Iran

* Email corresponding author: a-hamta@araku.ac.ir

Received: 14 Mar. 2011 Accepted: 24 Jul. 2011

Abstract

Aim: Main goal of this investigation were verification of gene's behavior which located on RNO15 with allelic imbalance during Endometrium cancer development.

Material and methods: BDII/Han females were crossed to males from two other inbred rat strains known to have low incidence of EAC (BN/Han and SPRD-Cu3/Han). To generate F2 rats the F1 animals were intercrossed. In addition, backcross populations were generated by crossing male F1 rats to female BDII rats. In order to characterize these tumor-specific genetic aberrations in greater detail, we applied molecular cytogenetic methods (FISH, chromosome painting) to 18 rat endometrial adenocarcinoma (EAC) cell cultures.

Results: Analysis in the tumors by FISH analysis showed the presence of small regions of amplifications.

Conclusion: These changes were cryptic so that they occurred inside cytogenetically normal-looking chromosomes. We detected rather specific chromosome aberrations (translocations, deletions, amplifications) often leading to copy number changes in small DNA segments (gains, losses).

Keywords: Endometrial adenocarcinoma, FISH, Paint, BDII inbred rat.