



استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک و سیتوژنتیک مولکولی در بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی سلول‌های سرطان پوست القائی در رت‌های نژاد SD

احمد همتا: دانشیار ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران (✉ نویسنده مسئول) a-hamta@araku.ac.ir
آیدا همتا: دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

سرطان پوست،
رت نژاد SD،
تغییرات کروموزومی،
نواربندی گیمسا،
فیش

زمینه و هدف: یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیقات در سرطان شناسی کشف تغییرات کروموزومی است که در تشکیل سلول‌های نئوپلاستیک و تومورهای بدخیم دخالت دارد. سرطان پوست در ایران بر طبق گزارش کشوری رتبه اول را در بین زنان ایران دارد. در این تحقیق به مطالعه سرطان پوست القایی در موش‌های نژاد SD پرداخته می‌شود و با روش‌های اینفورماتیک نواحی مشابه آنها در کروموزوم‌های انسان و همچنین مهم‌ترین ژن‌های کاندید در آن نواحی گزارش می‌گردد.

روش کار: در این پژوهش از موش صحرایی نژاد SD به عنوان مدل حیوانی جهت القاء سرطان پوست استفاده گردید که طی آن ۱۰ mg از ماده کارسینوژنیک DMBA محلول شده در روغن کنجد به رت‌های تحت تیمار به روش زیر جلدی تزریق گردید. از تومورهای بدست آمده برای کشت سلولی و تهیه کروموزوم‌های متافازی استفاده شد. بعد از رنگ‌آمیزی به روش GTG، کروموزوم‌های متافازی رنگ شده با ایدئوگرام موش صحرایی طبیعی مقایسه گردید. با مطالعه کروموزوم‌های متافازی، مشترک‌ترین تغییرات کروموزومی بین مجموعه‌های کروموزومی ثبت گردید. بر اساس چگونگی تغییرات و محل آن‌ها و با کمک پایگاه‌های اطلاعاتی، لیستی از ژن‌ها و همچنین نقش احتمالی آن‌ها با توجه به روش مقایسه ژنومیک بین موش صحرایی و انسان تهیه شد.

یافته‌ها: تغییرات کروموزومی ایجاد شده طیف وسیعی از ناهنجاری‌های عدی و ساختاری را شامل گردید و بطور واضح، قطعاتی از کروموزوم‌های شماره ۵، ۸ و ۹ دچار حذف شدگی و همچنین بخش‌هایی از کروموزوم شماره ۷ دچار اضافه شدگی ساختاری گردیده بودند. همچنین با استفاده از روش سیتوژنتیک مولکولی فیش کاهش تعداد نسخه‌های ژنی در ژن‌های CDKN2B و KLF4 در کروموزوم ۵ رت‌های تیمار شده نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: با استفاده از روش‌های مقایسه ژنومیک و مطالعه مقالات علمی در ارتباط با ژن‌های مستقر در نواحی کروموزومی تغییر یافته، پیشنهاد می‌گردد که ژن‌های *EEF1A1*, *CCND3*, *DFFA*, *DFFA*, *CNR2*, *CDC2L1*, *CASP9*, *CDKN2B*, *SLC31A1*, *KLF4*, *TUSC2*, *TGFBR2*, *MLH1*, *GPX1*, *DAG1*, *PTK2*, *ASAP1* و *ELAVL2* احتمالاً می‌توانند از جمله مهم‌ترین ژن‌ها در بروز سرطان پوست در مدل ایجاد شده باشند، لذا این گروه از ژن‌ها و ژن‌های مرتبط با آن‌ها برای مطالعات بیشتر و دقیق‌تر بطور کاندید پیشنهاد می‌گردند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: دانشگاه اراک

شیوه استناد به این مقاله:

Hamta A, Hamta A. Use of bioinformatics and molecular cytogenetic method to investigate the chromosomal abnormalities of induced skin cancer cells in SD rats. Razi J Med Sci. 2020;26(12):9-20.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

Use of bioinformatics and molecular cytogenetic method to investigate the chromosomal abnormalities of induced skin cancer cells in SD rats

Ahmad Hamta, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Arak, Arak, Iran (*Corresponding author) a-hamta@araku.ac.ir

Ayda Hamta, Medical Student, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background: One of the most important research objectives in the field of cancer is the discovery of chromosomal changes involved in the formation of neoplastic cells and malignant tumors. According to the country report, skin cancer in Iran is ranked first among Iranian's women. In this research, we will study skin induced skin cancer in SD mice and will report similar areas in human chromosomes and also the most important candidate genes in those regions.

Methods: In this study, SD rats were used as an animal model for induction of skin cancer in which 10 mg of carcinogens DMBA soluble in sesame oil were injected subcutaneously to rats. The tumors were obtained for cell culture and the preparation of meta-phasic chromosomes. After staining with GTG method, banding chromosomes in meta-phasic stage were compared with the normal rats' ideogram. By examining metaphase chromosomes, the most common chromosomal changes were recorded between chromosomal sets. Based on their changes and location and with the help of databases, a list of genes and their possible role were made according to the genomic comparison method between rats and humans.

Results: The results of the chromosomal changes included a wide range of abnormalities, and clearly, fragments of chromosomes number 5, 8 and 9 were eliminated, and also parts of chromosome number 7 were subject to chromosomal structural addition. Also, using the cytogenetic molecular method of the FISH, reduction of copy numbers in the CDKN2B and KLF4 genes was shown in the chromosome 5 of the treated rats.

Conclusion: Through using genomic comparison methods and studying scientific articles about the genes based on modified chromosomal regions, it is suggested that the genes including *CASP9*, *CDC2L1*, *CNR2*, *DFFA*, *DFFA*, *CCND3*, *EEF1A1*, *ASAP1*, *PTK2*, *DAG1*, *GPXI*, *MLH1*, *TGFBR2*, *TUSC2*, *KLF4*, *SLC31A1*, *CDKN2B*, *ELAVL2* and *FANCG* may be one of the most important genes in the development of skin cancer in our model, so this group of genes and related genes are suggested for more and more accurate studies.

Conflicts of interest: None

Funding: Arak University

Keywords

Breast cancer,
SD rat,
Chromosomal changes,
G-banding,
FISH

Received: 31/08/2019

Accepted: 01/02/2020

Cite this article as:

Hamta A, Hamta A. Use of bioinformatics and molecular cytogenetic method to investigate the chromosomal abnormalities of induced skin cancer cells in SD rats. Razi J Med Sci. 2020;26(12):9-20.

*This work is published under [CC BY-NC-SA 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).



کاندید معرفی شده پرداخته می شود.

روش کار

رت‌های نر از نژاد SD (Sprague dawley) با میانگین وزنی (10 ± 150) از موسسه سرم‌سازی رازی خریداری شد. قبل از شروع آزمایش، جهت سازگاری حیوانات با محیط به مدت یک هفته و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت $22 \pm 3^\circ\text{C}$ و دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌ها در اتاق حیوانات نگهداری شدند. ۲۰ عدد موش صحرایی از جنس نر از نژاد SD وقتی به سن ۵۴ - ۵۰ روزگی رسیدند به‌طور اتفاقی ۱۰ به دو گروه ده تایی (کنترل و تیمار) تقسیم شدند. به گروه تیمار: یک دوز ۲ mg DMBA حل شده در ۰/۵ ml روغن کنجد به صورت زیر جلدی و به گروه کنترل ۰/۵ ml روغن کنجد زیر جلدی تزریق گردید. این دارو ۲ بار در طول ۲ هفته متوالی، و در روز و ساعت مشخص به حیوان خورانده شد. رت‌ها هر روز از نظر ایجاد تومور مورد بازرسی و کنترل قرار گرفتند. پس از پایان دوره تیمار و رسیدن تومور به قطر ۱۵ میلی‌متر، توسط دی‌اتیل اتر بیهوش شدند، ناحیه اطراف تومور را تراشیده و پس از ایجاد برش و در شرایط استریل تومور را بطور کامل خارج کرده و برای کشت استفاده گردید.

پس از خارج نمودن تومورها، آن‌ها را به فالکون حاوی ۱۰ mL از محیط HBSS، منتقل شد و پس از ریز کردن قطعات بافت به فالکون ۱۵ ml دیگری منتقل کرده و با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند، سپس محلول رویی را دور ریخته و محیط کشت DMEM حاوی ۱۰% FBS اضافه شد و به فلاسک‌های ۲۵ mL منتقل گردید. تمامی مراحل ذکر شده، با رعایت شرایط استریل و در زیر هود لامینار انجام پذیرفت. برای افزایش کروموزوم‌های متافازی در محیط کشت (mitotic index) حدود ۴۰ mL از محلول کلشی سین $10 \mu\text{g/mL}$ به محیط کشت داخل فلاسک اضافه شد و بمدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفت. بعد از جدا سازی سلول‌های کشت شده از

سرطان پوست شایعترین سرطان در جهان می‌باشد (۱) و بر اساس تازه‌ترین نتایج برنامه ثبت سرطان در کشور، ۵۲ درصد سرطان‌ها در مردان و حدود ۴۸ درصد آنها در زنان دیده می‌شود. سرطان پوست رتبه اول در بین مردان و رتبه دوم در بین زنان را به خود اختصاص داده است (۲). بطور کلی سالانه ۵۰ میلیون مرگ در جهان روی می‌دهد که بیش از ۵ میلیون از آنها به انواع مختلف سرطان نسبت داده می‌شود (۳). یکی از مهمترین اهداف تحقیقات در سرطان شناسی کشف تغییرات کروموزومی است که در تشکیل سلول‌های نئوپلاستیک و تومورهای بدخیم دخالت دارند می‌باشد، بازآرایی کروموزومی مسئول بخش بزرگی از جهش‌های است که منجر به بی‌نظمی در عملکرد ژن‌ها می‌گردد و از اهداف اصلی در مطالعات سیتوژنتیک مولکولی است (۴). سرطان زایی یک روند ژنتیکی می‌باشد و منجر به تغییر شکل و رفتار سلول خواهد شد. شناسایی و ارزیابی این ناهنجاری‌ها در سطح مولکولی می‌تواند اولین وسیله برای تشخیص و کنترل این ضایعات باشد. تعیین اختلالات کروموزومی می‌تواند در پیش بینی رفتار سلول و تعیین میزان بقاء بیمار به ما کمک کند (۵).

DMBA (Dimethylbenz[a]anthracene - 12, 7) یک کارسینوژن آزمایشگاهی ویژه آلی و جزء هیدروکربورهای اروماتیک چند حلقه ای (PAH) می‌باشد (۶). این ماده در آزمایشگاه صرفاً جهت تومورزایی در حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌گردد. در این تحقیق به مطالعه سرطان پوست ایجاد شده در موش‌های نژاد SD پرداخته می‌شود و برخی از تغییرات ساختاری در کروموزم‌های متافازی تهیه شده از کشت سلول‌های سرطانی گزارش می‌گردد و سپس با استفاده از روش‌های اینفورماتیک نواحی مشابه آنها در کروموزوم‌های انسان مورد شناسایی قرار گرفته و ژن‌های کاندید که احتمالاً در بروز سرطان پوست دخالت دارند پیشنهاد می‌گیرد و نهایتاً با استفاده از تکنیک FISH به مطالعه دقیق‌تر برخی از ژن‌های

نواربندی گیمسا ابتدا لام‌ها به مدت ۱۰-۳۰ ثانیه درون تریپسین ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از آن به مدت چند ثانیه داخل بافر PBS سرد شستشو شدند. سپس لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول رنگ گیمسای آماده قرار داده شده و پس از شستشو با بافر PBS و خشک شدن در هوای اتاق جهت مشاهده باندها به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از انجام مراحل فوق، با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus از کروموزوم‌های فیکس شده روی لام عکس برداری صورت گرفت. برای آنالیز کروموزوم‌های رنگ آمیزی شده به روش نواربندی G از نرم افزار Leica CW 4000 استفاده شد.

تکنیک (Fluorescence in situ FISH hybridization): تکنیک FISH بر اساس روش به کار رفته توسط Pinkel و همکاران انجام گرفت (۷).

کلون‌های BAC پس از استخراج از باکتری E.coli به عنوان میزبان به وسیله biotin و digoxigenin با استفاده از روش nick translation به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد نشاندار شد. سپس پروب‌های نشاندار توسط مقادیر اضافی از DNA سونیکه شده رت رسوب داده شده و پس از آن در ۲۰ میکرولیتر بافر هیبریدیزاسیون حاوی ۵۰٪ Formamide، 10% Dextran sulfate و 2x SSC حل شد. بعد از دناتوراسیون به مدت ۵ دقیقه در ۷۵ درجه سانتی گراد، پروب‌ها به صورت جفت-جفت (یک پروب نشاندار شده با Digoxigenin و یک پروب نشاندار شده با Biotin) به کروموزوم‌هایی که از قبل در 70% Formamide و 2x SSC به مدت ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد آماده شده بود اضافه گشت. هیبریدیزاسیون در یک اتاق مرطوب به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت. سپس شستشو در 50% Formamide و 2x SSC به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و پس از آن در 2x SSC در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. ردیابی پروب با افزودن آویدین متصل به FITC و Anti-Digoxigenin نشاندار شده با رودامین انجام شد. سپس کروموزوم‌ها با DAPI رنگ آمیزی شده و آنالیز توسط میکروسکوپ فلئورسنس (Olympus X51) مجهز به فیلترهای مخصوص FITC، رودامین و DAPI (در

فلاسک، داخل لوله سانتریفوژ ریخته شدند و با دور ۱۲۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند و بر روی رسوب محلول ۰/۰۷۵M KCl اضافه گردید و ۴۰ دقیقه در هوای اتاق قرار گرفت. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی را دور ریخته و روی رسوب فیکساتیو کارنوی (فیکساتیو ۱ قسمت اسیداستیک و ۳ قسمت متانول) اضافه شد و سپس سانتریفوژ گردید. این عمل ۳ بار تکرار شد. بعد از آن مقداری از فیکساتیو را بر رسوب باقی گذاشته و رسوب در فیکساتیو دوباره معلق گردید. سپس حدود ۳-۴ قطره محلول را با پیپت پاستور و از فاصله ۳۰ cm بر روی لام شستشو شده در اتانول انداخته شد و جهت رنگ‌آمیزی ابتدا لام‌ها را درون تریپسین ۳۷ °C به مدت ۱۰-۳۰ ثانیه قرار داده و سپس جهت شستشو به ظرف حاوی بافر سرد PBS منتقل گردید و سپس در محلول رنگ گیمسا آماده به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و در نهایت با بافر PBS مجدداً شستشو گردید و پس از خشک شدن زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX41 از مجموعه‌های کروموزومی دارای شرایط مطلوب برای مطالعات بعدی عکس گرفته شد. سپس عکس‌های حاوی کروموزوم‌های متافازی به وسیله نرم‌افزار Leica CW4000 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

پس از یافتن قطعات کروموزومی تغییر یافت در موش‌های تیمار شده، اقدام به یافتن قطعات مشابه کروموزومی در کروموزوم‌های انسانی، با استفاده از سایت‌های معتبرمانند NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) و Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html) گردید.

جهت بررسی ژن‌های CDKN2B و KLF4 اقدام به استفاده از روش FISH گردید. روش هیبریدیزاسیون فلئورسنت درجا (FISH) کاربردهای فراوانی در تشخیص انیوپلوئیدی، تشخیص کروموزوم‌های نامتعادل حاصل از حذف یا جابه‌جایی‌ها و همچنین شناسایی تغییرات در تعداد نسخه‌های ژنی دارد.

رنگ آمیزی و عکس‌برداری از کروموزوم‌ها: با استفاده از روش رنگ آمیزی G.Banding، همه کروموزوم‌ها الگوبندی خاص نوار خود را خواهد داشت و به باندهای تیره و روشن رنگ آمیزی می‌گردند، برای رنگ آمیزی با

ترکیب با برنامه Q-FISH برای میکروفوتوگرافی) و با استفاده از نرم افزار Leica CW 4000 انجام پذیرفت.

یافته‌ها

در این پژوهش تغییرات کروموزومی در تومورهای القائی در حال رشد با استفاده از روش نواریندی G مورد مطالعه قرار گرفت.

این مطالعات نشان داد که برخی از نواحی کروموزومی به طور مکرر در مجموعه‌های سلولی مختلف دچار تغییراتی، مانند افزایش (تریزومی، آمپلیفیکاسیون) یا کاهش در نسخه‌های ژنی (مانند حذف شدگی) گردیده‌اند. بررسی بر روی اسلایدهای حاوی کروموزوم‌ها متافازی تهیه شده از تومورهای القائی کشت داده شده، انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که عدد کروموزومی سلول‌های مطالعه شده در دو مد کروموزومی قرار می‌گیرد که در آن ۵۰ سلول دارای مد کروموزومی تریپلوئیدی و ۴۷ سلول دارای مد کروموزومی تتراپلوئیدی بودند.

ناهنجاری‌های متعددی در ساختار و عدد کروموزومی مجموعه‌های کروموزومی مطالعه شده مشاهده گردید. ولی تغییراتی که بیشترین فراوانی در مجموعه‌های کروموزومی را داشتند و به وضوح تکرار آنها اتفاقی نبود در جدول ۱ جمع آوری شده است.

با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی قطعات سینتینیک syntenic مکان‌های سیتوژنتیکی مشاهده شده در موش‌های مبتلا به سرطان پوست (جدول ۱) برای

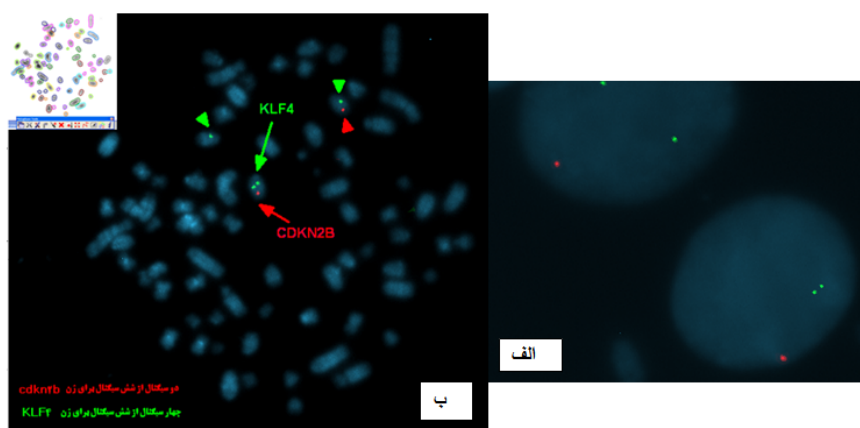
کروموزوم‌های انسان نیز مشخص گردید. به منظور بررسی ژن‌های کاندیدا معرفی شده در این پژوهش دو ژن متعلق به ناحیه دچار حذف شدگی 5 (q21-q32) del برای بررسی با روش سیتوژنتیکی مولکولی FISH انتخاب گردید و از BAC‌های حاوی این دو ژن استفاده گردید و نتایج بدست آمده در شکل یک نشان داده شده است. در تصویر الف از شکل ۱ در هر سلول اینترفازی دو سیگنال برای ژن KLF4 به رنگ سبز و یک سیگنال برای ژن CDKN2B با رنگ سبز مشاهده می‌گردد. در تصویر ب نیز چهار سیگنال سبز برای ژن KLF4 و دو سیگنال قرمز از ژن CDKN2B در مجموعه کروموزومی تری پلوئیدی مشاهده می‌گردد. همچنین زیر مجموعه‌های کروموزومی هم یافت شدند که تعداد نسخه ژنی بیشتری را از دست داده بودند و به وضوح تعداد آنها از تعداد سلول‌های ذکر شده کمتر بود چنانچه از ۳۵ سلول مطالعه شده به روش فیش که دارای شرایط مناسب هیبریداسیون و همچنین پخش کروموزومی بودند، ۲۸ عدد در دسته اول (۸۰ درصد) و ۷ عدد در دسته دوم (۲۰ درصد) قرار گرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج قبلی بدست آمده از مطالعات هیستوپاتولوژیکی مولفین (۸) که تأیید کننده مطالعات Russo و همکارانش بود و طبق آن نتیجه گرفته شد تومور ایجاد شده در موش‌های تیمار شده از نوع

جدول ۱- تغییرات مشاهده شده در سلول‌های تومور پوستی القایی در موش و همولوژی قطعات مربوطه در کروموزوم‌های انسان

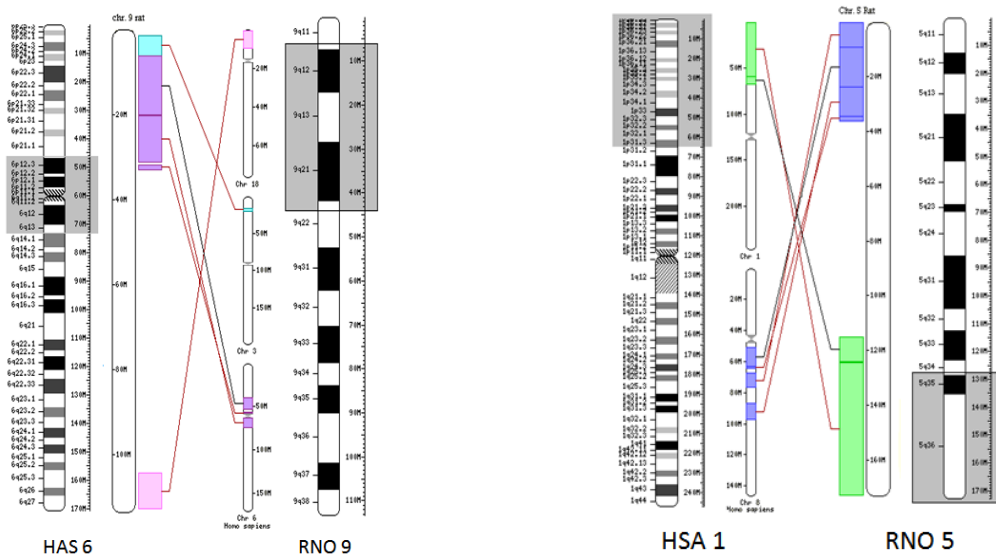
تعداد ژن‌ها در انسان	همولوژی در انسان		تغییرات ساختاری	انحرافات عددی		تعداد سلول		عدد کروموزومی
	کاهش	افزایش		مطالعه شده	مدل	طیف		
N= 50 تری پلوئید ۵۱~۷۵								
557			5 del(q35-q36)			۳۱		۱
182			9 del(q12-q21)			۱۹		۲
N= 47 تترا پلوئید ۷۸~۸۸								
169			7 add(q31-q34)	۶		۱۷		۳
217								
170			8 del(q31-q32)	۴		۱۳		۴
174								
107			5 del(q21-q32)			۱۷		۵
102								
25								



شکل ۱- تصویر سمت راست انجام روش سیتولوژیکی مولکولی فیش بر روی سلول توموری در حالت اینترفاز و در سمت چپ انجام روش یاد شده بر روی کروموزوم های متافازی بدست آمده از سلول های توموری در این پژوهش را نشان می دهد. چنانچه ملاحظه می گردد هر دو ژن کاندید تعداد سیگنال کمتری نسبت به عدد کروموزومی سلول نشان می دهند. مجموعه کروموزوم های متافازی مورد مطالعه با رنگ آمیزی G-banding نیز در بالا، گوشه سمت چپ آورده شده است.

انسانی را نشان داد (۸)، لذا پیش بینی می‌شود، از لحاظ مکانیسم‌های ژنتیکی دخیل در تومور زائی نیز شباهت‌های زیادی با مکانیسم‌های مشابه در انسان داشته باشند. نتایج سیتوژنتیکی بدست آمده نشان داد که عدد کروموزومی سلول‌های مطالعه شده در دو مد کروموزومی قرار دارند که در آن ۵۰ سلول مطالعه شده دارای مد کروموزومی تریپلوئیدی و ۴۷ سلول دارای مد کروموزومی تتراپلوئیدی بودند (جدول ۱). این تغییرات عددی نشان می‌دهند که توده‌های سلولی سرطانی تمایل به افزایش عدد کروموزومی به سوی پلوئیدی شدن را دارند چنانچه حدود ۴۵ درصد سلول‌ها دارای چنین مدل کروموزومی می‌باشند و ۴۸ درصد عدد کروموزومی نرمال و بقیه طیف متغیری از آنیوپلوئیدی را دارا بودند. با مقایسه نواحی سیتوژنتیک در گیر در کروموزوم‌های رت با نواحی مشابه آن در انسان نواحی سینتیک مربوطه مشخص گردیده و ژن‌های مستقر در ناحیه که دارای عملکرد مشخص بودند از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی تعیین گردیدند. در بررسی مقالات بدست آمده از پایگاه‌های اینترنتی حضور و دخالت برخی از این ژن‌ها در سرطان‌های مختلف انسانی به اثبات رسیده است، لذا آن‌ها می‌توانند به عنوان ژن‌های کاندید، برای بررسی دخالتشان در سرطان پوست مورد بررسی و تحقیق قرار گیرند که در ذیل به تعدادی از آنها اشاره می‌شود.

تومورهای بدخیم کارسینومای سنگفرشی بوده و شباهت کامل با تومورهای مشابه در انسان دارد چنانچه در سایر مقالات نیز این مورد تأیید شده است (۹). چنانچه به دلیل درون همسری آنها از نظر ژنتیکی شباهت زیادی با همدیگر دارند و از تفاوت‌های ژنتیکی فردی جلوگیری به عمل خواهد آمد و همچنین تأثیر عوامل محیطی و تغذیه‌ای در بیماران به کمترین حد خود خواهد رسید. این مدل‌ها قادر به تقلید بیماری‌های انسان از جمله سرطان می‌باشند. عقیده بر این است که پیدایش سرطان در نتیجه آسیب‌های ژنتیکی چندگانه در ژنوم می‌باشد. برخی از این آسیب‌ها منجر به تغییر تعداد نسخه‌های ژنی در سطح DNA می‌شوند. فزونی یا بی‌انکوزن‌ها و حذف ژن‌های جلوگیری کننده از تومورها، از جمله فاکتورهای مهم در سرطان‌زائی و اغلب با پیشرفت رشد تومور و پیش آگاهی ضعیف همراه می‌باشد. فزونی یا بی‌ژنی می‌تواند باعث بی‌نظمی عملکردی در کارکرد طبیعی ژن‌هایی شود که در وظایف مختلف سلولی دخالت دارند. تعیین و مشخص سازی چنین ژن‌هایی، ابزار مولکولی با ارزشی را برای ارزیابی پروگنوزیس و درمان سرطان ایجاد خواهد نمود (۱۱). نتایج بدست آمده از مشاهده مستقیم بافت‌ها در زیر میکروسکوپ نوری شباهت بسیار زیاد نمونه‌های مورد مطالعه با تومورهای پوستی از نوع کارسینومای بدخیم



شکل ۲- در شکل سمت راست، ناحیه خاکستری حذف‌شدگی را در ناحیه دیستال بازوی بلند کروموزوم ۵ رت را نشان می‌دهد که از ۱۳۰ Mbp تا ۱۷۰ Mbp و معادل $\delta del(q35-q36)$ می‌باشد و در شکل وسط همولوگ این نواحی را در کروموزوم‌های انسانی و در شکل سمت چپ نیز این ناحیه در ایدئوگرام کروموزوم ۱ انسانی بصورت خاکستری نشان داده شده است.

شکل ۳- در شکل سمت راست، ناحیه خاکستری حذف‌شدگی را در ناحیه پروکسیمال کروموزوم شماره ۹ رت را نشان می‌دهد که از ۶ Mbp تا ۴۴ Mbp و معادل $q12$ تا $q21$ می‌باشد و در شکل وسط، همولوگ این نواحی را در کروموزوم انسانی و در شکل سمت چپ این نواحی را به رنگ خاکستری بر روی ایدئوگرام کروموزوم ۶ انسانی، مشخص شده است.

حذف در قطعه (q35-q36) کروموزوم ۵: طبق جدول ۱ به عنوان اولین ناهنجاری ساختاری گزارش شده، می‌توان به حذف در بخش دیستال بازوی بلند کروموزوم ۵ $\delta del(q35-q36)$ اشاره نمود. این ناحیه با داشتن سینتینی با قطعه (p36-p31.3) کروموزوم یک انسان (شکل ۲) می‌تواند نشان دهنده دخالت برخی از ژن‌های مستقر در این ناحیه باشد که در روند ایجاد و پیشرفت تومورهای مختلف مؤثر می‌باشند. بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی این ناحیه دارای حدود ۵۵۴ ژن می‌باشد.

احتمالاً برخی از ژن‌های این ناحیه نیز در روند ایجاد و پیشرفت تومورها دخالت داشته‌اند؛ و در زیر به برخی از این ژن‌ها اشاره می‌کنیم.

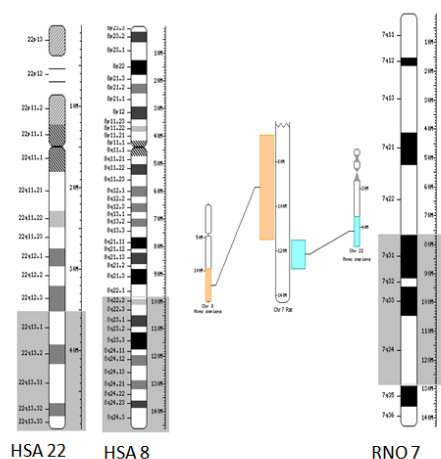
ژن (caspase 9, apoptosis-related CASP9 cysteine peptidase): با توجه به نتایج بدست آمده این ژن در ناحیه 5q36 رت می‌باشد که این ژن در انسان در لوکوس 1p36.21 قرار دارد. این ژن در آپوپتوز نقش دارد و کاهش بیان این ژن در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان روده (۱۲) دخیل است. لذا می‌تواند به

عنوان ژن کاندید برای دخالت در بروز سرطان پوست مورد آنالیز دقیق‌تر قرار گیرد.

ژن (cell division cycle 2-like 1 CDC2L1 (PITSLRE proteins)): در بررسی سیتوژنتیکی انجام شده این ژن در ناحیه 5q36 رت می‌باشد که این ژن در انسان در لوکوس 1p36.33 مکان‌یابی شده است. این ژن نیز در آپوپتوز نقش دارد و حذف بازوی کوتاه در کروموزوم ۱ انسان موجب به کاهش بیان یا نبود برخی پروتئین از جمله ژن CDC2L1 گشته که در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان سینه‌ها (۱۳) دخیل است.

ژن (cannabinoid receptor 2 CNR2 (macrophage)): در بررسی‌های انجام شده در پایگاه‌های اطلاعاتی ژن CNR2 در رت در ناحیه 5q36 می‌باشد که این ژن در انسان در مکان 1p36.11 قرار دارد و در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان پستان به عنوان آنتی تومور عمل کرده (۱۴) و حذف آن موجب پیشرفت سرطان می‌شود.

ژن (DNA fragmentation factor, 45kDa, DFFA)



شکل ۴- در شکل سمت راست، ناحیه خاکستری اضافه‌شدگی مشاهده شده در کروموزوم ۷ رت را نشان می‌دهد که از ۷۵Mbp تا ۱۳۰ Mbp می‌باشد و در شکل وسط همولوگ این نواحی را در مقایسه با کروموزوم‌های انسانی و در سمت چپ نیز همولوگ این نواحی در کروموزوم ۸ و ۲۲ انسانی نشان داده شده است.

تغییر یافته در سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد که اضافه‌شدگی ایجاد شده بطور اتفاقی نبوده است، بلکه تغییرات به وجود آمده در ژن‌های این ناحیه، موجب مشاهده تغییرات ماکروسکوپی کروموزوم‌های متافازی گردیده است، لذا این ژن به عنوان یکی از ژن‌های هدف در ناحیه که دچار ناهنجاری شده می‌تواند مورد بررسی بیشتر توسط روش‌های دقیق‌تر واقع گردد و همچنین احتمال وجود ژن‌های مهم دیگری در این ناحیه از کروموزوم هشت انسانی وجود دارد و پیشنهاد می‌گردد، این ناحیه کروموزومی توسط نشانگرهای ژنتیکی مورد مطالعه دقیق‌تر قرار گیرند تا بدین طریق بتوان ژن‌های این نواحی را با دقت بیشتری مورد مطالعه قرار داد، تا بتوان برخی از ژن‌های مؤثر در بروز و پیشرفت بیماری را تعیین نمود.

ژن PTK2 (PTK2 protein tyrosine kinase 2): این از نظر جایگاه سیتوژنتیکی در موش صحرایی در مکان q34۷ و در انسان در ناحیه 8q24.3 مکان یابی شده است. این ژن با نام FAK نیز در مقالات به کار می‌رود. بیان این ژن اغلب در تومورهای جامد انسانی به خصوص در کارسینومای اولیه روده و در متاستاز روده و کلیه افزایش شدیدی می‌یابد (۱۹).

به دلیل اضافه‌شدگی به کروموزوم ۷ در رت در اکثر

(alpha polypeptide) از جمله ژن‌های ناحیه 5q36 در موش صحرایی است که این ژن در انسان در مکان 1p36.22 قرار دارد و این ژن با نام مستعار ICAD در مقالات به کار می‌رود؛ و در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان مری میزان بیان این ژن در Stage های بالا کم می‌باشد (۱۵).

حذف در قطعه (q12-q21) کروموزوم ۹: در مطالعات انجام شده حذف در قسمت پروکسیمال (q12-q21) از کروموزوم ۹ موش صحرایی که مترادف با بخش‌های پروکسیمال دو بازوی کروموزوم ۶ انسانی می‌باشد (شکل ۳)، دیده شده است. این ناحیه حدود ۱۸۲ ژن دارد و از ژن‌های مطالعه شده در این بخش به موارد ذیل اشاره می‌شود.

ژن CCND3 (cyclin D3): ژن cyclin D3 از جمله ژن‌های ناحیه 8q24 رت می‌باشد که این ژن در انسان در مکان سیتولوژیکی 6p21.1 قرار دارد و در سرطان رحم (۱۶) دخیل می‌باشد.

ژن EEF1A1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1): این ژن از جمله ژن‌های ناحیه 8q31 رت می‌باشد که این ژن در انسان در مکان 6q13 قرار دارد و این ژن یک انکوژن می‌باشد و در بافت نرمال تولید نمی‌شود و در سرطان پرستات (۱۷) دخیل می‌باشد.

add(q31-q34): اضافه‌شدگی در بازوی بلند کروموزوم ۷ در رت و در قطعه (q31-q34) نیز در سلول‌های مورد مطالعه، مشاهده شده بود و این اضافه‌شدگی که بطور نسبی معادل با قطعات (-q22.2-q24.3) از کروموزوم ۸ انسان و (q13.1-q13.33) کروموزوم 22 انسانی می‌باشد (شکل ۴). این نواحی به ترتیب در کروموزوم ۸ و ۲۲ حدود ۱۸۲ و ۲۱۷ ژن دارد. از ژن‌های بررسی شده موارد زیر ارائه می‌گردد.

ژن ArfGAP with SH3 domain, ASAP1: این ژن در رت در ناحیه 7q33 و در انسان در مکان سیتوژنتیکی 8q24.21 مکان یابی شده‌اند و این ژن در مقالات با نام مستعار DDEF1 نیز به کار برده شده است. این ژن به عنوان یک انکوژن عمل می‌کند و در تومور uveal melanoma در درجه بافت‌شناسی بالا دچار افزایش بیان می‌شود (۱۸). وجود یک ژن انکوژن در محدوده کروموزومی

شناسایی شده است.

ژن *dystrophin- DAG1* (*dystroglycan 1 associated glycoprotein 1*): این ژن از جمله ژن‌های ناحیه 8q32 رت می‌باشد که در انسان در مکان سیتوژنتیکی 3p21.31 قرار دارد و در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان سلول‌های سنگفرشی دهانی (۲۰) و سرطان روده (۲۱) نقش دارد. لذا برای دخالت احتمالی این ژن در بروز سرطان پوست به عنوان ژن کاندید پیشنهاد می‌گردد.

ژن *GPX1* (*glutathione peroxidase 1*): از جمله ژن‌های ناحیه 8q32 رت می‌باشد که این ژن در انسان و در مکان سیتولوژیکی 3p21.31 قرار دارد و جستجو در مقالات نشان می‌دهد حذف این ژن در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان پستان (۲۲) گزارش گردیده است.

ژن *MLH1* (*mutL homolog 1*): از جمله ژن‌های ناحیه 8q32 رت می‌باشد که این ژن در انسان در مکان 3p22.2 قرار دارد و در سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان معده بیان این ژن کاهش چشمگیری دارد (۲۳) و از آن جا که در این ناحیه از کروموزوم رت حذف این ژن مشاهده شده است و لذا منجر به کاهش بیان این ژن خواهد شد و می‌تواند اثر خود را در سرطان ایجاد شده در رت القا کند.

ژن *TGFBR2* (*transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)*): یکی دیگر از ژن‌های ناحیه 8q32 رت می‌باشد که این ژن در انسان در مکان 3q24.1 قرار دارد و با حذف این ژن متاستاز و تهاجم سرطان‌های زیادی صورت می‌گیرد که از جمله سرطان پستان (۲۴) و سرطان غدد بزاقی (۲۵) گزارش گردیده است.

ژن *TUSC2* (*tumor suppressor candidate 2*): این ژن در انسان در مکان سیتولوژیکی 3p21.31 قرار دارد که همولوگ ناحیه 8q32 رت می‌باشد. این ژن یک ژن سرکوبگر تومور می‌باشد که در سرطان‌های زیادی از جمله سرطان ریه (۲۶ و ۲۷) نقش آن به اثبات رسیده است.

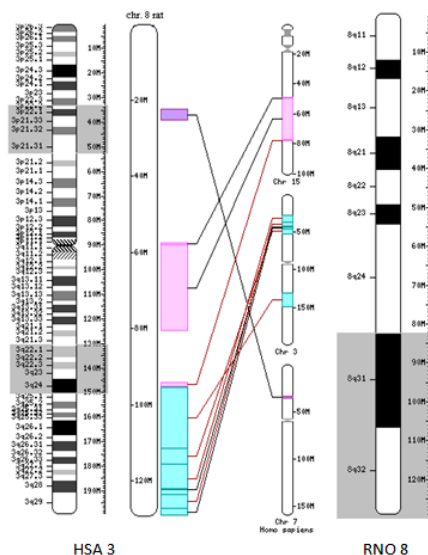
5: یکی دیگر از ناهنجاری کروموزومی مشاهده شده در این تحقیق، حذف‌شدگی در بخش میانی بازوی بلند کروموزوم ۵ (q21-) است.

موارد با افزایش بیان ژن رو به رو هستیم.

del(q31-q32): 8: با استناد به کروموزوم‌های متافازی بدست آمده قطعه (q31-q32) کروموزوم شماره ۸ نیز دچار حذف‌شدگی شده بود؛ که بطور نسبی معادل با قطعات (p22-p21.3) و (q22-q24) کروموزوم ۳ انسانی می‌باشد. این نواحی در روی کروموزوم ۳ حدود ۳۵۴ ژن دارد؛ و در ذیل به بررسی چند ژن که بر اساس مقالات و از نظر عملکرد می‌توانند در بروز سرطان موثر باشند، می‌پردازیم.

با استناد به کروموزوم‌های متافازی مطالعه شده در این تحقیق، قطعه (q31-q32) کروموزوم شماره ۸ نیز دچار حذف‌شدگی شده بود؛ که بطور نسبی معادل با قطعات (p22-p21.3) و (q22-q24) کروموزوم ۳ انسانی می‌باشد و همچنین در کروموزوم شماره ۷ و ۱۵ نیز می‌توان همولوژی‌هایی مشاهده می‌گردد که در شکل ۵ کروموزوم ۳ انسانی به خوبی نمایش داده شده است.

بر طبق اطلاعات موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی، این نواحی در روی کروموزوم ۳ حدود ۳۵۴ ژن دارد که تاکنون بطور مشخص نام گذاری شده و عملکرد آنها نیز



شکل ۵- در ایدئوگرام سمت راست (با زیرنویس 8 RNO)، ناحیه خاکستری، حذف‌شدگی را در بخش دیستال کروموزوم ۸ نشان می‌دهد که از ۱۳۰Mbp تا ۸۵Mbp و در شکل وسط می‌توان همولوگ این نواحی را در کروموزوم‌های انسانی مشاهده نمود و در ایدئوگرام سمت چپ این نواحی در کروموزوم ۳ انسانی با رنگ خاکستری، مشخص شده است.

باشد و در پانکرانس (۳۰) و در نفوپلاسما سنگفرشی پوست (۳۱) هم نقش دارد.

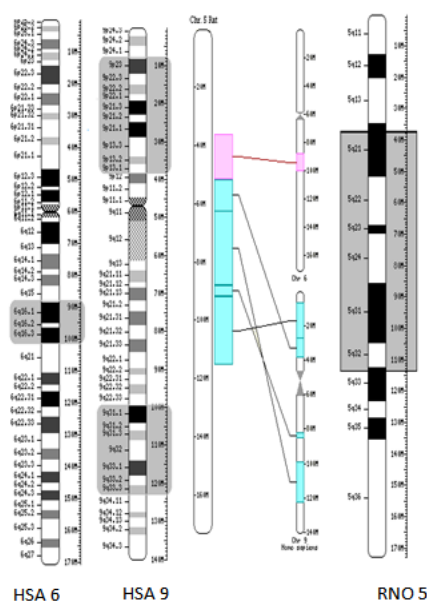
ژن SLC31A1 (copper transporter family member 1) (solute carrier family 31 member 1) این ژن نیز در کروموزوم‌های انسان در لوکوس 9q32 قرار دارد و جایگاه سیتوژنتیکی آن در رت، ناحیه 5q24 می‌باشد. کاهش بیان این ژن در سرطان تخمدان با اثر دهی سیسپلاتین و مس به اثبات رسیده است (۳۲).

ژن CDKN2B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)) این ژن نیز در انسان در لوکوس 9p21.3 قرار دارد در رت نیز در ناحیه 5q32 مستقر است. این ژن یک تومور ساپرسور ژن چند کاره می‌باشد. ناهنجاری در ژن‌های p15, p16 و CDK4 که در تنظیم عبور از فاز G1 در چرخه سلولی دخالت دارند بر پیشرفت بدخیمی در سلول‌های ستاره‌ای شکل مغز تیز مؤثر است (۳۳). بر اساس یکسری تحقیقات هیچ شواهدی دال بر حذف یا جهش نقطه‌ای بر این ژن در سرطان دهانه گردنی رحم مشاهده نشده است (۳۴)، حذف این ژن در سرطان غضروف به اثبات رسیده است (۳۵) و همچنین حذف این ژن در سرطان مثانه و نبود پروتئین حاصل از این ژن در سرطان مثانه از طریق وسترن بلات به اثبات رسیده است (۳۶).

ژن ELAVL2 (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B) از جمله ژن‌های ناحیه 5q32 رت می‌باشد که این ژن در انسان در لوکوس 9p21.3 قرار دارد و در سرطان ریه (۳۷) نقش دارد.

ژن FANCG (Fanconi anemia, complementation group G) از جمله ژن‌های ناحیه 5q22 رت می‌باشد که این ژن در انسان در لوکوس 9p13.3 قرار دارد و در سرطان سلول‌های سنگفرشی دهانی (۳۸) نیز نقش دارد.

بررسی با روش سیتوژنتیکی مولکولی فیش نیز نتایج بدست آمده در این تحقیق را مورد تأیید قرار داد. چنانچه مطالعه کروموزوم‌های متافازی نشان داد که در قطعه 21-q32 کروموزوم شماره پنج حذف شدگی وجود دارد (del (q21-q32) (جدول یک). مطالعه مولکولی ژن‌های CDKN2B و KLF4 هم این حذف



شکل ۶- در شکل سمت راست ناحیه خاکستری حذف‌شدگی در ناحیه 5 del(q21-q32) رت را نشان می‌دهد که از ۴۰M تا ۱۱۰M می‌باشد و در شکل وسط همولوگ این نواحی را در کروموزوم‌های انسانی و در شکل سمت چپ این نواحی در کروموزوم ۹ و ۶ انسان مشخص شده است که در شکل نشان داده شده است، مشخص شده است

5del(q32) بود که در ۲۶ درصد از سلول‌های مطالعه شده دیده شد. این بخش معادل ۳ قطعه همولوگ بر روی کروموزوم‌های ۹ و ۶ است (شکل ۶) که به ترتیب عبارتند از: بازوی کوتاه کروموزوم ۹ انسانی 9(p13-) و p23 و بازوی بلند کروموزوم ۹ انسانی 9(q31-q33)، همچنین قطعه‌ای (q16) کروموزوم ۶ را شامل می‌گردد. این نواحی به ترتیب حدود ۱۰۷ و ۱۰۲ ژن در کروموزوم شماره ۹ و ۲۵ ژن در کروموزوم شماره ۶ دارد. از ژن‌های بررسی شده موارد زیر را مورد بحث قرار می‌دهیم.

ژن KLF4 (Kruppel-like factor 4 (gut)) با مطالعات کتابخانه‌ای صورت گرفته این ژن از جمله ژن‌های ناحیه 5q24 رت می‌باشد که در انسان در لوکوس 9q31.2 قرار دارد و در آپوپتوز سلولی نقش بسزایی دارد و بیان آن از متاستاز و تهاجم جلوگیری می‌کند و بیان کم آن نیز می‌تواند آغازگر در سرطان‌های سلول‌های سنگفرشی مری (۲۸ و ۲۹)

Fluorescence in situ hybridization with human chromosome – specific Libraries detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. *Prod Natl Acad.* 1988;85:9138-9142.

8. Hamta A, Shariatzadeh SMA, Soleimani M, Seifi F. Study of chromosomal rearrangements and bioinformatics of genes involved in DMBA induction of breast cancer in rats and identification of their synthetic regions in human chromosomes. *J Kerman Uni Med Sci.* Summer 2010 17;3:191- 207.

9. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;39:7-20.

10. Karlsson A, Helou K, Walentinsson A, Hedrich HJ, Szpirer C, Levan G. Amplification of Mycn, Ddx1, Rrm2, and Odcl in rat uterine endometrial carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001;31:345-356.

11. Recurrent gene amplifications in human type I endometrial adenocarcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. Emma Samuelson, Kristina Levan, Tatjana Adamovic, Goran Levan, Gyorgy Horvath. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2008;181:25-30

12. Palmerini F, Devilard E, Jarry A, Birg F., Xerri L. Caspase 7 downregulation as an immunohistochemical marker of colonic carcinoma. *Hum Pathol.* 2001;32(5):461-7.

13. Perlman EJ, Valentine MB, Griffin CA, Look AT. Deletion of 1p36 in childhood endodermal sinus tumors by two-color fluorescence in situ hybridization: a pediatric oncology group study. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996;16(1):15-20.

14. Mckallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *J Immunol.* 2005;174(6):819-32.

15. Konishi S, Ishiguro H, Shibata Y, Kudo J, Terashita Y, Sugiura H, et al. Decreased expression of DFF45/ICAD is correlated with a poor prognosis in patients with esophageal carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2002;95(12):2473-8.

16. Skomedal H, Forus A, Holm R. "Deregulation of D-type cyclins in uterine cancers. Cyclin D1/D3 is differentially expressed in cervical cancer. *Anticancer Res.* 2003;23(5A):3929-35.

17. Yu L, Wu G, Wang L, Wang H, Zhang G. Transient reduction of PTI-1 expression by short interfering RNAs inhibits the growth of human prostate cancer cell lines. *Tohoku J Exp Med.* 2006;209(2):141-8.

18. Ehlers JP, Worley L, Onken MD, Harbour JW. DDEF1 is located in an amplified region of chromosome 8q and is overexpressed in uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3609-13.

19. Lark AL, Livasy CA, Calvo B, Caskey L, Moore DT, Yang X, et al. Overexpression of focal

شدگی را تأیید نمود. چنانچه تصویر ب شکل ۱ نشان میدهد از شش سیگنال سلول های تری پلوئید مورد مطالعه فقط دو سیگنال برای ژن KLF4 و چهار سیگنال برای ژن CDKN2B در کروموزوم های متافازی مشاهده گردید البته ۲۰ درصد از سلول های مورد مطالعه هم تعداد سیگنال کمتری را نشان دادند که می تواند مربوط به سلول های زیر کلون توموری باشد که با رشد بیشتر تومور، کلون برتر را در تومور تشکیل دهد. به هر حال، هر دو ژن دارای تعداد نسخه کمتری نسبت به مد کروموزومی سلول را نشان می دهند که نشان دهنده حذف ژن در روند تکاملی تومور می باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه جهت تامین بخشی از هزینه این پروژه تشکر و سپاسگزاری می گردد. همچنین از آقای دکتر فردریک تورشه عضو هیئت علمی دانشگاه گوتنبرگ جهت ارسال بک های مورد استفاده در این تحقیق قدردانی می گردد.

References

1. Miyata M, Furukawa M, Takahashi K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y. Mechanism of 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. *JPN J Pharmacol.* 2001;86:302-9.
2. Iranian annual of national cancer registration report. Ministry of health and Medcial Center for Disease control noncommunicable Deputyducatin. Cancer control Office. 2004 [Persian].
3. Shojaie Tehrani H. [Epidemiology of acute noncontiguous and contiguous diseases]. Tehran: Samat; 2007. p.153. [Persian]
4. Calasanz MJ, Cigudosa JC. Molecular cytogenetics in translational oncology: when chromosomes meet genomics. *Clin Transl Oncol.* 2008;10:20-29.
5. Rooney De (Editor), human cytogenesis: constitutional analysis. 3rd ed. London: Oxford 2001. P. 11-28.
6. Miyata M, Furukawa M, Takahashi K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y. Mechanism of 7, 12-Dimethylbenz [a]anthracene-Induced Immunotoxicity: Role of Metabolic Activation at the Target Organ. *Jpn J Pharmacol.* 2001;86:302-309.
7. Pinkel D, Lanegent J, Collins C, Foscoe J.

adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):215-22

20. Jing J, Lien CF, Sharma S, Rice J, Brennan PA, Górecki DC. Aberrant expression, processing and degradation of dystroglycan in squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer.* 2004;40(14):2143-51.

21. Sgambato A, Migaldi M, Montanari M, Camerini A, Brancaccio A, Rossi G, et al. Dystroglycan expression is frequently reduced in human breast and colon cancers and is associated with tumor progression. *Am J Pathol.* 2003;162(3):849-60.

22. Hu YJ, Diamond AM. Role of glutathione peroxidase I in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res.* 2003;63(12):3347-51.

23. Kitajima Y, Miyazaki K, Matsukura S, Tanaka M, Sekiguchi M. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1, and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2003;6(2):86-95.

24. Gobbi H, Arteaga CL, Jensen RA, Simpson JF, Dupont WD, Olson SJ, et al. Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas." *Histopathology.* 2000;36(2):178-80.

25. Dillard DG, Muller S, Cohen C, Bloch D, Del Gaudio JM, Gal AA. High tumor grade in salivary gland mucoepidermoid carcinomas and loss of expression of transforming growth factor beta receptor type II. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127(6):683-6.

26. Kondo M, Ji L, Kamibayashi C, Tomizawa Y, Randle D, Sekido Y, et al. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells. *Oncogene.* 2001;20(43):6258-62.

27. Deng WG, Kawashima H, Wu G, Jayachandran G, Xu K, Minna JD, et al. Synergistic tumor suppression by coexpression of FUS1 and p53 is associated with down-regulation of murine double minute-2 and activation of the apoptotic protease-activating factor 1-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(2):709-17.

28. Wang N, Liu ZH, Ding F, Wang XQ, Zhou CN, Wu M. Down-regulation of gut-enriched Kruppel-like factor expression in esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2002;8(6):966-70.

29. Yang Y, Goldstein BG, Chao HH, Katz JP. KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(11):1216-21.

30. Wei D, Kanai M, Jia Z, Le X, Xie K. Kruppel-

like factor 4 induces p27Kip1 expression in and suppresses the growth and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(12):4631-9.

31. Huang CC, Liu Z, Li X, Bailey SK, Nail CD, Foster KW, et al. KLF4 and PCNA identify stages of tumor initiation in a conditional model of cutaneous squamous epithelial neoplasia. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(12):1401-8.

32. Holzer AK, Katano K, Klomp LW, Howell SB. Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6744-9.

33. Saxena A, Robertson JT, Ali I.U. Abnormalities of p16, p15 and CDK4 genes in recurrent malignant astrocytomas. *Oncogene.* 1996;13(3).

34. Kim JW, Namkoong SE, Ryu SW, Kim HS, Shin JW, Lee JM, et al. Absence of p15INK4B and p16INK4A gene alterations in primary cervical carcinoma tissues and cell lines with human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol.* 1998;70(1):75-9.

35. Jagasia AA, Block JA, Diaz MO, Nobori T, Gitelis S, Inerot SE, et al. deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in a myxoid chondrosarcoma. *Cancer Lett.* 1996;105(1):77-90.

36. Orlow I, Lacombe L, Hannon GJ, Serrano M, Pellicer I, Dalbagni G, et al. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(20):1499-501.

37. Cairns P, Okami K, King P, Bonacum J, Ahrendt S, Wu L, et al. Genomic organization and mutation analysis of Hel-N1 in lung cancers with chromosome 9p21 deletions. *Cancer Res.* 1997;57(23):5356-9.

38. Tremblay S, Pintor Dos Reis P, Bradley G, Galloni NN, Perez-Ordóñez B, Freeman J, et al. Young patients with oral squamous cell carcinoma: study of the involvement of GSTP1 and deregulation of the Fanconi anemia genes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(9):958-66.