

الاضرار الكروموسومية العددية و التركيبية و دور مورث السرطان N-ras في خط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 .

عبدالحسين مويث الفيصل* وأمال محمد علي** وناهي يوسف ياسين***

تاريخ قبول النشر 2008/5/27

الخلاصة:

في البحث الحالي تم استخدام طرق وراثية خلوية و طرق جزيئية لتحديد التشوهات الكروموسومية في خط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 و معرفة دور مورث السرطان الابتدائي N-ras في نشوء و تطور هذا النوع من السرطان. بينت نتائج البحث وجود تشوهات كروموسومية عددية و تركيبية متنوعة في خط خلايا السرطان المستعمل في هذا البحث. حيث احتوت خلايا سرطانية على ثلاثية مجاميع كروموسومية في التمريرة 187 و زاد عن ذلك في التمريرة 207 و كانت اكثر الكروموسومات تكرارا في الزيادة هي كروموسومات 1 و 7 و 16 و 17 و 18 . أما التغيرات التركيبية فقد اشتملت على حذف في الذراع القصير لكروموسوم 1 (del 1p) و الذراع الطويل لكروموسومي 6 (del 6q) و كروموسوم 1 (del 1q). كما سجل وجود زيادة في الذراع القصير لكروموسومي 3 و 12 .

أما على المستوى الجزيئي فقد تبين من خلال استخدام تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز PCR و بادئات لموقعين وراثيين للمورث N-ras وجود حذف وراثي دقيق في موقع 61 للمورث السرطاني N-ras و ذلك في التمريرة 187 و حذف كامل للموقعين 61 و 13/12 في التمريرة 207 . أكدت هذه النتائج وجود عدم استقرار وراثية عالية في هذا النوع من السرطان و أن هذه النتائج تدعم نظرية نشوء السرطان بمراحل متعددة.

المقدمة :

يمكن مشاهدة عدم استقرارية المحتوى الوراثي هذا في عددا من انواع السرطان مثل سرطان البنكرياس و المبيض و الرأس و العنق و الحنجرة هذا إضافة لسرطان العظام و سرطانات الانسجة الرخوة أذا يمكن مشاهدة نوعي التشوهات الكروموسومية العددية و التركيبية فيها (8) .

أما التشوهات الكروموسومية التركيبية فأنها ترتبط مباشرة بتشوهات المادة الوراثية DNA التي يؤدي انكسارها الى ظهور انواعا مختلفة من هذه التشوهات تبدو واضحة في مراحل الانقسام الخلوي (9). و على أي حال فإن الكثير من هذه التشوهات يرتبط ارتباطا وثيقا مع تنشيط او تثبيط مورثات سرطانية ابتدائية C-Oncogenes او مورثات كابته للاورام Suppressor genes (10,11,12).

أن افضل الوسائل و الانظمة المناسبة لتحقيق هذا الهدف هو استخدام الخطوط خلوية Cell lines المشتقة من سرطان الحنجرة و سرطان الدماغ و ذلك لسهولة التعامل معها و توفرها بصورة مستمرة و سهولة متابعة المتغيرات الخلوية و الوراثية داخلها. تمثل الخطوط الخلوية للسرطان من اهم الانظمة التي استخدمت خلال فترة طويلة في ابحاث السرطان (13,14,15) . تتميز خلايا خط السرطان بكونها سريعة النمو و لها القدرة على النمو على اوساط غذائية زرعية متنوعة مثل الاوساط RPMI- MEM , DMEM , 1640 و في محيط يتراوح الالاس الهيدروجيني

يتميز السرطان بعدم قدرته على الاحتفاظ على محتواه الوراثي سليما مؤديا الى ظهور و تجمع الاضرار الكروموسومية في خلاياه بعد كل انقسام خلوي (1, 2) . يعتقد بأن هذه الاضرار تلعب دورا في نشوء السرطان و تطوره حيث تزيد من معدل التشوهات الكروموسومية التي تتضمن الحذف و التضخمات في المورثات التي لها علاقة بتكاثر الخلايا (3) .

يختلف نمط التشوهات الكروموسومية في السرطان بشكل كبير حيث يتراوح بين تراكم كروموسومي متوازن الى تشوهات معقدة تؤثر على تركيب الكروموسومات و على عددها في الخلايا (4) . بعض انواع السرطان يمتلك عددا قليلا من التشوهات الكروموسومية بينما تمتلك انواعا اخرى دزينة من هذه التشوهات (5) . و يعتبر وجود 3-5 انواع من التشوهات الكروموسومية في الخلية كاف لاعتبار التشوهات معقدة بينما لا يمكن التكهن بعدد الاحداث الوراثية التي تؤدي الى تعقد هذه التشوهات (6) . كذلك فإن طيف التشوهات الكروموسومية يختلف اعتمادا على الطبيعة النسيجية و التشريحية لموقع نشوء السرطان. أن التغيرات التي تحصل في كروموسومات الخلايا السرطانية تعكس وجود اليات متنوعة لحصولها في السرطان. فزيادة او نقصان اعداد الكروموسومات قد ينشأ نتيجة فقدان بعض الكروموسومات في الطور الاستوائي او الانفصالي او حصول انقسام متعدد الاقطاب مرتبط بتشوهات في سنتر ومير الكروموسومات (7) .

*دكتوراه في الوراثة الطبية الجزيئية /معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية للدراسات العليا/جامعة بغداد
**ماجستير في الوراثة الخلوية/المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية/ الجامعة المستنصرية
***دكتوراه في الوراثة الخلوية/المركز العراقي لبحوث السرطان و الوراثة الطبية-الجامعة المستنصرية

الخلايا بعدها بالنبذ المركزي ليزال الرائق ثم اضيف 5 مل من المثبت (3 أجزاء من كحول الايثانول + جزء واحد من حامض الخليك الثلجي) . حضنت الانابيب لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة المختبر ثم رسبت الخلايا بالنبذ المركزي. أزيل الرائق و تم تكرار معاملة الخلايا بالمثبت لعدة مرات حتى الحصول على رائق ابيض اللون ثم أزيل الرائق و رسبت الخلايا وعلقت الخلايا بما تبقى من رائق في الانابيب.

حضرت تجمعات الكروموسومات باسقاط الخلايا على هيئة قطرات متتالية على شرائح زجاجية نظيفة تماما. تركت الشرائح الزجاجية لتجف ثم عولمت بأزيم التربسين بتركيز 0.045 مايكروجرام / مل لعدة ثواني ليتم التخلص من الانزيم بترك الشرائح الزجاجية على هيئة مائلة لعدة ثواني. أضيف بعدها محلول ملون جمزا Geimsa stain لجميع الشرائح الزجاجية و تركت الشرائح مع الملون لمدة 2-3 دقيقة غسلت بعدها بمحلول سورنسن الدافئ ثم تركت لتجف.

حضرت ثلاثة شرائح زجاجية لكل تمريرة من تمريرات الخلايا السرطانية و فحصت التجمعات الكروموسومية لكل تمريرة بالمجهر الضوئي .

ج- أستخلاص المادة الوراثية (DNA) :

أستخلص الدنا استنادا الى ماورد في المصدر (23) . استخلصت المادة الوراثية من خلايا التمريرات التي جمعت في نهاية زراعة الخلايا (الخطوة الاولى من طرق العمل) و كذلك من محلول خلايا طبيعية لمفاوية كعينة سيطرة.

أستخدم في هذا العمل عدة أستخلاص DNA مستوردة من شركة بروجما الامريكية Progma . خلط 900 مايكروليتر من محلول الخلايا مع 900 مايكروليتر من محلول تحلل الخلايا في انابيب نظيفة و معقمة. حضنت انابيب الاستخلاص بدرجة حرارة 20 م لمدة ساعة واحدة. رسبت نوى الخلايا بعدها بالنبذ المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة. أزيل الرائق ثم علق الراسب بأضافة 300 مايكروليتر من محلول تحليل النوى مع الخلط بشكل هادئ لعدة دقائق. أضيف بعدها 300 مايكروليتر من محلول تحليل البروتينات مع استمرار الخلط للمحلول. نبذت انابيب الاستخلاص بالنبذ المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق ثم نقل الرائق الذي يمثل المادة الوراثية (DNA) الى انابيب استخلاص جديدة نظيفة و معقمة و رسبت المادة الوراثية بأضافة حجم مساوي من كحول الايزوبروبانول البارد الى انابيب الاستخلاص. مزجت محاليل المادة الوراثية مع الكحول بالتقليب حيث يظهر الدنا كخيوط بيضاء رقيقة. رسب الدنا بالنبذ المركزي كما سبق و تم التخلص من الرائق ليتم غسل الراسب بكحول الايثانول 70%. جففت عينات الدنا بحفظها بدرجة حرارة 37م لمدة ساعة ثم اذبيبت بأضافة 100 مايكروليتر من الماء المقطر.

حسب تركيز الدنا و نقاوته بأستخدام المطياف الضوئي عند طول موجي 260 و 280 انكستروم.

له بين 6.8-7.4 (16) . أستعملت هذه الخطوط الخلوية في العديد من الابحاث التجريبية مثل انتاج الاورام في حيوانات المختبر (17) و تجريب انواع مختلفة من المستخلصات النباتية و السموم البكتيرية (18) و دراسات التغيرات الكروموسومية و الوراثية (19,20,21). أن الهدف من هذا البحث هو دراسة الاضرار الكروموسومية المرافقة لسرطان الحنجرة و كذلك دراسة دور مورث السرطان الاولي N-ras في هذا النوع من السرطان.

المواد و طرق العمل:

أ - تهيئة الخلايا السرطانية:

هيئت الخلايا السرطانية استنادا الى الطريقة التي وردت في المصدر (16). أستخرجت التمريرات رقم 187, 207 الخاصة بخط خلايا سرطان الحنجرة البشري (Hep-2) من خزان النتروجين السائل ووضعت بدرجة حرارة المختبر لمدة 20 دقيقة ثم حضنت انابيب التمريرات بدرجة حرارة 37 م لمدة 5 دقائق. نقلت محتويات كل انبوبة الى قنينة زراعة بحجم 25 سم تحتوي على 5مل من الوسط الغذائي RPMI-1640 المقوى ب 10% من مصل العجل البقري. حضنت القناني بدرجة حرارة 37م داخل حاضنة مزودة ب 5% ثاني اوكسيد الكربون حتى وصول الخلايا الى مرحلة تكوين طبقة خلوية conflent مع مراعاة تغيير الوسط الغذائي يوميا.

أزيل بعدها الوسط الغذائي ثم حولت طبقة الخلايا الى معلق خلايا مفردة بعد اضافة ملليليتر من مزيج الانزيمات (0.045 مايكروغرام/مل تربسين- 0.1 مايكروغرام/مل فرسين) لمدة 20-30 ثانية. وبأستخدام 2-3 مل من الوسط الغذائي تم شطف الخلايا و نقلها الى انابيب نبذ مركزي معقمة حيث رسبت الخلايا بقوة نبذ (2000 دورة في الدقيقة) لمدة 5 دقائق ليتم التخلص من الرائق ثم علقت الخلايا بأضافة 1مل من الوسط الغذائي و استخدمت بعدها لتحضير تجمعات الكروموسومات و استخلاص المادة الوراثية من كل تمريرة.

ب- تحضير الشرائح الزجاجية الخاصة بالكروموسومات:

حضرت تجمعات الكروموسومات استنادا الى ما ورد في المصدر (22). زرع 1 مل من محلول خلايا تمريرات سرطان الحنجرة في قناني زراعة تحت نفس الظروف السابقة و بنفس الخطوات السابقة و تركت المزراع لتنمو حتى وصولها مرحلة طبقة الخلايا ثم اضيفت مادة الكولجسين بتركيز 12 مايكروجرام/مل و لكل قنينة زراعة ثم تركت الخلايا مع هذه المادة لمدة 20-30 دقيقة.

أزيل الوسط الغذائي من القناني ثم حولت طبقات الخلايا الى معالق خلوية كما سبق ثم نقلت الخلايا الى قناني نبذ مركزي و رسبت الخلايا بعدها بالنبذ المركزي بنفس الظروف السابقة. علق راسب الخلايا بما تبقى من وسط غذائي ثم اضيف 3 مل من محلول ملح البوتاسيوم KCL بتركيز 0.075 و حفظت الانابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة. رسبت

تراوح العدد الكلي للكروموسومات في خط خلايا سرطان الحنجرة ما بين اقل من ثلاثية المجموعة الكروموسومية في التمريرة 187 و اكثر من ثلاثية المجموعة في التمريرة 207. كما تبين من خلال فحص الكروموسومات بأن عدد نسخ الكروموسومات متغير في خلايا التمريرة الواحدة الا أن أكثر الكروموسومات تغيرا في عدد نسخها كانت كروموسومات رقم 1 و7 و16 و17 و18 (جدول- 2) جدول-2: التغيرات العددية المسجلة في تمريرات خط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2.

رقم التمريرة	عدد الخلايا	المنوال	الكروموسومي الذي
187	35	65	50-72
207	21	76	63-83

أما التغيرات التركيبية فقد شملت فقدان جزئي او كلي في الذراع القصير لكروموسوم 1 في بعض الخلايا (1p) او فقدان جزئي او كلي في الذراع الطويل لنفس الكروموسوم (1q) في خلايا اخرى. كما شملت التغيرات زيادة جزئية او كلية في الذراع القصير لكروموسوم 3 (3q) و كروموسوم 12 (12p) أو فقدان الذراع الطويل لكروموسوم 6 (6p) (جدول- 3). ويجدر الذكر بأن التغيرات التركيبية الانفة الذكر سجلت في كلا التمريرتين 187 و 207 لخط خلايا سرطان الحنجرة الا انها كانت اكثر استقرارا في التمريرة 207.

جدول 3: التغيرات التركيبية التي سجلت في خط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2.

الكروموسومي	الكرور في التمريرة	الكرور في التمريرة
1p-	3	4
1q+	3	1
3p+	2	2
6q-	4	2
12p+	1	2

ب- دور مورث السرطان N-ras في سرطان الحنجرة: يوضح شكل 1- نتائج تحليل الدنا المستخلص من تمريرات مختلفة لسرطان الحنجرة و باستخدام تفاعل PCR مع بادئات لموقعي 12/13 و 61. يظهر من خلال الشكل بأن هناك فقدان في الموقع 61 لمورث السرطان الابتدائي N-ras في التمريرة 187 لخط سرطان الحنجرة Hep-2 حيث اظهر تفاعل PCR وجود حزمة واحدة بحجم (400 pb) تمثل الموقع 13/12 فيما اختفت كلا الحزمتين في التمريرة 207 مقارنة مع العينة الطبيعية.

كما تم التأكد من خلوه من الشوائب و البروتينات عن طريق معاملة عينات منه مع عدد من الانزيمات القاطعة. حفظت بعدها عينات الدنا بدرجة حرارة -20م حتى استخدامها في تفاعلات سلسلة البوليميريز Polymerase chain reaction-PCR.

د- تفاعل سلسلة البوليميريز (PCR):

أستخدمت لهذا الغرض عدة تفاعل مستوردة من شركة سيناجين Cinagen الايرانية فيما استوردت البادئات الخاصة بالمورث السرطاني الاولي N-ras من شركة الفا الكندية Alpha و الموضحة ترداداتها في الجدول 1.

جدول 1: ترددات البادئات المستخدمة في تفاعل سلسلة البوليميريز PCR.

النوع	البادئة الامامية	البادئة الخلفية	المورث السرطاني
12/13	5'-ATGACTGAGTACAAACTGGT-3'	5'-AATATGATCCCACCATAGAG-3'	N-ras
61	5'-CAAGTGGTTATAGATGGTGA-3'	5'-AGGACAGGCCGAGGCTTCCTC-3'	N-ras

اجري تفاعل سلسلة البوليميريز PCR اعتمادا على طريقة سيكاي و جماعته عام 1989 (24) و ذلك باستخدام جهاز دورات تفاعل PCR من شركة تكنوجين البريطانية Technogen.

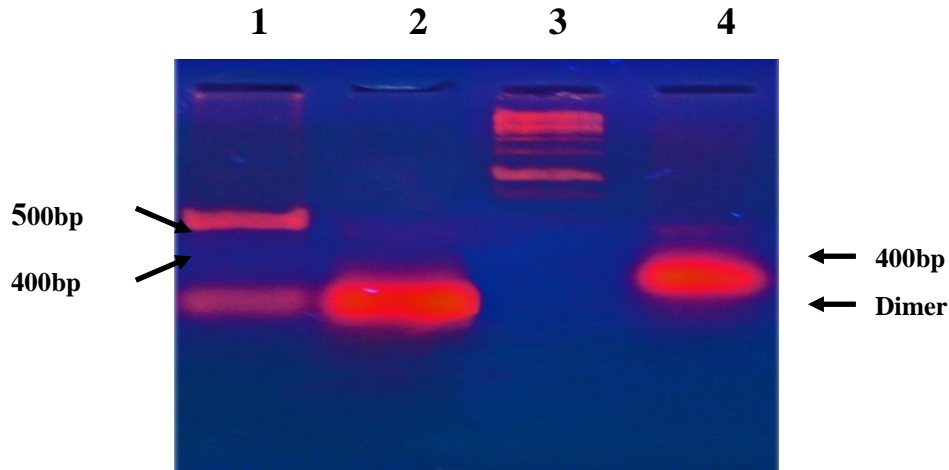
مزج 100 نانوجرام من DNA كل تمريرة من تمريرات كل نوع من السرطان مع 35 مايكروليتر من محلول تفاعل سلسلة البوليميريز Master Mixture و 40 بيكامول من كل بادئة من بادئات كل موقع و لكل مورث سرطاني ابتدائي. علما بأنه تم تحضير تفاعل مستقل لكل زوج بادئات تعود لموقع واحد و لمورث واحد. أكمل حجم التفاعل الى 50 مايكروليتر بأضافة ماء مقطر معقم ثم اضيف 2 مايكروليتر من الزيت المعدني لكل انبوبة تفاعل لمنع تبخر محتويات التفاعل. وضعت الانابيب في جهاز دورات تفاعل PCR وفق البرنامج المناسب للتفاعل ((95 درجة مئوية لمدة دقيقتين ثم 58 درجة مئوية لمدة 20 ثانية و 72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و لغاية 20 دورة تفاعلية).

أستخدم 10 مايكروليتر من كل تفاعل لاغراض الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز بتركيز 1% و لمدة 20 دقيقة و بفولتية 100 فولت. لون الهلام بعدها بملون بروميد الاثيديوم و فحصت الحزم الناتجة من التفاعل بجهاز الاشعة فوق البنفسجية ثم صورت بكاميرا رقمية.

النتائج:

أ- التغيرات الكروموسومية العددية و التركيبية في خلايا الخطوط السرطانية:

تضمن العمل دراسة هذه التغيرات في التمريرتين 187 و 207 من خط خلايا سرطان الحنجرة حيث فحص ما معدله 50 خلية في الطور الاستوائي لكل تمريرة بينت نتائج فحص خلايا كل تمريرة وجود تغيرات كروموسومية تختلف من خلية الى اخرى. إذ



شكل 1 : تفاعل PCR للـ DNA المستخلص من تمريرات 178 و 207 لخط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 و عينة DNA مستخلصة من شخص طبيعي مع بادئات للموقعين 12/13 و 61 للمورث السرطاني N-ras .
 - الخط رقم 1 يمثل PCR لعينة الـ DNA المستخلص من دم شخص طبيعي غير مصاب .
 - الخط رقم 2 يمثل PCR لعينة الـ DNA المستخلصة من التمريرة 207/ سرطان الحنجرة .
 - الخط رقم 3 يمثل حزم DNA قياسية.
 - الخط رقم 4 يمثل PCR لعينة الـ DNA المستخلصة من التمريرة 187 / سرطان الحنجرة .

هناك حذف كامل لمورث N-ras في الموقعين 12/13 و 61 في التمريرة 207 لخط سرطان الحنجرة Hep-2 حيث فشل تفاعل PCR في انتاج تردد DNA نظير للمحورين المحذوفين مقارنة مع انتاج حزمتين DNA بطول 400,500 pb في عينة السيطرة الطبيعية فيما اظهر تفاعل PCR وجود حذف في الموقع 61 في DNA التمريرة 187 لخط سرطان الحنجرة Hep-2 .

أن نتائج تفاعل PCR الموضحة بالشكل 1 تؤكد بشكل قاطع أن سرطان الحنجرة ينشأ من حدوث عدة تغيرات وراثية متتابعة يمثل الحذف في الموقع 61 من المورث السرطاني الابتدائي N-ras في التمريرة 187 حدثاً وراثياً . فيما يمثل فقدان الموقعين 12/13 و 61 لنفس المورث في التمريرة 207 حدثاً وراثياً اخر هذا اضافة للنشوهات الكروموسومية المسجلة. أن نتائج هذا البحث توضح مدى عمق فقدان الاستقرار الوراثي في الخلايا السرطانية و تدعم نظرية نشوء السرطان نتيجة حصول احداث وراثية عديدة متعاقبة. أن هذه النتائج تتطابق مع ما وجدناه في الفحوصات الوراثية-الخلوية للتمريرات نفسها حيث يوضح الجدول 3 بأن تكرار فقدان الذراع الصغير لكروموسوم 1(1p-) وهو الذراع الذي يقع عليه المورث السرطاني الابتدائي N-ras يزداد في التمريرة 207 مقارنة مع التمريرة 178 .

تترافق مثل تلك الحذوف و الطفرات الوراثية في المورث N-ras مع العديد من انواع السرطان. فقد سجلت طفرات المواقع 12/13 و 61 لمورث N-ras في ابحاث اخرى حول سرطان الحنجرة (42,41) . فيما سجلت في ابحاث اخرى طفرات وراثية و حذوف في المورث H-ras والمورث K-ras اضافة لطفرات وراثية في المورث N-ras في سرطان الحنجرة (44,43) .

كما سجلت مثل تلك التغيرات الوراثية في المورث السرطاني N-ras في سرطان ابيضاض الدم- اللوكيميا الحادة (45) و سرطان المثانة (46) و سرطان الجلد- الميلانوما (47) .

المناقشة :

بينت نتائج الفحوصات الكروموسومية التي اجريت على خلايا تمريرات الخط الخلوي لسرطان الحنجرة وجود هيئة كروموسومية معقدة . اذ اختلف عدد الكروموسومات من خلية الى خلية ضمن التمريرة الواحدة و تراوح هذا العدد بين 46-83 كروموسوما و هو ما يعكس التباين في التغيرات الكروموسومية العددية في السرطان. و يلاحظ من النتائج ان اعداد الكروموسومات زادت في التمريرة 207 مقارنة مع اعدادها في التمريرة 187 و هو ما يعكس استمرار و تزايد حصول التغيرات الوراثية في الخلايا السرطانية مع تقدمها بالعمر..

أختلفت أعداد نسخ الكروموسومات في خلايا كلتا التمريرتين و لكنها كانت عشوائية لمعظم الكروموسومات اذ لا يمكن الجزم بوجود اولوية لبعضها على بعض . الا ان تكرار كروموسوم 7 في دراسات مماثلة اوضح تغيرا غير عشوائي (16). وقد سجل مثل هذا التغير غير العشوائي في كروموسوم 7 في دراسات اخرى تناولت انواعا اخرى من السرطان (26,25). فقد سجلت انواع من التغيرات في كروموسوم 1 تترافق مع حالات عديدة من سرطان المجاري البولية- التناسلية تراوحت ما بين حذوف صغيرة و فقدان في اذرع الكروموسوم و فقدان كلي لكروموسوم مفرد (27) . كما سجلت مثل هذه التغيرات في كروموسوم 1 في سرطان الغدد الصماء (28) و سرطان المعدة (29) و سرطان النيوروبلاستوما (30) .

كما سجلت انواع مختلفة من التغيرات الكروموسومية و الجينية في حالات من انواع مختلفة من سرطان الدماغ مثل فقدان الذراع القصير لكروموسومات 9 و 12 و 15 و 16 و 17 (35,34,33,32,31) و فقدان الذراع الطويل لكروموسومات 6 و 13 و 16 و 19 و 22 (37,36) و فقدان كامل لكروموسومات 10 و 22 (40,39,38) . توضح نتائج الشكل-1 بأن

- [Journal of Clinical Oncology](#)5:1610-1979.
- 10- Sanchez-Barcelo,E.J,Cos,S.,ernanez, and Mediavilla,M.D.2003.Endorin-related cancer.Cancer 10:153-159
 - 11- Stites,E.C.,Paul,C.T.,Zhong,M.,Kodi,S.R.2007.Network Analysis of Oncogenic Ras Activation in Cancer .Science 318:463-467.
 - 12- Myers,M.E.,Chang,M.H.,Jorgensen, C.,Whitworth,W.,Kassim,S.,Litch,J. A.,Armstrong,L.,Bernhardt,B.,Faucet t,W.A.,Irwin,D.,Mouchawar,J.and Bradley,L.A.2006.Genetic testing for susceptibility to breast and ovarian cancer;Evaluating the impact of a direct to consumer marketing campaign on physicians knowledge and practices.Genetic Med.8:361-370.
 - 13- Pirhonen J.,Timo,S.,Masashi,K., Ilkka,J.and Sampsa M.1999.Virus Infection Activates IL-1 β and IL-18 Production in Human Macrophages by a Caspase-1-Dependent Pathway. The Journal of Immunology,162: 7322-7329
 - 14- Beutin,L.,Olivier,M.,Karl,A.B.,Ker - stin,G.,Sonja,Z.,Herbert,S.and Eric O.2003.HEp-2Cell Adherence,Act- in Aggregation,and Intimin Types of Attaching and Effacing Escherichia coli Strains Isolated from Healthy Infants in Germany and Australia.Infect Immun.71(7):3995-4002.
 - 15- Li,Yinghui;Li,F.,Li-Ling,J.,Wang,X .,Xu,Z.andSun,K.2005.STK15Gene Overexpression,Centrosomal Amplification,and Chromosomal Instability in the Absence of STK15 Mutations in Laryngeal Carcinoma. [Cancer Investigation](#),23(8):660-664.
 - 16- Ali,A.M.2004.Cytogenic and immunological study on larynx carcinoma cell line.MSc.Thesis,Baghdad University-College of science.
 - 17- Notter,M.F.D.and Docherty,J.J. 2005. Steroid hormone alteration of herpes simplex virus type 1 replication.[Journal of Medical Virology](#)
 - 18- Ozawa,T.,Nishikimi,M.,Sugiyama,S .,Taki,F.,Hayakawa,M. and Shionoya,H.1988.Cytotoxic activity of leukotoxin,aneutrophil derived fatty
- المصادر
- 1- Al-Faisal, A.H.M., Al-Katteb,I. and Al-Katteb,F.2000.DNA Ploidy and Heterogeneity in Ovarian Cancer. Cancer Mol. Biol.7:1471 -1479.
 - 2- Al-Faisal,A.H.M.,Al-Katteb,I.and Habashna,M.2001.Elevation of Prost- atic Speeific Antigen in Prostate benign hyperplerplasia and prostatic Cancer.Cancer Mol.Biol.8: 1591-1597.
 - 3- Larson,P.L.,Schlechter,B.L.,Morenas ,A.D.,Garber,J.E.,Gupples,L.A.,and Rosenberg,C.L.2005.Allelr imbalance- or loss of heterozygosity in normal breast epithelium of sporadic breast cancer cases and BRCA1 gene muta- tion carriers is increased compared with reduction mammoplastyissues J.Clin.ncol.34 8613-8619.
 - 4- Yoon,S.K.,Lim,N.K.,Ha,S.A.,Park,y. G.,Choi,J.Y.Chung,K.W.,Sun,H.S.,C hoi,M.J.,Chung,J.,Wands,J.R.and kim,J.W.2004. Human cervical cancer oncogene protein is a biomaker from human hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 64:543-544.
 - 5- Fan,X.,Irina,M.,Ihab,E.,Xing,Z.N., Yunyue,W.,Douglas,B.,Daniel,J.B.,A -ieP.and Charles,G.E.2004.Notch1 and Notch2 Have Opposite Effects on Embryonal Brain Tumor Growth. Cancer Research 64,7787-7793.
 - 6- Hui,A.B.,Kwok-Wai,L.,Xiao-Lu,Y., Wai-Sang,P.and Ho-Keung,N.2001 .Detection of Multiple Gene Amplifications in Glioblastoma Mutiforme Using Array-Based Compctive Genomic Hybridization. Lab Invest. 81:717-723.
 - 7- Colorado,P.C.,Torre,A.,Kamphaus, G.,et al.2000.Anti-angiogeniccues from vascular basement membrane collagen. Cance Res;60:2520-6.
 - 8- Moll ,U.M.and Slade,N.2004.p63 and p73:Roles in Development and Tumor Formation.Mol.Cancer Res.2(7): 371-386.
 - 9- Xiong,C.,KONG,W.,ZHANG,S.and ZHANG,D.2006.Relation between the Expression of K-ras in Hep-2 Cells and Development of Laryngeal Carcinoma.[The Chinese-German](#)

- 27- Elmula, I.F. 2005. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell & Chromosome*, 4:1 doi:102(3):247-252.
- 28- Ebrahimi, S.A., Eric, H.W., Alan, W., Rhona, R.S., Edward, P., Jr. and Mark, P.S. 1999. Deletion of Chromosome 1 Predicts Prognosis in Pancreatic Endocrine Tumors. *Cancer Research* 59, 311-315.
- 29- Chen, Y.-J., Alexander, V., Zhengping, Z., Steve, H. and Robert, T.J. 2003. Loss of Heterozygosity of Chromosome 1q in Gastrinomas. Occurrence and Prognostic Significance. *Cancer Research* 63, 817-823.
- 30- Ambros, I.M., Andrea, Z., Borghild, R., Gabriele, A., Ruth, L., Dieter, P., Helmut, G. and Peter, F.A. 1996. Role of Ploidy, Chromosome 1p, and Schwann Cells in the Maturation of Neuroblastoma. *New England J. of medicine* 334:1505-1511.
- 31- Jen, J., Harper, W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Papadopoulos, N., Markowitz, S., Willson, J.K.V., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1994. Deletion of p16 and p15 in brain tumors. *Cancer Res.* 54:6353.
- 32- Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Melzter, P.S., Collins, V.P. 1994. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res.* 54:4299.
- 33- Ueki, K., Rubio, M.-P., Ramesh, V., Correa, K.M., Rutter, J.L., Von Deimling, A., Buckler, A.J., Gusella, J.F., Louis, D.N. 1994. MTS1/CDKN2 gene mutations are rare in primary human astrocytomas with allelic loss of chromosome 9p. *Hum. Molec. Genet.* 3:1841.
- 34- Rajagopalan, H. & Lengauer, C. 2004. Progress Aneuploidy and cancer. *Nature* 432: 338-341.
- 35- Gaiano N, Fishell G. 2002. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 25:471-90.
- acidepoxide on cultured human cells. *Biochem. Int.* 16:369-373.
- 19- Wittmer, K., Klenk, U., Gdassgen, A., Aust, D.E., Diebold, J., Lohrs, U.B. and Baretton, G.B. 2000. FISH analysis of gene aberrations (myc, ccna1, erb-B2, Rb and Ar) in advanced prostatic carcinoma before and after androgen deprivation therapy. *Lab. Invest.* 80:1455-1464.
- 20- Sawyer, J.R., Husain, M. and Al-Mefly, O. 2001. Identification of isochromosomes 1q as a recurring chromosome aberration in skull base chordomas: a new marker for aggressive tumors. *Neurosurg. Focus* 10:1-16.
- 21- Lensch, R., Gotz, C., Andres, C., Bex, A., Lehmann, J., Zwergel, T., Unteregger, G., Kamradt, J., Stoeckle, M. and Wullrich, B. 2002. Comprehensive genotypic analysis of human prostate cancer cell lines and sublines derived from metastases after orthotopic implantation in nude mice. *Int. J. Oncol.* 21:695-706.
- 22- König, J.J., Wilma, T., Jan, W., Van D., Johannes, C. R., Anne, H. and Fritz, H.S. 2006. Loss and gain of chromosomes 1, 18, and Y in prostate cancer. *The Prostate* 25(6):281-291.
- 23- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- 24- Saiki, R.K. (1988). The design & optimization of the PCR. In: "PCR Technology Principles and Applications for DNA amplification" ed. Erlich, H.A. Stockton Press, New York.
- 25- Hoglund, M., Gisselsson, D., Hansen, G.G., Sall, T. and Mitelman, F. 2002. Multivariate analysis of chromosomal imbalances in breast cancer delineates cytogenetic pathways and reveals complex relationships among imbalances. *Cancer Res.* 62:2675-2680.
- 26- Hoglund, M., Sall, T., Mitelman, F., Mandahl, N. and Elmula, I.F. 2001. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. *Cancer Res.* 61:8246-8246.

- 42- Pellman,D.2007. Cell biology:Aneuploidy and cancer.Nature 446:38-39.
- 43- Ruíz-Godoy,[L.M.R.](#),[Garcia-Cuellar](#), C.M.,[ález](#),N.E.,[Suchil](#),B.L.,[érez-Cárdenas](#),E.,[áncnchez-Pérez](#), Y.,[árez-Roa](#),M.L.and [Meneses](#).A.2006.Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma.Exp.Clin.Cancer Res. 25:73-8.
- 44- Shchors,K.and Evan,G. 2007.Tumor Angiogenesis: Cause or Consequence of Cancer?Cancer Res:67:7059-7061 .6.Nelson,N.J.1999.Viruses and cancer Journal of the National cancer Institute,91, No.20,1709.
- 45- Shu,X.O.,Perentesis,J.P,Wen,W,Buckley,J.D., Boyle ,E., Ross ,J.A., and Robison,L.L.2004.Parental Exposure to Medications and Hydrocarbons and ras Mutations in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia:A Report from the Children's Oncology Group .Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 13 (7): 1230-1235.
- 46- Przybojewska,B.,Jagiello,A.and Jalmuznac,P.2000.H-RAS,K-RAS,& N-RAS Gene Activation in Human Bladder Cancers.Cancer genetic and cytogenetics.121:73-77.
- 47- Tsao,H.,Xue,Z.,Kianna,F.and Frank, G.H.,2000.Relative Reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 Alterations in Cutaneous Melanoma Cell Lines.Cancer Research 60,1800-1804.
- 36- Thomas,G.A.,Raffel,C.1991.Loss of heterozygosity on 6q,16q,and 17p in human central nervous system primitive neuroectodermal tumors .Cancer Res. 51:639.
- 37- VonDeimling,A.,Bende,B.,Jahnke,R., Waha,A.,Kraus,J.,Albrecht,S.,Wellenruther,R.,Fassbender,F.,Nagel,J.,Mennon,A.G.,Louis,D.N.,Lenartz,D.,Schramm ,J.,Wiestler,O.D.1994.Loci associated with malignant progression in astrocytomas:a candidate on chromosome 19q. Cancer Res.54:1397.
- 38- Von Deimling, A.,Louis,D.N.,von Ammon,K.,Petersen,I.,Hoell,T.,Chung ,R.Y.,Martuza,R.,Schoenfeld,D.,Yasargil,M.G.,Wiestler,O.D.,Seizinger,B.R. 1992.Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme.J. Neurosurg. 77:295.
- 39- Fults,D.,Pedone,C.1993.Deletion mapping of the long arm of chromosome 10in glioblastoma multiforme.Genes .Chrom osom. Cancer 7:173.
- 40- Rutledge,M.H.,Xie,Y.G.,Han,F.Y, Peyrard,M.,Collins,V.P,Nordenskjold, M., Dumanski,J.P.1994.Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma.Genes Chromosom Cancer 10:122.
- 41- [Anwar,K.](#),[Nakakuki,K.](#),[Naiki,H.](#) and [Inuzuka,M.](#)1993.ras gene mutations and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma.[Int J.Cancer](#).2:53(1):22-8.

Chromosomal aberrations and N-ras activation in human larynx carcinoma cell line Hep-2.

Abdul Hussain M. Al-Faisal, Amal M.Ali, and Nahi Y.Yassen

Abstract

In the present study, cytogenetic and molecular techniques were conducted to detect the chromosomal aneuploidy and the involvement of N and H genes in squamous larynx carcinoma cell line Hep-2. Our results showed that numerical and structural abnormalities were involved in larynx cancer Hep-2. The total number of chromosomes ranging from triploidy in passage 187 to more than that in passage 207. The more frequent chromosomes involved in numerical aberrations were chromosomes 1, 7, 16, 17 and 18. Structural chromosomal aberrations were also detected. Deletion of short arm was detected in chromosome 1 (del 1p) and the long arm of chromosome 1 (del 1q) and 6 (del 6q). Gaining on short arms were also recorded in chromosomes 3 (3p+) and 12 (12p+). At the molecular level, one allele of N-ras proto-oncogene was found deleted in the location 61 in passage 187 and complete deletion of both locations in passage 207. These findings reflect a great genomic instability in the tumor model used in this study. Also the results confirmed the multistages theory in cancer arising.