AKADEMİK GASTROENTEROLOJİ DERGİSİ, 2006; 5 (3): 149-152

Mide kanserinde E-cadherin genindeki heterozigosite kaybının sıklığı

Frequency of loss of heterozygosity of E-cadherin gene in gastric cancer

İsmail YEĞİN[1], Ömer YILMAZ[2], Bülent AYDINLI[3], Kerim ÇAYIR[1], Selma GEPDİREMEN[4], İbrahim PİRİM[4], Salim BAŞOL TEKİN[1]

Atatürk Üniversitesi, Medikal Onkoloji Bilim Dalı[1], Gastroenteroloji Bilim Dalı[2], Genel Cerrahi Anabilim Dalı[3], Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı[4], Erzurum

Giriş ve amaç: Ülkemizde mide kanseri gastrointestinal kanserler içerisinde ilk sırada yer alır. E-cadherin bir adezyon molekülüdür ve doku bütünlüğünün korunması, tümör invazyonu ve tümör metastazı gibi birçok olayda rol alır. Çalışmamızda bölgemizdeki mide kanserlerinde E-cadherin geninde heterozigosite kaybı (LOH) sıklığını araştırdık. **Gereç ve yöntem:** Karın ağrısı, bulantı-kusma, hematemez ve kilo kaybı şikayetleri nedeniyle müracaat eden ve mide kanseri tanısı konulan 25 hasta dahil edildi. Alınan materyallerin histopatolojik inceleme sonucu kanser olduğu doğrulandı. Örneklerden usulüne uygun olarak DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA örneklerinden PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) tekniği ile E-cadherin genindeki LOH düzeyine bakıldı. **Bulgular:** Lauren sınıflamasına göre Diffüz tip vakalardan bir tanesinde LOH tespit edildi (%33,3). İntestinal tip vakalardan 22 hastamızda LOH tespit edilemedi. Tespit edilen LOH 25 vaka göz önüne alındığında %4 oranında idi. **Sonuç:** LOH, sadece diffüz tip mide kanseri materyallerinde tespit edildi. Bundan dolayı diffüz tip mide kanseri gelişimi ile LOH kaybı arasında ilişki olabilir.

Anahtar sözcükler: Mide kanseri, E-cadherin, heterozigosite kaybı

Background/aim: Gastric cancer is the most frequent malignancy in gastrointestinal cancers in our country. E-cadherin is an adhesion molecule which plays a role in many events like the preservation of tissue integrity, tumor invasion and tumor metastasis. The aim of this study was to determine the frequency of loss of heterozygosity (LOH) of E-cadherin gene in gastric cancer in our region. **Materials and methods:** 25 patients who admitted with the complaints of abdominal pain, nausea and vomiting, hematemesis and weight loss and were diagnosed as gastric cancer were enrolled in this study. Histopathological examination of biopsy specimens confirmed the clinical diagnosis of gastric cancer. DNA isolation was made from the specimens, and LOH in E-cadherin gene was detected by PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) technique. **Results:** Of diffuse type gastric cancer cases (n=3) according to Lauren Classification, LOH was determined in 1 patient (33.3%). No LOH was determined in 22 patients with intestinal type gastric cancer. Thus, LOH frequency was only 4% among all cases. **Conclusion:** As LOH was determined only in a diffuse type gastric cancer biopsy material, there may be a relation between them.

Key words: Gastric cancer, E-cadherin, loss of heterozygosity

GİRİŞ VE AMAÇ

Mide kanseri, tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen günümüzde kanserden ölüm sebepleri arasında ikinci sırada yer alır. Görülme sıklığı coğrafik bölgelere göre farklılıklar gösterir (1, 2). Etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte *Helikobakter pilori*, beslenme alışkanlıkları, çevresel ve genetik faktörler suçlanmaktadır. Mide kanseri etyolojisinde %10 oranında genetik faktörler sorumlu tutulmuştur (3, 4). Bugüne kadar erken tanı, prognoz ve takip açısından kullanılabilecek bir belirteç tespit edilememiştir (5, 6).

Cadherinler embriyoda morfogenezden, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu hücre yüzey glikoproteinleridir. Cadherinler, yanyana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlarlar. E-cadherin bir adezyon molekülüdür ve epitel hücrelerinde eksprese olur. E-cadherin ekspresyonu azalan epitel hücrelerinde diferansiasyonun azaldığı ve göç kabiliyetlerinin arttığı belirlenmiştir. E-cadherin geni ve bu gendeki mutasyonlar birçok kanserde (Mide, Meme, Akciğer, Baş-Boyun, Over, Prostat) araştırılmış ve halen araştırılmaktadır (6-12).

Çalışmamızda, bölgemizdeki mide kanserli hastalarda E-cadherin genindeki heterozigosite kaybının (LOH; loss of heterozygosity) sıklığını araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza, iştahsızlık, bulantı-kusma, hematemez, kilo kaybı, melena gibi nedenlerle üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapılıp malign ülser veya makroskopik olarak mide kanserini düşündüren lezyona sahip 25 hasta (18 erkek, 7 kadın) dahil edildi. Hastaların tanısı histopatolojik inceleme ile kesinleştirildi. Klinik evreleme için batın ve toraks bilgisayarlı tomografisi çektirilerek metastaz varlığı araştırıldı. Metastaz olmayan ve ameliyatı kabul eden hastalar, preoperatif hazırlıkları yapılarak genel cerrahi kliniğinde opere edildi.

23 hastanın operasyon, bir hastanın lenf bezi biyopsisi ve bir hastanında endoskopi esnasında alınan biyopsi örnekleri histopatolojik olarak incelenmek üzere patoloji kliniğine gönderildi. 0,5-1 cm'lik parçalar halinde alınan tümoral yaş doku örnekleri kanser hücrelerinin çoğunluğu oluşturduğu bölgeler ayrılarak steril tüplere konuldu. -20°C'de çalışma yapılıncaya kadar bekletildi. Histopatolojik sınıflama Lauren'e göre yapıldı (13). Çalışmaya alınan tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verildi.

PCR Yöntemi İle E-Cadherin Gen Bölgesinin Elde Edilmesi;

E-cadherin gen bölgesi için 2 farklı çift primer; forward: 5'-CTC AGC TCT GCT AGC AGT CTTG, reverse: 5'-GTA TGA ACA GCT GTG AGG ATGC, forward: 5'-CAG CGT GGG AGG CTG TAT ACAC, reverse: 5'- GCA TCT TGC CAG GTA CCA TAC AAG kullanıldı. 94 °C de 30 sn. denatüre edilip, 94°C, 55°C ve 72°C'de 30 sn. 35 siklusda PCR yöntemi ile çoğaltıldı (14-16). Elde edilen PCR ürünü (amplikon) Hint III restriksiyon enzimiyle muamele edildi. Meydana gelen fragmentler; 124 bp'lik fragment wild tip, 104 bp ve 20 bp'lik fragmentler mutant fragment olarak değerlendirildi. Etidium bromid ile boyanarak %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve ultraviyole ışık altında görüntülendi.

BULGULAR

Hastaların yaş ortalamaları 59,6±7,1 (43-72) yıl (erkeklerde 60,0±7,2 yıl (43-72), kadınlarda 58,7±7,4 yıl (49-67)) olarak tespit edildi. Tümörlerin lokalizasyonu 5'i (%20) korpus, 8'i (%32) antrum, 7'si (%28) kardia, 2'si (%8) korpus+kardia, 3'ü (%12) ise korpus+antrum yerleşimli idi. Endoskopik olarak hastaların 7'sinde (%28) tam, 2'sinde (%8) kısmı pilor obstrüksiyonu tespit edildi. Lauren sınıflamasına göre yapılan histopatolojik incelemede; 1'i (%4) diffüz tip, 2'si (%8) diffüz infiltratif tip, 22'si (%88) ise intestinal tip olarak tespit edildi. Olguların 2'si (%8) müsinöz adenokarsinom, 23'ü (%92) adenokarsinom idi. Olguların 3'ü (%12) kötü, 4'ü (%16) orta, 9'u (%36) az, 9'u (%36) iyi diferansiye idi. Hastaların operasyon esnasında 3'ünde uzak metastaz, 19'unda serozaya invazyon tespit edildi. Sadece 3'ünde serozaya invazyon tespit edilemedi. Operasyona alınan hastaların birinde pankreasa invazyon belirlendiği için patolojik boyuttaki lenf bezlerinden birisi biyopsi amacıyla alınarak işleme son verildi. Bir hasta operasyonu kabul etmediği için bu hastanın endoskopi ile alınan biyopsi materyali çalışma için kullanıldı. Dört (%16) hastaya subtotal, 19 (%76) hastaya total gastrektomi yapıldı. Total gastrektomi yapılan hastaların ikisine bu işlem palyatif amaçlı yapıldı. Çünkü operasyon esnasında hastaların birisinde peritonitis karsinomatoza, birisinde dalağa metastaz tespit edildi.

Çalışmaya alınan 25 olgunun sadece birinde (%4) LOH pozitif olarak bulundu. LOH pozitif bulunan olgu, Lauren sınıflamasına göre diffüz

Tablo 1. Mide kanserli hastalarımızın klinik ve demografik özellikleri

Özellik	Hasta Sayısı	%
Cinsiyet		
Erkek	18	72
Kadın	7	28
Aile Hikayesi		
Var	4	16
Yok	21	84
Histopatoloji		
Adenokarsinom	23	92
İyi Diferansiye	9	36
Orta Diferansiye	4	16
Az Diferansiye	9	36
Kötü Diferansiye	3	12
Müsinoz Adeno Ca	2	8
Lauren Sınıflaması		
Diffüz Tip	3	12
İntestinal Tip	22	88
Tümör Lokalizasyonu		
Antrum	9	36
Korpus	9	36
Kardia	7	28
Metastazlar		
Var	3	12
Yok	22	88
Uygulanan Operasyon		
Total Gastrektomi	19	76
Subtotal Gastrektomi	4	12
LOH Pozitifliği		
Var	1	4
Yok	24	96

tipte mide adenokarsinomu idi. Diğer 2 (%8) diffüz infiltratif ve 22 (%88) intestinal tip olguda LOH negatif olarak bulundu. Bu toplam olgular içerisinde %4 (1/25) oranında idi. Diffüz tip mide kanseri olguları içerisinde ise %33,3 (1/3) oranında idi. (Tablo 1)

TARTIŞMA

Mide kanseri gelişimi, çok sayıda genetik ve epigenetik değişimler sonucu oluşan çok basamaklı bir olaydır (12). 1965'de Lauren Mide kanserlerini mikroskopik özelliklerine göre intestinal ve diffüz tip olarak ikiye ayırdı (17). İntestinal tip mide kanseri gelişimi çok basamaklı seyir gösterir. İntestinal tip mide kanserinde nokta mutasyonu, heterozigosite kaybı ve hipermetilasyonu içeren çok sayıda epigenetik ve genetik değişiklikler tespit edilmiştir. Diffüz tip kanserlerde ise intestinal tipin aksine prekürsör lezyon oluşumu yoktur (1).

İmmünohistokimyasal incelemelerde epitelial morfolojiyi koruyan tümörlere diferansiye tümörler denilir. Bunlarda cadherin azalmıştır. Genelde E-cadherin ekspresyonu azalması ile tümörde diferansiasyon kaybı arasında istatistiksel olarak korelasyon mevcuttur (18, 19).

Son zamanlarda E-cadherin geninin insan malignitelerinde prognostik marker olduğundan bahsedilmektedir. E-cadherin geni, gen haritasının 16q22.1 lokusunda yer almaktadır (14). LOH'un insanlarda, farklı tümörlerde değişik kromozomlarda görüldüğü bilinmektedir (20, 21). Yapılan çalışmalarda, mide kanserinde ve diğer kanserlerde E-cadherin geninde LOH sıklığı araştırılmıştır. Örneğin özefagus kanserinde %68, hepatoselüler kanserde %46 oranında LOH tespit edilmiştir. Mide kanserindeki LOH sıklığı farklı araştırıcılara göre değişiklikler göstermekle birlikte %4-33 arasında bildirilmektedir. Vakaların tamamına yakını diffüz tip mide kanserlerinden oluşmaktadır. İntestinal tip vakalarda çok düşük düzeyde LOH bildirilmiştir (22-26).

Wang ve ark. (22), 42 mide kanserli hastada %27 düzeyinde LOH sıklığı tespit etmişlerdir. Kötü diferansiye ve taşlı yüzük hücreli grupta, iyi diferansiye gruba göre daha yüksek düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Kimura ve ark. (26) 25 taşlı yüzük hücreli mide kanserli vakada (13 erken ve 12 ileri evre), E-cadherin geninde erken mide kanserinde %15 (2/13) ve ilerlemiş mide kanserinde %33 (4/12) LOH tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Machado ve ark (23) 26 mide kanserinden (10 diffüz, 10 intestinal ve 6 tane miks tip) 2'sinde (%46,2) 15 mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonların 7'si (%70) pure diffüz tip vakalarda, 5'i (%83) miks tip vakalarda tespit edilmiştir. İntestinal tip vakalarda mutasyon tespit edilememiştir. Miks tiplerdeki mutasyon varlığı, diffüz komponentle ilgili olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, E-cadherin inaktivasyonunun, kaydadeğer oranda diffüz histotiple ilgili olduğu bulunmuştur. Huiping ve ark (27) 50 mide kanserli vakadan sadece 3 vakada E-cadherin lokusunu kapsayan 16q22.1 kromozomunda LOH bulunmuştur. E-cadherin düzeyindeki azalma ile diffüz tipteki histoloji arasında ilişki olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda E-cadherin geninde diffüz tip vakalar içerisindeki LOH sıklığı %33,3 olup başka çalışmalara göre oran yüksektir. Tüm vakalar göz önüne alındığında ise %4'lük oran, daha önceki çalışmaların sonuçları ile uyumluydu. Diffüz tip mide kanserli vakalar arasındaki diğer çalışmalara göre yüksek LOH sıklığı rölatif bir yükseklik olabilir. Çünkü, çalışmaya aldığımız kanser olgularının sadece 3'ü diffüz tip mide kanseri idi. Daha fazla sayıda diffüz tip mide kanseri olgusunun dahil edildiği çalışmaların yapılması, konunun aydınlanması açısından daha faydalı olacaktır.

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, E-cadherin mutasyonlarının familyal tip diffüz mide kanserlerinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (28). Yapılan çalışmalarda, germline E-cadherin mutasyonu tespit edilen asemptomatik kişilerden 5 kişiye mide rezeksiyonu yapılmış olup, rezeksiyon materyallerinin incelenmesinde odak tarzında taşlı yüzük hücreli kanser tespit edilmiştir. Ancak yapılan birçok çalışmada mutasyonu taşıyan aile bireylerine profilaktik gastrektomi yaptırmasının önerilmesi tartışmalıdır. Bunlara en az 6-12 ay aralarla endoskopik kontrol yaptırmaları önerilmektedir (29). Ülkemizde çok sık karşılaştığımız mide kanseri vakalarında, diffüz tip vakalara gerekli genetik testlerin yapılması ve aile bireylerinde var olabilecek mide kanserlerinin erkenden tespit edilmesi önemlidir. Çalışmamızda LOH tespit ettiğimiz vakanın bir kardeşinin mide kanserinden öldüğünü belirledik. Ancak hastanın kardeşinin kayıtlarını bulamadığımız için ailenin risk açısından araştırması yapılamadı.

Sonuç olarak, E-cadherin genindeki LOH varlığı ile diffüz mide kanseri gelişimi arasında direkt bir ilişki söz konusu olabilir. Fakat, konunun aydınlatılması için çalışmanın daha fazla sayıda hasta gruplarında yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. *Hamilton JP, Meltzer SJ. A review of the genomics of gastric cancer. Clin Gastroenterol Hepatol 2006; 4: 416-25.*
2. *Karpeh MS, Kelsen DP, Teper JE: Cancer of the stomach In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Cancer Principles And Practice of Oncology. 6th. Edition, Philadelphia, JB Lippincott Comp, 2001; 1092-126.*
3. *Becker KF, Keller G, Hoefler. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. Surgical Oncology 2000; 9: 5-11.*
4. *Truszkowski JA, Summers RW. Colorectal Neoplasms. Postgraduate Medicine 1996; 98: 20-5.*
5. *Sherman CD. Klinik Onkoloji. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, Ankara. 1990: 3-9.*
6. *AOO Chan, SK Lam, KM Chu, et al. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. Gut 2001; 48: 808-11.*
7. *Slaus NP. Tumor supressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. Cancer Cell International 2003; 3: 1-7.*
8. *Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991; 251: 1451-5.*
9. *Paul S, Frenette MD, Denısa D, et al. Adhesion Molecules-Part I. The new england journal of medicine 1996; 6: 1526-9.*
10. *Brunner EC, Romeike BF, Jung M, et al. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. Histopathology 2006; 49: 178-87.*
11. *Sarrio D, Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevez C, et al. Expression of cadherins and catenins correlates with distinct histologic types of ovarian carcinomas. Hum Pathol 2006; 37: 1042-9 .*
12. *Liu YC, Shen CY, Wu HS, et al. Mechanisms inactivating the gene for E-cadherin in sporadic gastric carcinomas. World J Gastroenterol 2006; 12: 2168-73.*
13. *Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histoclinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand 1965; 64: 31.*
14. *Werner M, Becker KF, Keller G, et al. Gasric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. J Cancer Res Clin Oncol 2001; 127: 207-16.*
15. *Cossman J, Schlgel R. P53 in the Diagnosis of Human Neoplasia. J of the Natl Cancer Inst 1991; 83: 980-1.*
16. *Petty EM, Carstens R, Bale AE. Ornithine transcarbamylase polymorphism detected by PCR introduction of Dral site. Nucleic Acids Research 1994; 19: 690.*
17. *Robbins SL, Kumar V. Robbins and Kumar Basic Pathology. Uluoğlu Ö, Patoloji, Ankara, Güneş Yayınevi 1990. s: 678-83.*
18. *Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinoma. Cancer res 1991; 51: 2185-92.*
19. *Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, et al. Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in human gastric cancer. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1992; 421: 149-56.*
20. *Cho JH, Noguchi M, Ochiai A, et al. Loss of heterozigosity of multiple tumor suppressor genes in human gastric cancers by polymerase chain reaction. Lab Invest 1996; 74: 835-41.*
21. *Wang D, Fang D, Luo Y, et al. Study of heterozigosity at DCC and APC/MCC genetic loci of gastric cancer. Chin Med Sci J 1999; 14: 107-11.*
22. *Wang Y, Zheng E, Ke Y. Studies of loss of heterozigosity (LOH) in Chinese human gastric cancer tissues. Zhoghua Zhong Liu Za Zhi 1998; 20: 116-8.*
23. *Machado JC, Soares P, Carneiro F, et al. E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divegence of mixed gastric carcinomas. Lab Invest 1999; 79: 459-65.*
24. *Jennifer J, Ascano MS, Henry F, et al. Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. Mod Pathol 2001; 14: 942-9.*
25. *Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. Oncogene 2001; 20: 1525-8.*
26. *Kimura T, Sato H, Manabe R, et al. Analysis of microsatellite regions and DNA ploidy pattern in signet ring cell carcinomas of the stomach. Gan To Kagaku Ryoho 1997; 24: 273-8.*
27. *Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, et al. Alterations of E-cadherin and β-catenin in gastric cancer. BMC Cancer 2001; 1: 16*
28. *Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006; 12: 192-8.*
29. *Schwarz A. Preventive gastrectomy in patients with gastric cancer risk due to genetic alterations of the E-cadherin gene defect. Langenbecks Arch Surg 2003; 388: 27-32.*