

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DİFFÜZ İNFİLTRATİF MİDE KARSİNOMU OLGULARINDA *CDH1***  
**GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Arman ERKAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**

**2017**



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**DİFFÜZ İNFİLTRATİF MİDE KARSİNOMU OLGULARINDA *CDH1***  
**GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Arman ERKAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. M. Bülent TIRNAKSIZ**

**ANKARA**

**2017**



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 976

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 11 EKİM 2016 SALI  
**Toplantı No** : 2016/20  
**Proje No** : GO 16/612 (Değerlendirme Tarihi : 27.09.2016)  
**Karar No** : GO 16/612-09

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. M. Bülent TIRNAKSIZ'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Aytekin AKYOL ile birlikte çalışacakları ve Dr. Arman ERKAN'ın tezi olan, GO 16/612 kayıt numaralı ve "**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Mide Karsinomu Nedeniyle Ameliyat Edilen Hastalardan Diffüz İnfiltratif Mide Karsinomu Olgularında CDH1 Gen Mutasyonlarının Araştırılması**" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |  |  |
|--|--|
| 1. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)      |
| 2. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Üye)         | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)          |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)      | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)            |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)         | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)        |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye)  | 14. Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)      |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)       | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)       | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR (Üye)         |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)     | 17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)        |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)   | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye)                |

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın patoloji kısmında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Aytekin Akyol ve Dr. Güneş Güner'e, moleküler deneylerde ise Sıdıka Öztop'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Erkan A. Diffüz infiltratif mide karsinomu olgularında *CDHI* gen mutasyonlarının araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi. Ankara, 2017.** Mide kanseri, tüm dünyada görülen kanserler arasında dördüncü sırada ve kanser ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Mide kanserlerinin çoğu sporadik olarak gelişir, %10 – 15 kadarı ise ailesel mide kanserleri ile ilişkilidir. “Herediter Diffüz Gastrik Kanser” tüm mide kanserlerinin %1’ini oluşturan, otozomal dominant kalıtımla sonraki nesillere aktarılan bir sendromdur. *CDHI* genindeki mutasyon sonucu ortaya çıkar. Bu çalışmada amaç, 01.01.1998 – 01.09.2016 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı’nda ameliyat edilen “Herediter Diffüz Gastrik Kanser” sendromlu hastaların değerlendirilmesi ve gen mutasyonlarının taranmasıdır. Çalışmaya, tanı kriterlerini karşılayan 60 hasta dahil edildi. Hastaların demografik bilgileri, klinikopatolojik özellikleri ve ameliyat sonrası takip bilgileri değerlendirildi. Altı hastanın patoloji spesimeninden DNA izolasyonu yapılarak *CDHI* geni çoğaltıldı ve dizi analizi yapıldı. Hastaların ortalama yaşı 45.3 olarak hesaplandı. Yalnızca 5 hastanın erken evrede ameliyat edildiği görüldü. Hastaların ortanca sağ kalım süresi 20.1 ay, 5 yıllık sağ kalım oranı %23 olarak bulundu. Genetik analiz yapılan hastaların beşinde *CDHI* mutasyonu saptandı. Mutasyonların dördü sessiz mutasyondur, bir hastada non-sense mutasyon izlendi. İki hastanın genetik analizinde ekzon 1 çoğaltılmadı. Bu bulgu, ilgili bölgeyi içine alan olası bir silinme olarak değerlendirildi. Bunun MLPA ile doğrulanması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Mide kanseri, herediter diffüz gastrik kanser, *CDHI* mutasyonu, genetik tarama.

## ABSTRACT

**Erkan A. Investigation of *CDHI* gene mutations in hereditary diffuse gastric cancer cases. Hacettepe University School of Medicine, Thesis in General Surgery. Ankara, 2017.** Gastric cancer is the fourth most common cancer and the second leading cause of death worldwide. Most of gastric cancer cases are sporadic; 10 – 15% are related to familial gastric cancer. “Hereditary Diffuse Gastric Cancer” is a syndrome with autosomal dominant inheritance and responsible for 1% of all gastric cancer. It occurs as a result of *CDHI* gene mutation. The aim of this study is to evaluate the patients operated on for “Hereditary Diffuse Gastric Cancer” at Hacettepe University School of Medicine, Department of General Surgery between 01.01.1998 – 01.09.2016 and to screen for gene mutations. Sixty patients meeting the diagnostic criteria were included in the study. Demographic information, clinicopathologic features and postoperative follow up data were evaluated. DNA isolation was performed on the pathology specimen of six patients, *CDHI* gene was amplified and sequence analysis was performed. The average age of patients was 45.3. Only 5 patients had early gastric cancer at the time of operation. Median survival was 20.1 months and five year survival rate was 23%. *CDHI* gene mutations were found in five patients; four of which were silent mutations and one was non-sense mutation. Exon 1 could not be amplified in two patients. This finding was interpreted as a possible deletion covering the relevant site, which needs verifying by MLPA.

**Keywords:** Gastric cancer, hereditary diffuse gastric cancer, *CDHI* mutation, genetic screening.

# İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ETİK KURUL DEĞERLENDİRME RAPORU</b>	iii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iv
<b>ÖZET</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	ix
<b>ŞEKİLLER</b>	x
<b>TABLolar</b>	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1 Mide Kanseri	2
2.2 Ailevi Mide Kanserleri	3
2.3 Herediter Diffüz Gastrik Kanser	5
2.3.1 Tarihçe	5
2.3.2 Tanı Kriterleri	5
2.3.3 <i>CDH1</i> Gen Mutasyonu	6
2.3.4 Klinikopatolojik Özellikler	9
2.3.5 Doğal Seyir	10
2.3.6 Mutasyon Taşıyıcılarının Klinik Yönetimi	11
2.3.6.1 Endoskopik Takip	12
2.3.6.2 Proflaktik Gastrektomi	14
2.3.6.3 Lobüler Meme Karsinomu	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	17
3.1 Olgular	17
3.2 DNA İzolasyonu	17
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi	19
<b>4. BULGULAR</b>	22
4.1 Demografik Bilgiler ve Ameliyat Sonrası Takip Bulguları	22



4.2 DNA İzolasyonu ve <i>CDHI</i> Dizi Analizi Sonuçları	25
4.2.1 DNA İzolasyonu Sonuçları	25
4.2.2 PCR ve Sanger Sekanslama Sonuçları	25
<b>5. TARTIŞMA</b>	30
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	36
<b>7. KAYNAKLAR</b>	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>CDH1</i>	E-kaderin geni
DNA	Deoksiribonükleik asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MLPA	Multipleks bağlanma esaslı prob amplifikasyonu

## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.</b> E-kaderin ekzonları ve kodladıkları bölgeler. SIG: Sinyal peptidi, PRE: Öncül peptid, EC: Hücre dışı bölüm, TM: Hücre zarı içindeki bölüm, IC: Hücre içi bölüm.	6
<b>Şekil 2.</b> E-kaderin proteininin hücre içi ve hücre dışı bağlantıları.	6
<b>Şekil 3.</b> E-kaderin proteininin hücreler arası bağlantıdaki rolü.	7
<b>Şekil 4.</b> Profektik gastrektomi yapılmış bir mutasyon taşıyıcısının spesimen haritalaması. Yeşil alanlar: invazif ya da in-situ taşlı yüzük hücreli karsinom odakları, Sarı alan: izole invazif taşlı tüzük hücreli karsinom odağı.	9
<b>Şekil 5.</b> Herediter Diffüz Gastrik Kanser taraması ve mutasyon taşıyıcısı bireylere yaklaşımı özetleyen algoritma.	12
<b>Şekil 6.</b> Endoskopide çevre mukozadan daha soluk görülen erken odak.	13
<b>Şekil 7.</b> Kongo kırmızısı ve metilen mavisi kullanılarak yapılan endoskopide görülen erken odak.	14
<b>Şekil 8.</b> 201416370 biyopsi kodlu olgunun tümör dokusu DNA'sında <i>CDHI</i> genindeki 16 ekzonun %2'lik agaroz jelde elde edilen elektroforez görüntüsü.	19
<b>Şekil 9.</b> Diffüz mide kanseri morfolojisine sahip 2 hastanın (a ve b) mide spesimenlerinin farklı büyütmelelerdeki mikroskopik görüntüleri.	21
<b>Şekil 10.</b> Hasta seçim süreci.	22
<b>Şekil 11.</b> Herediter Diffüz Gastrik Kanser sendromunda 5 yıllık sağ kalım eğrisi.	23
<b>Şekil 12.</b> B-15420-08 kodlu spesimende tümör dokusunda <i>CDHI</i> genindeki 2202 T>C değişimi (heterozigot).	25

- Şekil 13.** B-5387-11 kodlu spesimende tümör dokusunda *CDHI* genindeki 2172 G>A ve 2202 T>C değişimleri (heterozigot). 26
- Şekil 14.** B-5387-11 kodlu spesimende normal (tümörsüz) dokuda *CDHI* genindeki 2172 G>A ve 2202 T>C değişimleri (heterozigot). 26
- Şekil 15.** B-16370-11 kodlu spesimende tümör dokusunda *CDHI* genindeki 2022 C>T değişimi (homozigot). 27
- Şekil 16.** B-16370-11 kodlu spesimende normal (tümörsüz) dokuda *CDHI* genindeki 2022 C>T değişimi (heterozigot). 27

## TABLolar

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> <i>CDHI</i> geninde tanımlanmış “mis-sense” mutasyonlar	8
<b>Tablo 2.</b> Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan bileşikler ve miktarları	18
<b>Tablo 3.</b> Polimeraz zincir reaksiyonu için termal amplifikasyon çevrimi programı.	19
<b>Tablo 4.</b> <i>CDHI</i> genini çoğaltmak için kullanılan “primer”ler. İki hastada ekzon 1’in çoğaltılamaması nedeniyle ikinci bir primer kullanılarak işlem tekrarlanmıştır. “1*” ikinci işlemde kullanılan “primer”leri göstermektedir.	20

## 1. GİRİŞ

Mide kanserlerinin çoğu sporadiktir, yaklaşık %10 – 15'i ise belirli ailelerde kümelenme gösterir (1). Günümüze kadar ulaşan belgelere göre bilinen ilk ailevi mide kanseri serisi, Napoleon Bonaparte'ın ailesinde tanımlanmıştır; altı aile ferdi (dedesi, babası, bir erkek ve üç kız kardeşi) mide kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir (2). Genetik temeli ortaya konmuş mide kanserleri (herediter mide kanserleri) ise, tüm mide kanserlerinin %1-3'ünü oluşturur. Tanımlanmış sendromlar arasında, “herediter diffüz gastrik kanser,” “ailevi intestinal gastrik kanser” ile “gastrik adenokarsinom ve midenin proksimal polipozisi” bulunur (3).

“Herediter diffüz gastrik kanser” sendromu erken yaşta ortaya çıkan diffüz mide kanseri ve lobüler meme kanseri ile tanımlanan bir kansere yatkınlık sendromudur. Diffüz mide kanseri histolojisinde taşlı yüzük hücreleri hakimdir ve tümörler genellikle multifokaldir (4). Bu herediter kanser sendromu, ilk olarak 1964'te Yeni Zelandalı geniş bir Maori ailesi üzerinde tanımlanmıştır; toplam 98 aile üyesinin 28'i mide kanseri tanısı almıştır (5). Guilford ve arkadaşları 1998'de yaptıkları çalışmalarla genetik temellerini ortaya koymuştur (6). Herediter diffüz gastrik kanser, bir hücreler arası adezyon proteini olan “e-kaderin” proteinini kodlayan, insan genomunda 16. kromozomun uzun kolunda (16q22.1 lokusunda) bulunan *CDHI* genindeki mutasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır. Otozomal dominant kalıtım izlenmektedir, bu nedenle, etkilenen ailelerde her nesildeki bireyleri risk altındadır.

*CDHI* gen mutasyonu taşıyıcısı olan bireyler tüm yaşamları boyunca %80 mide kanseri gelişimi riski altındadır (7). Bu nedenle taşıyıcıların belirlenmesi ve takipleri çok önemlidir. Bu sendromda etkilenen gen yaklaşık 20 yıl önce tanımlanmış olmasına rağmen ülkemizde henüz bu konu ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda ameliyat edilen “Herediter Diffüz Mide Kanseri”li hastalardaki *CDHI* genini sekanslayarak, üniversitemizde ve ülkemizde ilk defa *CDHI* mutasyonlarının araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Mide Kanseri

Mide kanseri, tüm dünyada görülen kanserler arasında dördüncü sırada ve kanser ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (8). Her yıl yaklaşık 1 milyon hastaya mide kanseri tanısı konulmakta olup ve bunların %70 – 85'i ile beş sene içinde kansere bağlı nedenlerle hayatını kaybeder (9). Ülkeler arasında insidansı farklılık göstermektedir, Asya, Güney Amerika ve Doğu Avrupa'da daha sıklıkla ortaya çıkmaktadır. Erken dönemde genellikle asemptomatiktir ve bu nedenle hastalar çoğunlukla ileri evrede tanı alır. Küratif amaçla yapılan tek tedavi seçeneği cerrahi rezeksiyondur; ancak ileri evrede tanı almaları nedeniyle hastaların %80 – 90'ı ya tanı anında “inoprable” dir ya da 5 sene içinde rekürrens gelişir (10).

Mide kanserlerinin büyük çoğunluğu sporadiktir; ancak hastaların %10 – 15'inin belirli ailelerde kümelendiği görülmektedir (11). Birinci derece akrabalarda mide kanseri öyküsü olan bireylerdeki risk 1.5 – 3 kat artmıştır (4). Ailevi mide kanserlerinin içinde daha küçük bir grubun (toplam mide kanserlerinin %1 – 3'ü) genetik temelleri ortaya konabilmiştir.

Mide kanseri temelinde tanımlanan sendromlar arasında herediter diffüz gastrik kanser, ailevi intestinal gastrik kanser ile “gastrik adenokarsinom ve midenin proksimal polipozisi” sendromları yer alır. Bunlardan başka, Li – Fraumeni sendromu, ailevi adenomatöz polipozis, Peutz – Jeghers sendromu, Lynch sendromları, juvenil polipozis sendromu ve Cowden sendromu gibi herediter kanser sendromlarında da mide kanseri gelişme riski, genel topluma oranla artmıştır (1). Bu risk Peutz – Jeghers sendromunda %29, juvenil polipozis sendromunda da %21 gibi yüksek oranlarda bildirilmiştir (12, 13).

Mide kanserleri morfolojik açıdan heterojen bir görünüme sahiptir. Günümüzde en sık kullanılan Dünya Sağlık Örgütü ve Lauren sınıflamalarına göre birbirinden farklı özellikler gösteren iki farklı histolojik tipte mide kanseri tanımlanabilir: intestinal ve diffüz tip (14, 15). Bu iki alt tür mide kanseri birbirinden

farklı klinikopatolojik özellikler sergiler ve genellikle farklı epidemiyolojik altyapılara sahiptir. Ayrıca mide tümörlerinin çeşitliliği ve karmaşıklığı göz önüne alındığında, intestinal ve diffüz mide kanserlerinin gelişiminde farklı genetik yollardaki hasarların sorumlu olduğu düşünülmektedir (7).

İntestinal tip daha çok çevresel faktörler (obezite, tütülenmiş ya da fermente gıdalar, sigara, *H. pylori* enfeksiyonu) ve ileri yaş ile ilişkilidir, diffüz tip sıklıkla genç hastalarda görülür (11). İntestinal tip sıklıkla midenin distalinde, diffüz tip ise proksimalde ortaya çıkar (4). İntestinal tipte genellikle tübüler ya da papiller yapıda bez yapıları izlenirken; diffüz tipte taşlı yüzük hücreleri, dezmoplastik reaksiyon yaygındır ve daha infiltratif bir seyir gösterir (3). İntestinal mide kanserlerinin insidansı çoğu ülkede azalmaktadır; bu eğilimin çevresel etmenlerin kanser gelişimindeki rolü ile ilgili farkındalığın artması ve buna göre yaşam biçiminde yapılan değişiklikler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Diffüz mide kanseri insidansı ise sabit kalmakta ve bazı kaynaklara göre artmaktadır (16). Bu durum, diffüz mide kanserinin gelişiminde genetik altyapının daha önemli bir rolü olabileceği sonucunu doğurmaktadır.

## 2.2 Ailevi Mide Kanserleri

Gerçek herediter mide kanserleri, tüm mide kanserlerinin %1 – 3'ünü oluşturur. Günümüzde tanımlanmış üç ana sendrom bulunmaktadır (17):

- Herediter diffüz gastrik kanser
- Ailevi intestinal gastrik kanser
- Gastrik adenokarsinom ve midenin proksimal polipozisi

Gastrik adenokarsinom ve midenin proksimal polipozisi sendromu 2012 yılında tanımlanmış, otozomal dominant geçişli bir sendromdur. Kolorektal ya da duodenal polipozis veya diğer gastrointestinal kanser sendromları olmaksızın proksimal mideye sınırlı fundik bez polipleri izlenmektedir. Bu polipler üzerinde displazi ve intestinal tip mide kanseri gelişebilmektedir. Hastalarda mide fundus ve



korpusunda 10 mm'den küçük yüzden fazla fundik bez polipi bulunur. Özofagus, antrum, pilor ve duodenum korunmuştur. Tanı konmadan önce hastaların proton pompa inhibitörü kullanmadığından emin olunmalıdır. Bu sendromda bildirilen en genç mide kanseri olgusu 33 yaşında tanı almıştır (18).

Ailevi intestinal mide kanseri, herediter polipozis ya da kanser sendromları olmaksızın belirli bir ailede intestinal tipte mide kanserlerinin kümelenmesi ile tanımlanır. Tanı kriterleri, o bölgedeki mide kanseri insidansının düşük ya da yüksek olmasına göre değişmektedir. Kore ya da Japonya gibi insidansın yüksek olduğu ülkelerde Amsterdam kriterlerine benzer kriterler mevcuttur (19):

- En az üç akrabada intestinal tip mide kanseri olmalıdır ve hastalardan biri diğer ikisinin birinci derece akrabası olmalıdır,
- En az iki ardışık nesil etkilenmiş olmalıdır,
- Hastalardan birinde tanı 50 yaşından önce konmuş olmalıdır.

İngiltere ve ABD gibi mide kanseri insidansının düşük olduğu ülkelerde geçerli kriterler ise:

- Biri 50 yaşından önce tanı almış olan en az 2 birinci ya da ikinci derece akrabada intestinal tip mide kanseri olması ya da
- Herhangi bir yaşta üç veya daha fazla akrabada intestinal tip mide kanseri olmasıdır.

Ailevi intestinal mide kanserli bir çok ailede otozomal dominant kalıtım gözlenmektedir; ancak genetik altyapısı henüz ortaya konamamıştır (17).

## 2.3 Herediter Diffüz Gastrik Kanser

### 2.3.1 Tarihçe

Herediter diffüz gastrik kanser sendromu, ilk olarak 1964'te, 98 aile üyesinin 28'i mide kanseri olan Yeni Zelandalı geniş bir Maori ailesinde tanımlanmıştır (5). Guilford ve arkadaşları 1998'de yaptıkları çalışmalarla genetik temellerini ortaya koymuştur (6). Otozomal dominant kalıtılan, erken yaşta ortaya çıkan ve diferansiyasyonu kötü olan bu mide kanseri türüne, genetik bağlantı analizi yapılarak, *CDH1* mutasyonunun sebep olduğunu gösterilmiştir. Günümüze kadar bildirilen herediter diffüz gastrik kanser olguları içinde en genç mide kanseri hastası 14 yaşında tanı almıştır (20). *CDH1* mutasyonu taşıyıcısı olup profilaktik total gastrektomi yapılan en genç hasta ise 16 yaşında ameliyat olmuştur (21).

### 2.3.2 Tanı Kriterleri

Herediter diffüz gastrik kanser sendromu için tanı kriterleri ilk kez 1999 yılında "Uluslararası Mide Kanseri Bağlantı Konsorsiyumu" (International Gastric Cancer Linkage Consortium) tarafından belirlenmiş, 2010 ve 2015 yıllarında yeniden düzenlenmiştir (17, 22, 23). Buna göre aşağıdaki kriterlerden birinin sağlanması durumunda herediter diffüz gastrik kanser tanısı konulur ve bu bireylerin ailelerine genetik test ve danışmanlık önerilir:

1. Ailede yaştan bağımsız olarak; biri diffüz mide kanseri olmak üzere iki mide kanseri,
2. Kırk yaşından önce diffüz mide kanseri,
3. Biri 50 yaşından önce tanı almak koşuluyla, aynı kişide ya da ailesinde diffüz mide kanseri ve lobüler meme kanseri.

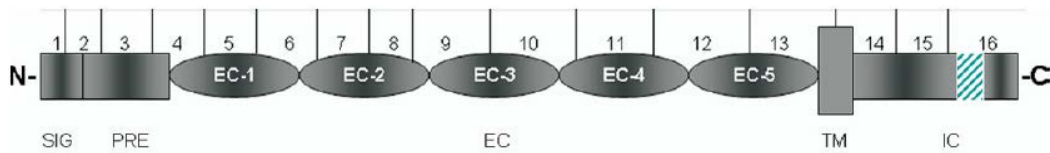
Konsorsiyum, 2015 yılındaki güncellemesinde ayrıca bu kriterleri taşımasalar bile genetik testin düşünülebileceği aileleri de şöyle tanımlamıştır (23):

1. Bilateral lobüler meme kanseri veya 50 yaşından önce iki ya da daha fazla meme kanseri,

2. Diffüz mide kanseri olan bir hastanın kendisinde ya da ailesinde yarık damak/dudak öyküsü,
3. İn-situ taşlı yüzük hücreleri ve/veya taşlı yüzük hücrelerinin Pagetoid yayılımı.

### 2.3.3 *CDH1* Gen Mutasyonu

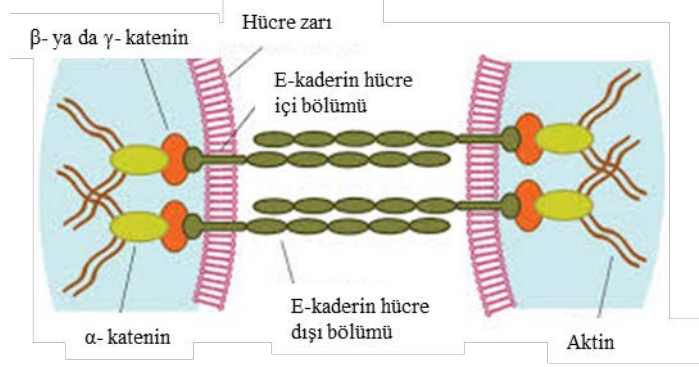
*CDH1* geni, 16p22.1 lokusunda yer alır. Yaklaşık 100 kilobaz büyüklüğünde, 16 ekzonluk bir kodlanan bölgeye sahiptir ve 728 amino asit büyüklüğündeki e-kaderin adı verilen bir transmembran proteini kodlar (Şekil 1) (24).



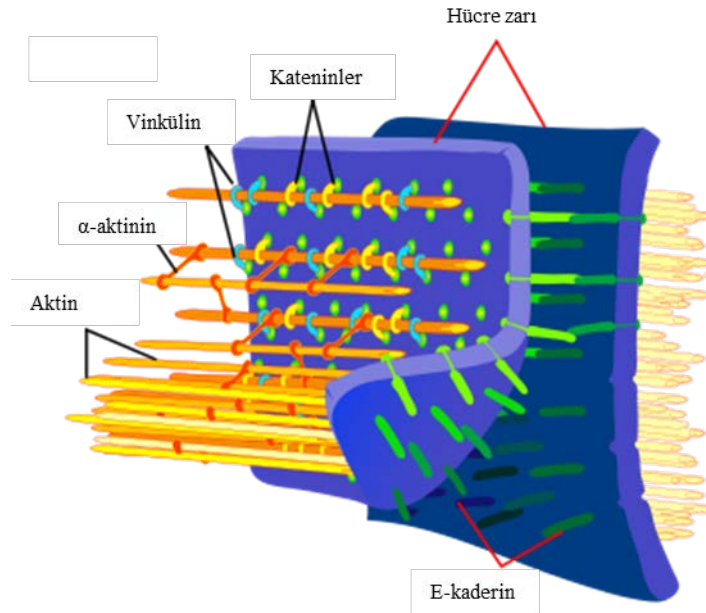
Şekil 1: E-kaderin ekzonları ve kodladıkları bölgeler. SIG: Sinyal peptidi, PRE: Öncül peptid, EC: Hücre dışı bölüm, TM: Hücre zarı içindeki bölüm, IC: Hücre içi bölüm.

E-kaderin, tüm memelilerin epitelinde bulunan bir glikoproteindir. Hücre adezyon molekülleri ailesinde yer alır ve bu ailenin tanımlanan ilk üyesidir (25). Hücre içindeki bölümü 151 amino asitten oluşur ve  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  – kateninler aracılığı ile hücre içi aktin iskeletine bağlanır. Hücre dışındaki bölümü, 554 amino asitten oluşur ve komşu hücrelerin e-kaderin molekülleri ile iletişim halindedir (Şekil 2) (26-28).

Hücre gelişimi, diferansiasyonu ve epitel yapısının korunması açısından önemli bir adezyon proteindir (Şekil 3). E-kaderinin normal yapısını kaybetmesi sonucu ortaya çıkan herediter diffüz gastrik kanserde izlenen bez yapısının kaybı, hücre polaritesinin kaybı gibi morfolojik özellikler, bu proteinin görevini destekler niteliktedir (11, 17, 29). Ayrıca konjenital bir orta hat defekti olan yarık damak/dudak da *CDH1* mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir (30, 31).



Şekil 2: E-kaderin proteininin hücre içi ve hücre dışı bağlantıları.



Şekil 3: E-kaderin proteininin hücreler arası bağlantıdaki rolü

Hereditör diffüz gastrik kanserli ailelerin %25 – 50'sinde *CDH1* geni mutasyonu saptanmaktadır. Bu mutasyon, sonraki nesillere otozomal dominant kalıtımla aktarılmaktadır. *CDH1* gen mutasyonu taşıyan bireylerde 80 yaşına geldiklerinde mide kanseri görülme riski erkeklerde %67, kadınlarda %83'tür (20, 22). Ayrıca, kadın bireyler için lobüler meme kanseri riski %42'dir (32).

Günümüzde tanımlanmış 120'nin üzerinde *CDHI* gen mutasyonu mevcuttur. Mutasyonlar, e-kaderin proteininin sentezini, hücredeki yerleşimini ve fonksiyonunu etkileyebilir (33). En sık mutasyon türü küçük çerçeve kayması mutasyonlardır (%37.5), bunu “splice-site”, “non-sense”, “mis-sense” mutasyonlar ve büyük yer değiştirmeler ve silinmeler takip etmektedir (23, 34). Tanımlanmış “mis-sense” mutasyonlar Tablo 1’de özetlenmiştir. Bir alleli mutant olan taşıyıcılarda, promotor bölge hipermetilasyonu ve heterozigosite kaybı gibi ikinci bir etki (second – hit) sonucu diğer allelin de kaybı ile mide kanseri oluşum süreci başlamaktadır (35).

Ekzon	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Mutasyonlar</b>	P3R	P30T	G62V	P172R	E185V	S232C	A298T	T340A
			T118R		L214P	G239R		P373L
					R224C	D244G		
						S270A		
						G274S		

Ekzon	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Mutasyonlar</b>	A408V	V487A		L583R	L721V	R732Q	D777N	V832M
	W409R			A592T		R749W	E781D	
	I415L			T599S		E757K	P799R	
	P429S			R605G				
	D433N			A617T				
				F626I				
			A634V					

Tablo 1: *CDHI* geninde tanımlanmış “mis-sense” mutasyonlar

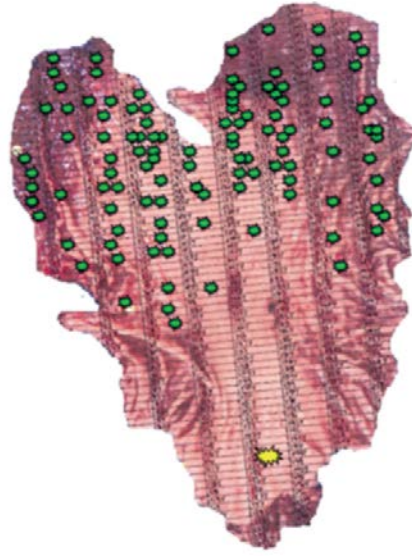
Yeni yayınlarda, tanı kriterlerini taşıyan ailelerde *CDHI* geni dışında birkaç gende de mutasyonlar bildirilmiştir. *CTNNA1*, *MAP3K6*, *INSR*, *FBXO24*, *DOT1L* gen mutasyonları da, *CDHI*'e ek olarak bu sendromdan sorumlu tutulmuştur; ancak bu bildiriler henüz tek aile düzeyindedir (8, 36, 37).

### 2.3.4 Klinikopatolojik Özellikler

Diğer mide kanserlerine benzer şekilde, herediter diffüz gastrik kanser hastaları erken dönemde asemptomatiktir ve ileri evrede tanı alırlar. Bu dönemde 5 yıllık sağ kalım %20'nin altındadır (38). Tanı anında ortalama yaş 38'dir. Bildirilen olgular içinde en erken tanı yaşı 14, en geç tanı yaşı ise 82'dir. İleri evrede tanı alan hastalarda başvuru şikayetleri arasında kilo kaybı, karın ağrısı, bulantı, iştahsızlık, erken doyumluk hissi ve melena yer alır (8). Daha ileri dönemde palpe edilebilen bir kitle bulunabilir. Metastatik hastalarda hepatomegali, asit, sarılık, deride nodüller ve patolojik kırıklar izlenebilir (39).

Çoğu herediter diffüz gastrik kanser sendromu ailesindeki indeks hastalar, ileri evrede tanı alır ve bu hastalarda mide duvarının tamamının tutulduğu "linitis plastica" saptanır. Mutasyon taşıyıcılarında yapılan profilaktik gastrektomi spesimenleri ise makroskopik olarak hemen daima normaldir (40, 41). Bu nedenle, profilaktik gastrektomi spesimenlerinin patoloji incelemesinde tüm midenin titizlikle değerlendirilmesi çok önemlidir.

Günümüzde bildirilen 100'den fazla profilaktik gastrektomi olgusu mevcuttur. Çoğu spesimende mikroskopik taşlı yüzük hücreli kanser odakları ya da prekürsör lezyonlar izlenir ve bunların sayısı son derece değişken olarak bildirilmiştir (1 – 487; ortalama 20 – 25) (42-45). Prekürsör lezyonlar, bazal membran içinde taşlı yüzük hücrelerinin bulunması ile tanımlanan in-situ karsinom ve normal bez ya da foveolar epitelin altında bulunan taşlı yüzük hücrelerinin Pagetoid yayılımı olarak tanımlanmıştır (46). Bu odakların sayısı, hastaların yaşları ile orantılı değildir; 487 odak bulunan spesimen en genç yaşta (16 yaşında) profilaktik gastrektomi ameliyatı olan bireye aittir (40). Bu odakların dağılımı Kuzey Amerika ve Avrupa'da midenin belirli bir bölgesinde yoğunlaşmazken, Maori ailelerinde çoğunlukla distal mide ve korpus-antrum geçiş bölgesinde izlenmiştir (40-42, 44, 47). Özellikle kanser odağı sayısının düşük olduğu bireylerde tüm spesimenin incelenmesinin önemi ortaya çıkmaktadır. Profilaktik gastrektomi yapılmış bir mutasyon taşıyıcısının spesimeninde haritalanmış taşlı yüzük hücreli kanser odakları Şekil 4'te gösterilmiştir (48).



Şekil 4: Proflaktik gastrektomi yapılmış bir mutasyon taşıyıcısının spesimen haritalaması. Yeşil alanlar: invazif ya da in-situ taşlı yüzük hücreli karsinom odakları. Sarı alan: izole invazif taşlı yüzük hücreli karsinom odağı.

Herediter diffüz gastrik kanser sendromunda midenin yanı sıra meme kanseri de artmış sıklıkta görülmektedir. Bu sendromda görülen meme kanserinin özelliği sıklıkla lobüler meme kanseri olmasıdır (%77). Bu oran sporadik meme kanserleri içindeki %10'luk lobüler meme kanseri oranından oldukça yüksektir (47). Sporadik lobüler meme karsinomlarının %56'sında *CDH1* mutasyonunun izlenmesi ve morfolojik olarak diffüz mide kanserine benzer olarak bez yapısı oluşturmaması da, her iki kanser arasında bir bağlantı olduğunu desteklemektedir (49, 50).

Herediter diffüz gastrik kanser ailelerinde, kolorektal ve diğer bazı kanserler de gösterilmiştir; ancak bunların sıklığı normal popülasyondan farklı değildir (17, 38, 51, 52).

### 2.3.5 Doğal Seyir

Herhangi bir girişim yapılmayan *CDH1* gen mutasyonu taşıyıcılarında 30 yaşında kümülatif mide kanseri gelişme riski hem erkekler hem de kadınlar için yaklaşık %4'tür. Elli yaşına gelindiğinde bu risk erkekler için %21, kadınlar için %46'ya yükselir ve 80 yaşına gelindiğinde erkeklerde %67, kadınlarda %83 olur (45,

47). Oysa ki bugüne kadar yapılmış 100'ün üzerindeki proflaktik gastrektomi spesimeninin hemen tamamında birden fazla sayıda in – situ ve T1a karsinom odağı bulunmuştur (17, 22). Bu durum aşağıdaki iki sonucu ortaya çıkarmaktadır:

- *CDHI* gen mutasyonu taşıyıcılarının hepsinde in – situ ve T1a karsinom odakları, daha ileri evreye ulaşmamaktadır.
- Var olan in – situ ve T1a karsinom odaklarının, T1b ve daha ileri evreye ulaşması için gereken süre belli olmamakla beraber, bazı hastalarda bu süre çok uzayabilir (53). Bilinen en yaşlı asemptomatik taşıyıcı 75 yaşında iken, mide kanserine bağlı en genç yaştaki ölüm 14 yaşındaki bir erkek hastada gerçekleşmiştir (47).

Proflaktik gastrektomi spesimenlerindeki odaklar dikkate alındığında, tüm erken odakların aşikar mide karsinomuna ilerleme riski %0.5 olarak hesaplanmıştır (54).

Yeni Zelanda grubu, çoğu mutasyon taşıyıcısında erken odakların 20 – 30 yaşlarında geliştiğini ve diğer genetik, epigenetik ya da mikroçevre değişiklikleri sonucunda submukoza invazyonu ile aşikar mide karsinomunun oluştuğunu öne sürmüştür (53).

Erken evrede tanı konulup ameliyat edilen hastalarda 5 yıllık sağ kalım %90'ın üzerindedir. İleri evrede tanı alan hastalarda bu oran %20'ye düşmektedir (55). Bu durum, erken tanı ve tedavinin, hatta proflaktik girişimlerin önemini vurgulamaktadır.

### **2.3.6 Mutasyon Taşıyıcılarının Klinik Yönetimi**

Asemptomatik mutasyon taşıyıcılarının belirlenmesi, herediter diffüz gastrik kanser insidansının azaltılmasında en önemli etkidir. Uluslararası Mide Kanseri Bağlantı Konsorsiyumu tarafından belirlenen kriterler ile herediter diffüz gastrik kanser sendromu tanısı alan aileler ve bu kriterleri taşımasa bile diğer bazı özellikleri (Bkz. 1.3.2 Tanı Kriterleri) taşıyan ailelerin bireyelerine genetik tarama yapılması önerilmektedir. Tartışmalı konular ise genetik taramanın kaç yaşından itibaren



yapılması gerektiği ve etkilenen bireylerin nasıl takip edileceği ya da proflaktik cerrahi girişimlerin yapılıp yapılmayacağıdır.

Yirmi yaşından önce mide kanseri gelişme riski %1'in altında olmasına rağmen, Uluslararası Mide Kanseri Bağlantı Konsorsiyumu, ailesinde erken yaşta diffüz mide kanseri olgusu bireylerde 16 – 18 yaşında genetik tarama yapılmasını önermektedir (56).

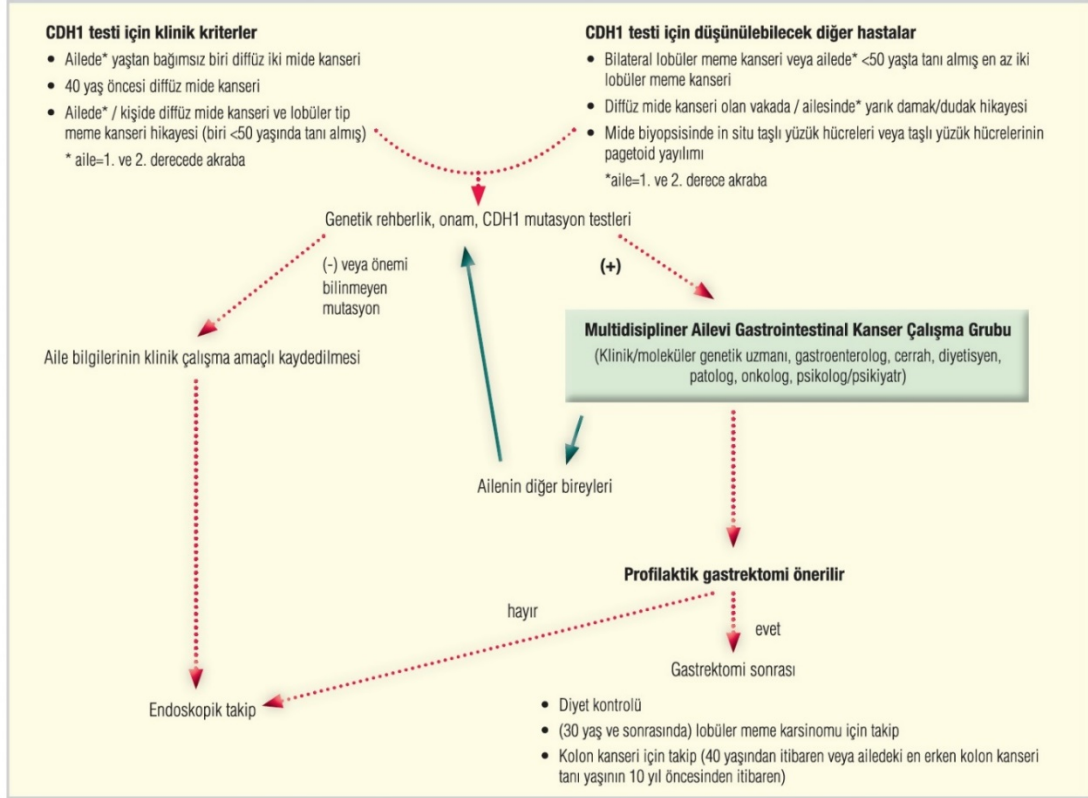
*CDHI* gen mutasyonu saptanan bireylerde en önemli konu bundan sonraki adımın ne olacağıdır. Günümüzde mide kanseri riskine yönelik iki yaklaşım bulunmaktadır:

- Yakın endoskopik takip
- Proflaktik gastrektomi

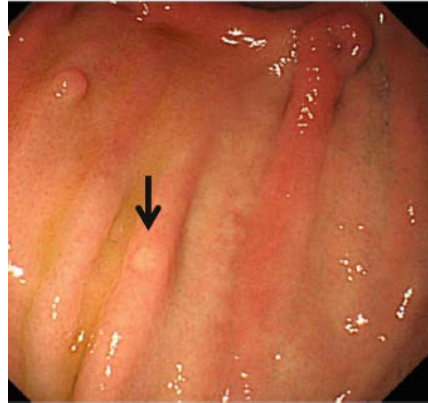
Her iki yaklaşımın da savunucuları mevcuttur. Herediter diffüz gastrik kanser sendromu tanısı olan birey ve ailelere yaklaşım için kullanılabilir bir algoritma Şekil 5'te gösterilmiştir (3).

### **2.3.6.1 Endoskopik Takip**

*CDHI* gen mutasyonu taşıyıcılarında endoskopik takip tartışmalıdır. Bu bireylerde endoskopinin rolü, midenin korunması ya da ameliyatın mümkün olduğunca ertelenmesidir. Yakın endoskopik takibi savunanların en büyük dayanağı, hastalık penetransının ortalama %80 olmasıdır. Buna göre proflaktik gastrektomi yapılan *CDHI* gen mutasyonu taşıyıcılarının %20'si gereksiz yere ameliyat olmaktadır (29, 57, 58). Buna karşın erken odakların genellikle intakt mukoza ile örtülü olması, tanımlanmalarını oldukça zorlaştırır ve işlemin etkinliğini düşürür (41, 42, 59). Tanımlanabilen odaklar normal mukozadan daha soluk milimetrik bölgeler şeklinde görülür (Şekil 6) (60).



Şekil 5: Hereditör Diffüz Gastrik Kanser taraması ve mutasyon taşıyıcısı bireylere yaklaşımı özetleyen algoritma (3).



Şekil 6: Endoskopide çevre mukozadan daha soluk görülen erken odak (60).

Uluslararası Mide Kanseri Bağlantı Konsorsiyumu, 2015'teki konsensus raporunda endoskopi endikasyonlarını aşağıdaki şekilde sıralamıştır (23):

- Proflaktik ameliyatı reddedenler
- Proflaktik ameliyatın önerildiği yaştan (yaklaşık 20 yaş) daha genç olan mutasyon taşıyıcıları
- Yeni tanı alan taşıyıcıda proflaktik ameliyat öncesi

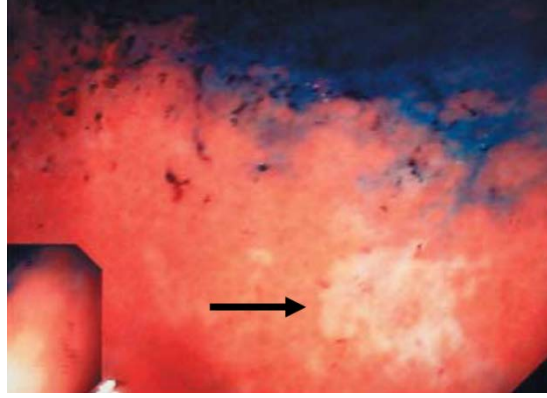
Endoskopik takibin başlama zamanı, mutasyon taramasına benzer şekilde 16 – 18 yaş olarak önerilmektedir. Altı – on iki aylık takiplerin deneyimli merkezlerde yapılması önemlidir (1). Fujita ve arkadaşlarının çalışmasına göre %90 hassaslık ile en az bir kanser odağı yakalamak için 1768 biyopsi yapılması gerekmektedir (61).

Konsensus önerisine göre en az 30 dakikalık titiz bir inceleme yapılmalıdır. İşlem öncesi N – asetilsistein gibi mukolitik ajanların kullanılması görüntü kalitesini iyileştirebilir. Ayrıca, tanı değerinin yükselmesi için pre-pilorik alan, antrum, korpus, fundus ve kardiya bölgelerinden toplam en az 30 biyopsi örnekleme yapılmalıdır (62). Lim ve arkadaşları, 2014’te yaptıkları kohort çalışmasında endoskopik biyopsinin duyarlılığını %64 olarak hesaplamıştır (63).

Kongo kırmızısı ve metilen mavisi kullanılarak yapılan kromoendoskopi, taramanın duyarlılığını artırmaktadır (Şekil 7) (53); ancak son yıllarda Kongo kırmızısının toksik etkilerine ait bildirimler artmıştır. Bu nedenle rutin kullanımı önerilmemektedir (24).

### 2.3.6.2 Proflaktik Gastrektomi

Günümüze kadar elde edilen verilere göre *CDHI* mutasyonu taşıyıcılarında 20’li yaşların ortasında, mide kanserinden ölüm riski, aynı yaşta uygulanan total gastrektominin mortalitesini (%1) aşmaktadır. Bu nedenle, endoskopinin sınırlılıkları da göz önünde bulundurularak mutasyon taşıyıcılarına önerilmesi gereken seçkin yöntem proflaktik total gastrektomidir (47, 64).



Şekil 7: Kongo kırmızısı ve metilen mavisi kullanılarak yapılan endoskopide görülen erken odak.

Ameliyatın zamanlaması her hastanın kendi durumuna göre seçilir. Genel olarak mutasyon taşıyıcılarına 20 yaşından sonra profilaktik gastrektomi seçeneği sunulur. Bir başka yaklaşım ise, ailedeki en erken mide kanseri tanı yaşından 5 yıl önce profilaktik ameliyatın gerçekleştirilmesidir. Kadın bireylerde total gastrektominin gebeliğe etkileri nedeniyle ertelenebilir; ama 40 yaşından daha fazla gecikilmemesi önerilmektedir (56).

Uygulanması gereken ameliyat, total gastrektomi ve Roux-en-Y ösofagojejunostomidir. Jejunal poş yapılmasının, ameliyat sonrası erken dönemde yemek yeme ve kilo alımı üzerine olumlu etkileri olsa da uzun dönem faydası belirgin değildir. Benzer şekilde, ösofagus ile duodenum arasına jejunum ansı interpozisyonu da klinik olarak belirgin fayda sağlamayıp morbiditeyi artırmaktadır. Lenf nodu diseksiyonu konusunda konsensus kararı D1 diseksiyon yapılmasıdır (65).

Profilaktik gastrektomide temel amaç mide mukozasının tamamen çıkarılması olduğu için hem ösofagogastrik bileşkenin, hem de gastroduodenal bileşkenin çıkarılması gerekir (66, 67).

Burada önemi belirtilmesi gereken bir başka konu da Meckel Divertikülü'dür. Mide mukozası barındırma olasılığından dolayı, profilaktik gastrektomi yapılan her bireyde Meckel Divertikülü'nün varlığı araştırılması ve mevcutsa divertikülektomi de yapılmalıdır (68).

### 2.3.6.3 Lobüler Meme Karsinomu

*CDHI* mutasyon taşıyıcısı kadınlarda meme karsinomu görülme riski artmıştır; 80 yaşında kümülatif risk %42'ye ulaşır. İntraduktal karsinomun çoğunluğunu oluşturduğu sporadik meme kanserinin aksine, *CDHI* mutasyonu olan kadınlarda görülen meme karsinomunun hemen tamamı lobüler tiptedir (47).

Lobüler karsinomda, duktal karsinomdan farklı olarak hücreler bir kitle oluşturmaz; kordonlar ya da tabakalar halinde diffüz yayılım gösterir. Hem bu nedenlerle, hem de mikrokalsifikasyonların görece az olması nedeniyle lobüler meme karsinomunda mammografinin duyarlılığı düşüktür (69).

*CDHI* mutasyonu olduğu bilinen kadınlarda 30 yaşından itibaren yıllık meme muayenesi ve manyetik rezonans görüntüleme ± mammografi ile tarama önerilmektedir. Proflaktik mastektomi rutin olarak önerilen bir uygulama değildir; ancak hasta özelinde uygun bir seçenek olabilir. Selektif östrojen reseptör modülatörleri ve aromataz inhibitörleri de riski azaltmaya yardımcı olabilir (23).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Olgular

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi girişimsel olmayan etik kurul onamı (11 Ekim 2016 tarihli, GO 16/612-09 sayılı karar) alındıktan sonra olguların belirlenmesine başlandı.

Genel Cerrahi Anabilim Dalı veritabanı kullanılarak, 01.01.1998 – 01.09.2016 tarihleri arasında mide kansinomu nedeniyle ameliyat edilen hastalar belirlendi. Bu hastaların bilgileri taranarak aşağıdaki kriterleri sağlayan hastalar çalışmaya dahil edildi.

Araştırmaya kabul kriterleri:

- Ailede yaştan bağımsız olarak; biri diffüz mide kanseri olmak üzere iki mide kanseri,
- Kırk yaşından önce diffüz mide kanseri,
- Biri 50 yaşından önce tanı almak koşuluyla, aynı kişide ya da ailesinde diffüz mide kanseri ve lobüler meme kanseri.

Belirlenen hastaların demografik bulguları, cerrahi girişimleri, patoloji bulguları ve ameliyat sonrası dönem takip sonuçları değerlendirildi.

#### 3.2 DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen 6 hastanın formalin ile fikse edilmiş dokularından yüksek saflıkta DNA izolasyonu için geliştirilmiş QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Kat No: 56404) kullanılarak ve kitin prospektüsünde tanımlanan yöntemle sadık kalınarak MinElute spin kolon kullanılarak kesit bloklarından 200 µg DNA elde edildi. DNA izolasyonu hem tümörlü, hem normal dokudan yapıldı. Tümör dokusu ve normal

dokudan DNA elde edilmesi aynı protokol ile gerçekleştirildi. Mikroskopik diseksiyonla izole edilen tümör içeren ve normal dokulardan hazırlanan 5 µm kalınlığında 8 adet parafin kesit DNA eldesi için kullanıldı.

1. Kesitler 1.5 ml santrifüj tüpüne konuldu ve 1 ml ksilen eklendi. On saniye beklendi
2. Örnekler oda sıcaklığından son hızda 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
3. Süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
4. Bir ml etanol (%100) eklendi.
5. Örnekler oda sıcaklığında son hızda 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. Süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
7. Tüpler açıldı ve rezidüel etanolün buharlaşması için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
8. 180 µl tampon çözelti ve 20 µl proteinaz K eklendi ve karıştırıldı.
9. Örnekler lizisin tamamlanması için 56°C'de 1 saat süreyle bekletildi.
10. Örnekler 90°C'de 1 saat süreyle bekletildi.
11. Kapak kısmında kalan damlaların düşürülmesi için kısa bir süre santrifüj yapıldı.
12. 200 µl tampon çözelti ve 200 µl etanol (%100) eklendi ve karıştırıldı.
13. Kapak kısmında kalan damlaların düşürülmesi için kısa bir süre santrifüj yapıldı.
14. Bütün lizat QIAamp Min Elute kolonuna taşındı. Bir dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz toplama tüpüne alındı.
15. Kolon açılarak 500 µl tampon çözelti konuldu ve 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz toplama tüpüne alındı.

16. Kolon açılarak 500 µl tampon çözelti konuldu ve 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolon temiz toplama tüpüne alındı.
17. Son hızda (14.000 rpm) 3 dakikalık santrifüj uygulandı.
18. Kolon mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 100 µl tampon çözelti eklendi.
19. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra son hızda 1 dakikalık santrifüj uygulandı.

#### **DNA Kantitasyonu:**

DNA kantitasyonu, NanoDrop ND-1000 cihazında spektrofotometrik olarak yapıldı. DNA izolatları 20 ng/µl'ye seyreltildi.

### **3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizi Analizi**

Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan bileşikler ve termal amplifikasyon çevrimi programı Tablo 2 ve 3'te özetlenmiştir.

<b>PCR Bileşenleri</b>	<b>1X (µl)</b>
ddH <sub>2</sub> O	21,75
10X PCR Buffer	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	6
dNTP	4
Forward Primer	2,5
Reverse Primer	2,5
DNA	5
Taq Polimeraz	0,25
<b>Son Hacim</b>	<b>50 µl</b>

Tablo 2: Polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan bileşikler ve miktarları

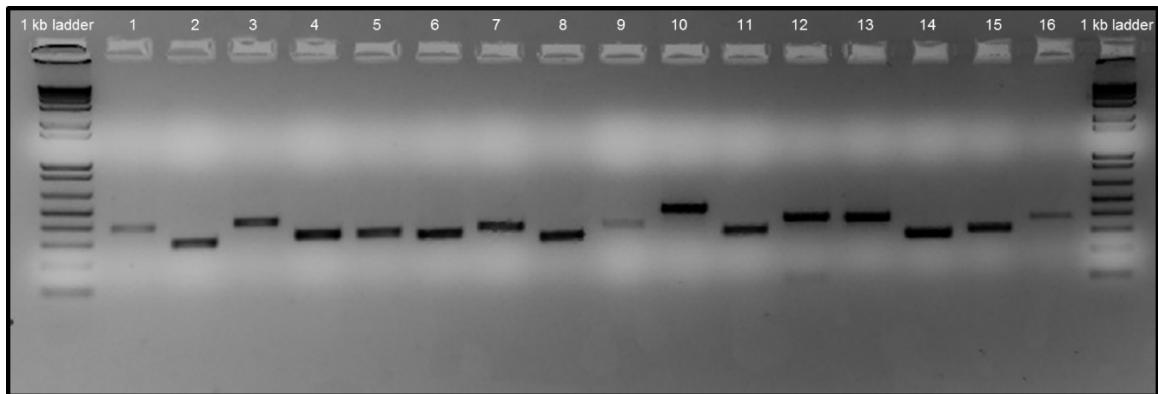


<b><i>CDH1</i> PCR Thermal Cycler Programı</b>		
<b>Sıcaklık</b>		<b>Süre</b>
95 °C		10 sn
94 °C	} <b>39 döngü</b>	30 sn
55-63 °C		1 dk
72 °C		1 dk
72 °C		10 dk
4 °C		∞

Tablo 3: Polimeraz zincir reaksiyonu için termal amplifikasyon çevrimi programı

Polimeraz zincir reaksiyonunda *CDH1* genini kullanılan çoğaltmak için kullanılan “primer”ler Tablo 3’te gösterilmiştir.

PCR ürünleri “EURX GeneMATRIX Temel DNA Purification Kit (Kat no: E3545)” ile saflaştırıldı ve %2’lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu. İşlem sonrasında elde edilen spesifik amplicon bantları UV ışığı altında fotoğraflandı (Şekil 8) ve uygun olduğu görüldü.



Şekil 8: 201416370 biyopsi kodlu olgunun tümör dokusu DNA’sında *CDH1* genindeki 16 ekzonun %2’lik agaroz jelde elde edilen elektroforez görüntüsü.

Uygunluğu teyit edilen PCR ürünlerine, Genoks Genetik Hastalıklar Tam Merkezi tarafından Sanger sekanslama yöntemiyle dizi analizi yapıldı.

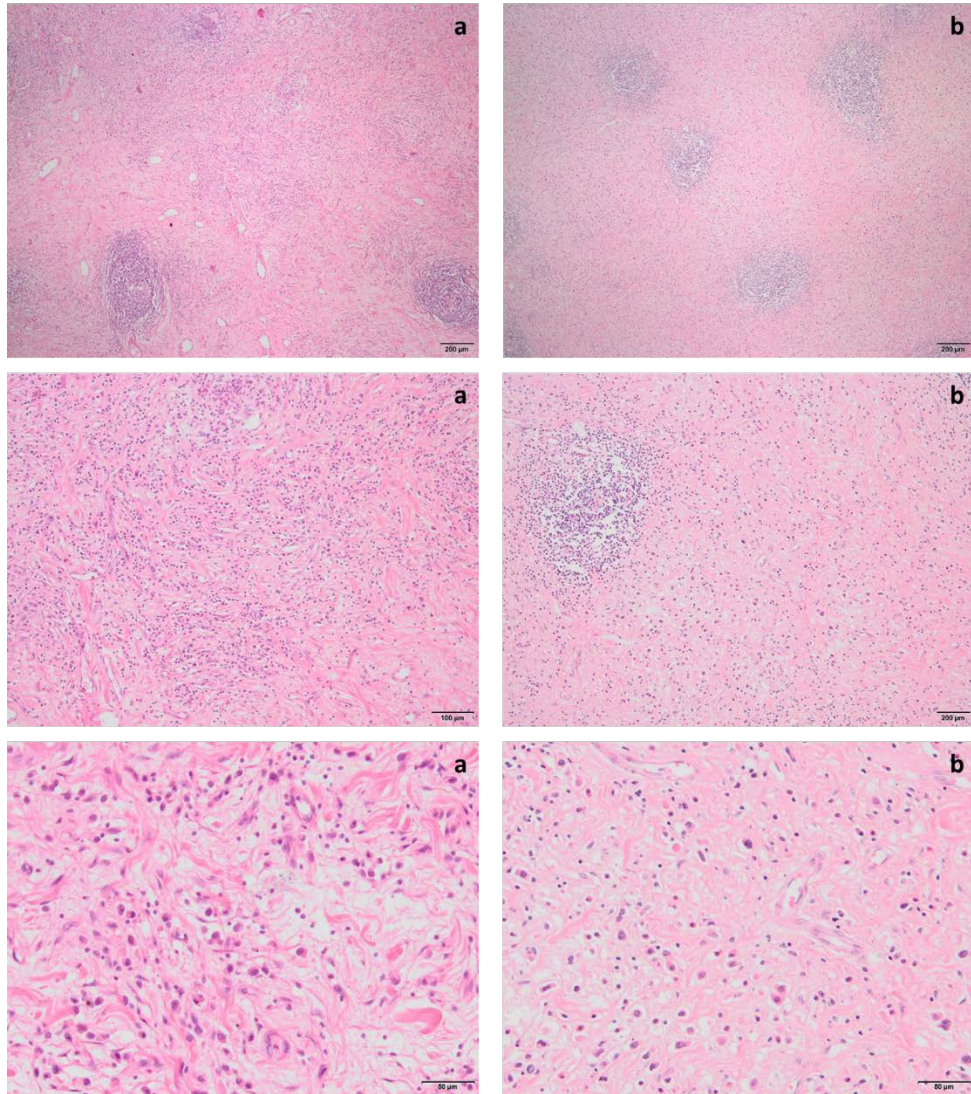
Ekzon	Forward Primer (5' – 3')	Reverse Primer (3' – 5')	°C
M13	TGTA AACGACGGCCAGT	CAGGAAACAGCTATGAC	
1	M13F GTGAACCCTCAGCCAATCAG	M13R TGACGACGGGAGAGGAAG	63
2	M13F TGTTGGTTTCGGTGAGCAG	M13R GGTGTGGGAGTGCAATTTCT	61
3	M13F CGCTCTTTGGAGAAGGAATG	M13R AACGGTACCAAGGCTGAGAA	58
4	M13F GCTGTCTGGCTAGGTTGGAC	M13R TTTTCCCTTTCTCTCCTTGG	58
5	M13F GAAAGGGAAAAGACCCAGTG	M13R GGATCCAGCATGGGTTGAC	58
6	M13F GCCCCTTCTCCCATGTTT	M13R CTTTGGGCTTGACAACACT	56
7	M13F GGCAGAATTGGATTAAGCA	M13R TGTCCACGGGATTGAGCTA	57
8	M13F GCCAAAGGTGGCTAGTGTTT	M13R CCCATGAGCAGTGGTGAC	57
9	M13F AATCCTTTAGCCCCCTGAGA	M13R AGGGGACAAGGGTATGAACA	61
10	M13F CAAAAGCAACAGTTAAGGA	M13R CAAATGACAAAATGCCATGA	56
11	M13F AGCGCTTAAGCCGTTTCA	M13R GAGGGGCAAGGAACTGAACT	60
12	M13F AAGGCAATGGGGATTCATTA	M13R ATTGAAAGGTGGGGATCTGG	59
13	M13F CAATTTTATTCTGGAATGAGCTTTT	M13R CAGGAAATAAACCTCCTCCATTT	55
14	M13F TGATAGCTGCTGCTTCTGGC	M13R CATTGCTTCTTCCGAATAAAGAG	55
15	M13F TGAACATAGCCCTGTGTGTATG	M13R TTTTGACACAACCTCCTCTG	58
16	M13F AGACTTCTGCCCCAGATGA	M13R AACCACCAGCAACGTGATTT	63
1*	M13F GTCCGCGCTGCTGATTGG	M13R AGGACCCGAACTTTCTTGGGA	63

Tablo 3: *CDHI* genini çoğaltmak için kullanılan “primer”ler. İki hastada ekzon 1’in çoğaltılamaması nedeniyle ikinci bir primer kullanılarak işlem tekrarlanmıştır. “1\*” ikinci işlemde kullanılan “primer”leri göstermektedir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Demografik Bilgiler ve Ameliyat Sonrası Takip Bulguları

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı veritabanı taranarak, belirlenen tarih aralığında mide adenokarsinomu nedeniyle ameliyat edilen 1058 hasta belirlendi. Bu hastaların patoloji raporları değerlendirilerek “diffüz mide kanseri” histolojisine sahip olan 108 hasta olduğu belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9: Diffüz mide kanseri morfolojisine sahip 2 hastanın (a ve b) mide spesimenlerinin farklı büyütmelelerdeki mikroskopik görüntüleri.

Bu hastalar 2.3.2’de belirtilen tanı kriterleri açısından değerlendirildi ve “Herediter Diffüz Gastrik Kanseri” sendromu kriterlerini taşıyan 60 hasta tespit edildi. Şekil 10, hasta seçim sürecini özetlemektedir.



Şekil 10: Hasta seçim süreci

Hastaların 29’u kadın, 31’i erkekti. Ortalama yaş  $45.3 \pm 12.8$  olarak hesaplandı. En genç hasta 21, en yaşlı hasta 78 yaşındaydı.

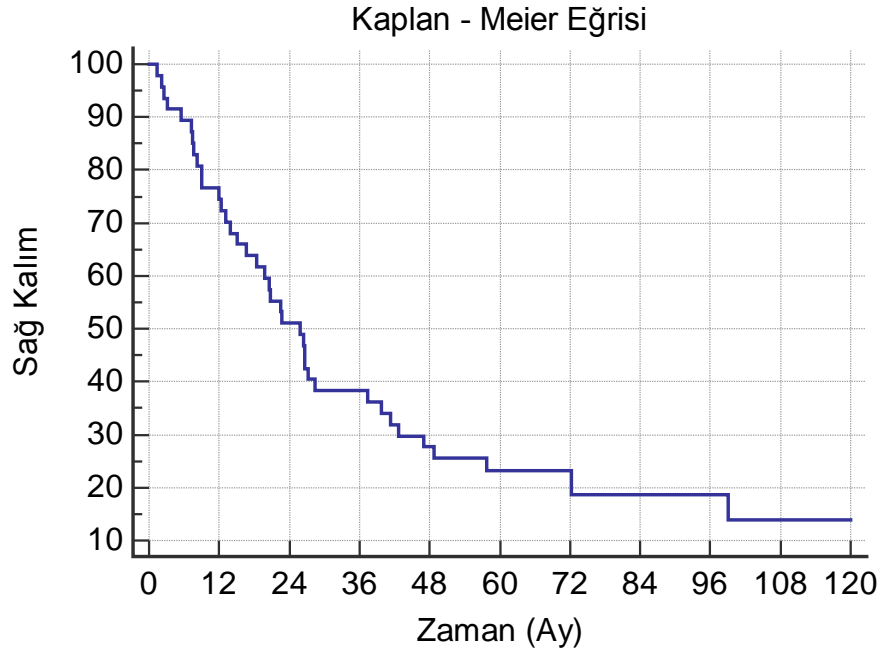
Çalışmaya dahil edilme kriterlerine göre (Bölüm 3.1) 30 hasta, kırk yaşın altında olmaları nedeniyle, kalan 30 hasta da soygeçmişleri nedeniyle seçildi. Yirmi dört hastanın ailesinde mide kansinomu, beş hastanın ailesinde lobüler meme kansinomu ve bir hastanın kendisinde lobüler meme kansinomu hikayesi vardı.

Yirmi üç hastaya distal subtotal gastrektomi, 29 hastaya total gastrektomi, 8 hastaya da total gastrektomi ile birlikte çoklu organ rezeksiyonu yapılmış olduğu tespit edildi.

Patoloji incelemelerine göre, 5 hastada kanser odakları mukoza ve submukozaya sınırlıydı ve erken evre mide kanseri olarak değerlendirildi. Diğer hastalarda mide duvarının daha derin tabakaları tutulmuştu. Dokuz hastada tümör bütün mideyi tutmuş, “linitis plastica” görünümü mevcuttu. Kalan 51 hastada ortalama

tümör boyutu 5.9 cm olarak hesaplandı. Spesimenlerde ortalama 25.5 lenf nodu diseke edildiği görüldü. Dört hastada lenf nodu metastazı izlenmezken, lenf nodu metastazı olan hastalarda ortalama 14.0 lenf nodu metastatik olarak değerlendirildi, 11 hastada diseke edilen bütün lenf nodları metastatikti.

Ortanca 22.8 aylık takip süresinde 38 hasta (%63) vefat etti. Hiçbir hastada operatif mortalite izlenmezken, ameliyat sonrası ortalama yaşam süresi 20.1 ay olarak hesaplandı. Altı hasta kontrol muayenesine gelmediği için takibi yapılamadı. Beş yıllık takibi tamamlanan 47 hastanın, beş yıllık sağ kalım oranı %23 olarak hesaplandı (Şekil 11).



Şekil 11: Herediter Diffüz Gastrik Kanser sendromunda 5 yıllık sağ kalım eğrisi

## 4.2 DNA İzolasyonu ve *CDH1* Dizi Analizi Sonuçları

### 4.2.1 DNA İzolasyonu Sonuçları

Tanı kriterlerine uyan 6 hastanın tümör ve normal dokularından Bölüm 3.2’de anlatıldığı şekilde DNA izolasyonu yapıldı. Tablo 4, DNA izolasyon sonuçlarını göstermektedir.

Hastalar	Doku Türü	Konsantrasyon (ng/μL)
1	Tümör Dokusu	392.2
	Normal Doku	386.5
2	Tümör Dokusu	496.5
	Normal Doku	247.1
3	Tümör Dokusu	496.5
	Normal Doku	231.6
4	Tümör Dokusu	514.8
	Normal Doku	424.8
5	Tümör Dokusu	242.8
	Normal Doku	385.4
6	Tümör Dokusu	554.1
	Normal Doku	409.2

Tablo 4: Altı hastanın tümör ve normal dokularından elde edilen DNA konsantrasyonları

### 4.2.2 PCR ve Sanger Sekanslama Sonuçları

*CDH1* RefSeq sekansı (NM\_004360) ile elde edilen sekans sonuçları karşılaştırıldı.

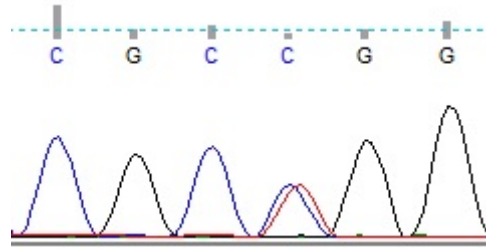
**1- B-1744-08: 78 yaşında erkek hasta; üç kardeşi ve annesinde mide kanseri öyküsü mevcut.**

On altı ekzondan da ürün elde edilerek M13F sekanslama primeri ile sekanslamalar yapıldı. Ekzon 13'te *CDH1* 2202 T>C değişimi (homozigot) izlendi. Bu değişim amino asitte değişikliğe neden olmuyor. (GCT) Ala = (GCC) Ala şeklinde

aynı kalıyor. Normal dokudan elde edilen örnekteki sekanslamada kötü sinyal alındığı için değerlendirilemedi.

**2- B-15420-08: 46 yaşında erkek hasta; babasında mide kanseri öyküsü mevcut.**

On altı ekzondan da ürün elde edilerek M13F sekanslama primeri ile sekanslamalar yapıldı. Ekzon 13'te *CDH1* 2202 T>C değişimi (heterozigot) izlendi (Şekil 12). Bu değişim amino asitte değişikliğe neden olmuyor. (GCT) Ala = (GCC) Ala şeklinde aynı kalıyor. Normal dokudan elde edilen örnekteki sekanslamada kötü sinyal alındığı için değerlendirilemedi.



Şekil 12: B-15420-08 kodlu spesimende tümör dokusunda *CDH1* genindeki 2202 T>C değişimi (heterozigot).

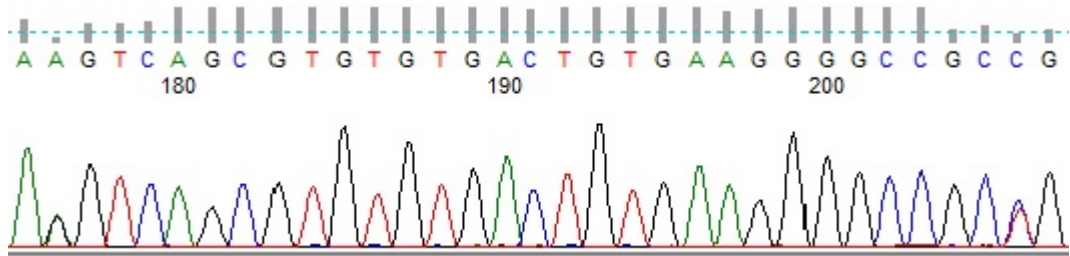
**3- B-10697-14: 55 yaşında kadın hasta; kardeşinde, amcasında ve dedesinde mide kanseri öyküsü mevcut.**

Ekzon 1 dışındaki 15 ekzondan da ürün elde edilerek M13F sekanslama primeri ile sekanslamalar yapıldı. Ekzon 2, 4, 11, 14 ve 15'in sekans sonuçları değerlendirilemedi. Sekanslaması yapılan ekzonlarda mutasyon saptanmadı. Ekzon 1 farklı primerler sipariş edilerek tekrar amplifiye edilmeye çalışıldı; ama amplifiye edilemedi.

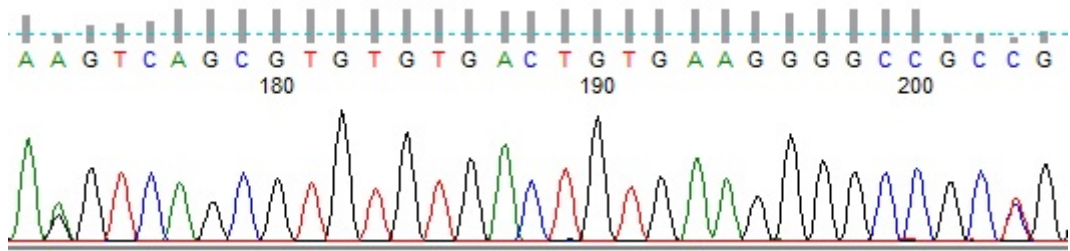
**4- B-5387-11: 55 yaşında kadın hasta, iki dayısında mide kanseri öyküsü mevcut.**

Ekzon 1 dışındaki 15 ekzondan da ürün elde edilerek M13F sekanslama primeri ile sekanslamalar yapıldı. Ekzon 2 ve 16'nın sekans sonuçları değerlendirilemedi.

Ekzon 1 farklı primerler sipariş edilerek tekrar amplifiye edilmeye çalışıldı; ama amplifiye edilemedi. Ekzon 13'te *CDHI* 2172 G>A değişimi (heterozigot) izlendi. Bu değişim amino asitte değişikliğe neden olmuyor. (GAG) Glu = (GAA) Glu şeklinde aynı kalıyor. Ekzon 13'te *CDHI* 2202 T>C değişimi (heterozigot) izlendi. Bu değişim amino asitte değişikliğe neden olmuyor. (GCT) Ala = (GCC) Ala şeklinde kalıyor (Şekil 13). Normal (tümörsüz) dokudan elde edilen DNA örnekleri kullanılarak ekzon 13 amplifiye edilip sekanslanınca aynı iki değişim açısından heterozigot olduğu görüldü (Şekil 14). Bu bulgu, bu değişikliklerin polimorfizm olduğunu düşündürdü.



Şekil 13: B-5387-11 kodlu spesimende tümör dokusunda *CDHI* genindeki 2172 G>A ve 2202 T>C değişimleri (heterozigot).



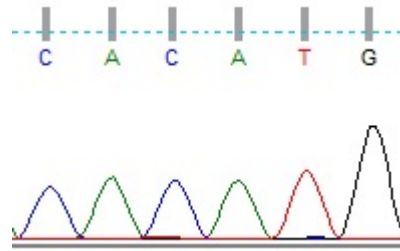
Şekil 14: B-5387-11 kodlu spesimende normal (tümörsüz) dokuda *CDHI* genindeki 2172 G>A ve 2202 T>C değişimleri (heterozigot).

#### **5- B-16370-11: 78 yaşında erkek hasta, annesinde ve üç kardeşinde mide kanseri öyküsü mevcut**

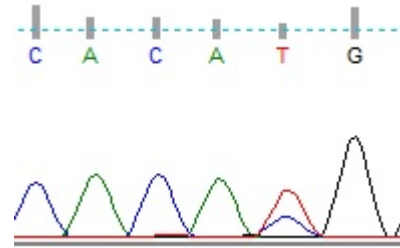
On altı ekzondan da ürün elde edilerek M13F sekanslama primeri ile sekanslamalar yapıldı. Ekzon 12'de *CDHI* 2022 C>T değişimi izlendi. Bu değişim



amino asitte değişikliğe neden olmuyor. (CAC) His = (CAT) His şeklinde aynı kalıyor. Bu değişim tümörsüz dokuda heterozigot, ancak tümörde homozigot olarak izlendi (Şekil 15 ve 16). Ekzon 13'te *CDH1* 2202 T>C değişimi izlendi. Bu değişim amino asitte değişikliğe neden olmuyor. (GCT) Ala = (GCC) Ala şeklinde aynı kalıyor. Bu değişim hem normal hem de tümörlü örnekte heterozigot olarak izlendi. Polimorfizm olarak yorumlandı.



Şekil 15: B-16370-11 kodlu spesimende tümör dokusunda *CDH1* genindeki 2022 C>T değişimi (homozigot).



Şekil 16: B-16370-11 kodlu spesimende normal (tümörsüz) dokuda *CDH1* genindeki 2022 C>T değişimi (heterozigot).

#### **6- B-3558-11: 47 yaşında erkek hasta, annesinde mide kanseri öyküsü mevcut**

Ekzon 10 ve 16 dışındaki 14 ekzondan da ürün elde edilerek M13F sekanslama primeri ile sekanslamalar yapıldı. Ekzon 6, 7, 13, 15 ve 16 ürünleri değerlendirmek için uygun değildi. Ekzon 5'te 680G>T değişimi izlendi. Bu değişiklik "non-sense" mutasyona neden oluyor. GAA (Glu) - TAA (STOP) değişimi mevcut. Normal dokudan elde edilen örnekte bu mutasyon izlenmedi. Normal dokuda bu değişim

heterozigot olmadığı için, tümör dokusundaki mutasyon somatik e-kaderin kaybına neden olan somatik mutasyon olarak değerlendirildi.

## 5. TARTIŞMA

Hereditör diffüz gastrik kanser sendromu, tüm mide kanserlerinin %1'ini oluşturur. "Uluslararası Mide Kanseri Bağlantı Konsorsiyumu" tarafından iyi tanımlanmış kriterler (Bkz. 2.3.2 Tanı Kriterleri) ile tanısı konulan bu sendromun genetik temelleri 1998 yılında Guilford ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. Buna göre, hereditör diffüz gastrik kanser sendromu, 16p22.1 lokusunda yer alan ve e-kaderin proteinini kodlayan *CDH1* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Mutasyon taşıyıcılarında hastalığın penetransı %80'dir.

Çalışmamızda hereditör diffüz gastrik kanser sendromu tanı kriterlerini karşılayan hastalar, belirlenen tarih aralığında ameliyat olan tüm mide kanserli hastaların %5.7'sini oluşturmaktadır. Bu oran literatüre göre daha yüksektir.

Sporadik mide kanseri, erkeklede daha sık görülürken (E/K = 2/1), çalışmamızda bu oran 1/1 olarak hesaplanmıştır (70). Hereditör diffüz gastrik kanserle ilgili yapılan çalışmalarda bu konuda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmamızdakine benzer olarak her iki cinsiyetin de eşit etkilendiğini bildiren yayınlar olduğu gibi, kadınlarda daha sık görüldüğünü bildiren yayınlar da mevcuttur (71).

Sporadik mide kanserine göre daha genç yaşta ortaya çıkan bu sendromda ortalama tanı yaşı 38'dir (72). Çalışmamızdaki hastaların ortalama tanı yaşı ise 45 olarak hesaplanmıştır. Bu değer literatür bilgisi ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Herhangi bir tarama yapılmaksızın tanı konulan hereditör diffüz gastrik kanser olgularının neredeyse tamamı ileri evrede yakalanmaktadır. Sporadik mide kanseri ile karşılaştırıldığında, aynı evredeki olgularda her iki durumda (sporadik ve hereditör) sağ kalım birbirine benzerdir (73). Çalışmamızdaki beş yıllık sağ kalım oranı (%23) literatür ile uyumludur. Buna rağmen hastalık penetransının yüksek olması sendromik ailelerde çeşitli girişimler yapmayı gerektirmektedir.

Toplam mide kanserleri içinde büyük bir orana sahip olmasa dahi, hastalık penetransının yüksek olması nedeniyle, hereditör diffüz gastrik kanser sendromu, önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Bu sendromdan etkilenen bireylerin etkin

bir sağlık hizmetine ulaşabilmelerinin ön koşulu, hangi bireylerin etkilendiğinin tespit edilmesidir. Ancak bundan sonra endoskopik takip ya da proflaktik gastrektomi seçenekleri değerlendirilebilir. Bu noktada kimlere tarama yapılması gerektiği sorusu gündeme gelmektedir.

Öncelikle herediter diffüz gastrik kanser sendromu tanı kriterlerini karşılayan aile bireyleri taranmalıdır. “Uluslararası Mide Kanseri Bağlantı Konsorsiyumu” 2015 yılındaki güncellemesinde, tanı kriterlerini karşılamasa dahi tarama yapılması önerilen iki grup daha belirlemiştir (23):

- Bilateral lobüler meme kanseri veya 50 yaşından önce aynı ailede iki ya da daha fazla meme kanseri,
- Diffüz mide kanseri olan bir hastanın kendisinde ya da ailesinde yarık damak/dudak öyküsü.
- İn-situ taşlı yüzük hücreleri ve/veya taşlı yüzük hücrelerinin Pagetoid yayılımı

Belirtilen koşulları sağlayan ailelerde tarama yapılması konusunda literatürde fikir birliği vardır. Taramaya başlama yaşı konusunda ise kesinleşmiş bir değer bulunmamakla beraber, bireyin aydınlatılmış onam verme yetkinliğine ulaşmış olması genel bir yol gösterici olarak kullanılabilir (74).

*CDHI* mutasyonunun ilk tanımlanmasından bu yana, farklı popülasyonlarda 120'nin üzerinde mutasyon tanımlanmıştır. *CDHI* mutasyonu, tüm herediter diffüz gastrik kanser sendromlarının yaklaşık %30 – 50'sinde saptanmaktadır (75). Bu oran popülasyonlara göre de farklılık göstermektedir. Örneğin, mide kanseri insidansının yüksek olduğu Kore, Japonya, in gibi uzak doğu toplumlarında mutasyon sıklığı daha düşükken, mide kanseri insidansının görel olarak daha düşük olduğu Avrupa toplumlarında *CDHI* mutasyon sıklığı daha yüksektir (1, 60). Polonya'dan yayınlanan bir çalışmada ise, 86 hastada yapılan taramada *CDHI* mutasyonuna rastlanmamıştır (76). Mutasyon bulunan ve bulunamayan hastaların cerrahi spesimenleri, benzer morfolojik özellikler ve e-kaderin paterni sergilemektedir (77). Bu durum, mutasyon

saptanamayan hastalarda da bir takım genetik ve epigenetik değişikliklerin olabileceğini akla getirir.

Kabul edilen teoriye göre, herediter diffüz gastrik kanser sendromunda, genomda bulunan iki *CDHI* allelinden birinde “germline” mutasyon bulunmaktadır. Yani etkilenen bireylerde yalnızca bir tane işlevsel allel bulunmaktadır. Bireyin yaşamı boyunca herhangi bir dönemde “ikinci hasar (second hit)” ile işlevsel olan allelde de somatik mutasyon oluşursa, etkilenen hücrelerde e-kaderin üretimi tamamen duracağından epitel hücrelerinde polarite kaybı ve bez yapısında bozulmalar meydana gelir. Bunlar da diffüz mide kanserinin tipik histolojik bulgularıdır. En yaygın “ikinci hasar”, sağlam *CDHI* genindeki promotor bölgenin hipermetilasyonudur (%32), bunu heterozigosite kaybı takip etmektedir (%25) (78).

Mutasyonların gen üzerinde yoğunlaştığı belirli bir bölge bulunmamaktadır. Ancak, protein bölgeleri göz önüne alındığında tüm mutasyonların %59’u hücre dışı bölümü, %16’sı hücre içi bölümü, %13’ü sinyal bölümünü etkilemektedir. Bu dağılım, protein bölümlerinin gendeki büyüklüğüyle doğru orantılıdır (79).

Mutasyonların çoğu “çerçeve kayması” türündedir. Bunu “non-sense”, “mis-sense” ve “splice-site” mutasyonlar takip etmektedir. Mutasyonların sonucuna bakıldığında ise, tanımlanan mutasyonların %77’si “truncating” mutasyonlardır (79). “Truncating” mutasyonlar, yani protein sentezi henüz tamamlanmadan durma kodununun oluşmasına neden olup eksik/immatür protein sentezine neden olan mutasyonların klinik önemi konusunda şüphe yoktur. E-kaderin proteininin yapısının tamamlanmaması nedeniyle işlevsel eksiklikler ortaya çıkar ve bu da diffüz mide kanserinin gelişmesiyle sonuçlanır. Örneğin 6 numaralı hastada izlenen 680 G>T mutasyonu, ekzon 5’te 226. amino asitte durma kodonu oluşmasına neden olmuştur. Bu mutasyon proteinin hücre dışı bölümü sentezlenirken ani kesintiye neden olur; hücre dışı bölüm tamamlanamaz, hücre zarı içindeki ve hücre içi bölüm ise sentezlenemez. Bu da protein işlevinde aksamaya yol açar. Çerçeve kayması ya da “non-sense” mutasyonlar bu mekanizma ile etki gösterebilir.

“Mis-sense” mutasyonlar, tanımlanan mutasyonların %18’ini oluşturur (34). “Mis-sense” mutasyonların klinik önemi ise tartışmalı bir konudur. Amino asit

değişimine neden olan “mis-sense” mutasyonlar, protein uzunluğunda değişime neden olmazlar; ancak proteindeki yerleşim bölgesine ve ortaya çıkan yeni amino aside göre patofizyolojiye katkıda bulunabilir. “Mis-sense” mutasyonların klinik önemini belirlebilmesi için in vitro çalışmalar ile hücre – hücre adezyonunda bozulmaya neden olduklarının gösterilmeleri gerekir (80, 81).

Sessiz mutasyonlar, amino asit diziliminde farklılık oluşturmayan mutasyonlardır. Örneğin çalışmamızdaki 1, 2, 4 ve 5 numaralı hastalarda saptanan mutasyonlarda proteindeki amino asit dizilimi etkilenmemiştir. Her ne kadar protein yapısında değişiklik oluşturmasa da sessiz mutasyonlar gen ifadesini etkileyebilmektedir. Örneğin *CDHI* geninde tanımlanmış olan -160C>A ve -347G>A mutasyonları sessiz mutasyonlardır; ancak transkripsiyon etkinliğini mutasyonsuz allele kıyasla sırası ile %68 ve %10’a düşürmektedir (82, 83).

İtalya’da yayınlanan bir çalışmada intron 2’deki bir polimorfizm de herediter diffüz gastrik kanser ile ilişkilendirilmiştir (84). Çalışmamızda yalnızca ekzonlar incelenmiştir. Sonraki çalışmalarda intronların da incelenmesi, duyarlılığı artıracaktır.

*CDHI* geninde yalnızca nokta mutasyon ya da küçük çerçeve kayması mutasyonlar izlenmemektedir (56). Yakın zamanda bildirilen verilere göre tüm mutasyonların %4’ünü geniş silinmeler ve yeniden düzenlenmeler oluşturmaktadır (34). Bu geniş silinmeler özellikle mide kanseri insidansının düşük olduğu ülkelerde yoğunlaşmaktadır (60).

Multiplikasyon esaslı prob amplifikasyonu (MLPA), genomdaki geniş yeniden düzenlenmeler ve silinmeleri saptayabilen bir yöntemdir (22). Oliveira ve arkadaşlarının 2009’da yayınladıkları çalışmalarında, DNA sekans analizi ile mutasyon saptanmayan 93 ailenin %6.5’inde geniş genomik *CDHI* silinmeleri saptanmıştır (60). Bu silinmeler *CDHI* geninin en az bir ekzonunda ortalama %70 sinyal azalmasına neden olmuştur. Üç ailede ekzon 1 ve 2, bir ailede ekzon 1, bir ailede ekzon 14 ve 16, bir ailede ekzon 16 kaybı izlenmiştir. Bu bulgular, *CDHI* gen bölgesinin, daha önce *hMLH1*, *hMSH2*, *APC* ve *BRCA1* genleri gibi, silinmelere açık bir bölge olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızdaki 3, 4 ve 6 numaralı hastalarda da benzer durum söz konusudur. Üç ve dört numaralı hastada ekzon 1, 6 numaralı hastada ekzon 10 ve 16 çoğaltılamamıştır. Üç ve dört numaralı hastalarda, literatürde tanımlanmış farklı primerler denenmesine rağmen de ekzon 1'in PCR ürünü elde edilememiştir. Bu durum genomda bu bölgeleri içine alan bir silinme olasılığını akla getirmektedir. Protein yapısı göz önüne alındığında ekzon 1'deki olası silinmeden etkilenen bölge sinyal peptididir. Sinyal peptidi, proteinin son yapısında bulunmayan; ama sentezi sırasında proteinin hücredeki yerleşimini belirleyen bölgedir. Protein hücredeki hedefine ulaştıktan sonra, sinyal peptidi uzaklaştırılır. Teorik olarak normal e-kaderin proteini üretilmiş olsa bile, sinyal peptidindeki silinme nedeniyle hücre zarına taşınamayacağı için işlevsel bozukluğa neden olacağı düşünülebilir. Ekzon 16'daki silinme ise hücre içi bölümü ilgilendirmektedir. E-kaderin proteini üretilip hücre zarına taşınsa bile hücre içi aktin iskeleti ile bağlanamayacağı için bu genetik değişikliğin de işlevsel bozukluğa neden olacağı düşünülebilir.

Allelik dengesizlik, ileri çalışmalarda dikkate alınabilecek bir diğer konudur. *CDHI* gen mutasyonu olsun ya da olmasın, herediter diffüz gastrik kanserli bireylerde e-kaderin proteini üretimi yoktur ya da normal değildir. Bu durum, *CDHI* mutasyonu olmasa bile bir takım epigenetik değişikliklerin varlığını akla getirmektedir. Periferik kan lenfositlerinden RNA eldesi ile yapılan çalışmalarda mutasyonlu hastalarda %80, mutasyon gösterilemeyen hastalarda %70 oranında tek allelin ifade edildiği ya da alleller arasında dengesizliğin olduğu tespit edilmiştir. Allelik dengesizlik de, *CDHI* genini etkileyen değişiklikler yelpazesi içinde değerlendirilirse, herediter diffüz gastrik kanser sendromlu ailelerdeki mutasyon oranı %40'tan %80'e yükselmiş olur (77). İleride yapılacak çalışmalarda allelik dengesizliğin de incelenmesi bu konudaki bilgi birikimini artıracaktır.

Günümüzde herediter diffüz gastrik kanser sendromu giderek daha çok dikkat çekmektedir. *CDHI* mutasyonu ile ilişkisi sağlam kanıtlarla ortaya konmuştur. Yakın zaman kadar DNA dizi analizi ile sınırlı olan mutasyon taramaları ile bu sendromlu ailelerin ortalama %40'ında mutasyon gösterilebilmiştir. MLPA ve allelik dengesizlik çalışmaları ise DNA dizisinde mutasyon saptanamayan hastalarda da epigenetik

değişiklikler sonucu gen ifadesinin değiştiğini ve nihai olarak protein üretiminin etkilendiğini ortaya koymuştur.

Yeni yöntemlerin kullanılması, saptanabilen genetik değişiklin oranını neredeyse iki katına çıkarmaktadır. Bu artış, etkilenen bireylerin daha etkin bir şekilde belirlenebilmesi için son derece önemlidir. Herediter diffüz gastrik kanser sendromlu bir ailenin üyesi olup genetik değişiklik saptanan bireylerde proflaktik gastrektomi gibi radikal ancak başarı oranı yüksek önleyici girişimler gündeme gelir. Genetik değişiklik saptanmayan bireylerde ise tek seçenek aralıklı endoskopik takiptir; ancak bu sendromda tipik olarak izlenen mikroskopik odakların sağlam mukoza altında olması nedeniyle endoskopik takibin başarısı sınırlıdır. Eğer DNA dizi analizi sonucunda mutasyon saptanmayan bireylerde, MLPA ve allelik dengesizlik çalışmaları gibi daha ileri yöntemlerle genetik değişiklikler saptanabilirse, bu bireyler de başarısı daha yüksek olan proflaktik gastrektomi için birer aday olabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Türk toplumunda herediter diffüz gastrik kanser sendromunun tüm mide kanserleri içindeki oranı, dünya literatüründen daha yüksektir.
2. Herediter diffüz gastrik kanser sendromu olan hastaların yalnızca %8'i erken evrede tanı alıp ameliyat olmuştur. Hastaların %93'ünde lenf nodu metastazı mevcuttur.
3. Ortanca sağ kalım süresi 20.1 ay, 5 yıllık sağ kalım %23 olarak hesaplandı.
4. Genetik analiz sonucunda 5 hastada mutasyon saptandı. Mutasyonların dördü sessiz mutasyondur, bir hastada non-sense mutasyon izlendi.
5. İki hastanın genetik analizinde ekzon 1 çoğaltılamadı. Bu sonuç, ilgili bölgeyi içine alan olası bir silinme olarak değerlendirildi.
6. Gelecek dönemde, MLPA ve allelik dengesizlik çalışmaları ile genetik değişiklikler daha etkin olarak saptanabilir. Ekzonlara ek olarak intronlara da dizi analizi yapılması çalışmaların duyarlılığını artıracaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Pinheiro H, Oliveira C, Seruca R, Carneiro F. Hereditary diffuse gastric cancer - pathophysiology and clinical management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28:1055-1068.
2. Sokoloff B. Predisposition to cancer in the Bonaparte family. *Am J Surg* 1938;40:673- 678.
3. Güner G, Akyol A. Herediter mide kanserleri. *Güncel Gastroenteroloji* 2017;21:38-44.
4. Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, Senz J, De Luca A, Chun N, Suriano G, et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* 2007;297:2360-2372.
5. Jones EG. Familial Gastric Cancer. *N Z Med J* 1964;63:287-296.
6. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998;392:402-405.
7. Carneiro P, Fernandes MS, Figueiredo J, Caldeira J, Carvalho J, Pinheiro H, Leite M, et al. E-cadherin dysfunction in gastric cancer--cellular consequences, clinical applications and open questions. *FEBS Lett* 2012;586:2981-2989.
8. Tan RY, Ngeow J. Hereditary diffuse gastric cancer: What the clinician should know. *World J Gastrointest Oncol* 2015;7:153-160.
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-386.

10. Price TJ, Shapiro JD, Segelov E, Karapetis CS, Pavlakis N, Van Cutsem E, Shah MA, et al. Management of advanced gastric cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;6:199-208; quiz 209.
11. Mastoraki A, Danias N, Arkadopoulos N, Sakorafas G, Vasiliou P, Smyrniotis V. Prophylactic total gastrectomy for hereditary diffuse gastric cancer. Review of the literature. *Surg Oncol* 2011;20:e223-226.
12. Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF, Ringold J, Larsen-Haidle J, Merg A, Mitros FA, et al. The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *J Med Genet* 2004;41:484-491.
13. van Lier MG, Wagner A, Mathus-Vliegen EM, Kuipers EJ, Steyerberg EW, van Leerdam ME. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1258-1264; author reply 1265.
14. Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
15. van der Post RS, Gullo I, Oliveira C, Tang LH, Grabsch HI, O'Donovan M, Fitzgerald RC, et al. Histopathological, Molecular, and Genetic Profile of Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Current Knowledge and Challenges for the Future. *Adv Exp Med Biol* 2016;908:371-391.
16. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:765-770.
17. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, Lewis FR, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999;36:873-880.

18. Worthley DL, Phillips KD, Wayte N, Schrader KA, Healey S, Kaurah P, Shulkes A, et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut* 2012;61:774-779.
19. Shinmura K, Kohno T, Takahashi M, Sasaki A, Ochiai A, Guilford P, Hunter A, et al. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype and germline p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis* 1999;20:1127-1131.
20. Guilford P, Blair V, More H, Humar B. A short guide to hereditary diffuse gastric cancer. *Hered Cancer Clin Pract* 2007;5:183-194.
21. Wickremeratne T, Lee CH, Kirk J, Charlton A, Thomas G, Gaskin KJ. Prophylactic gastrectomy in a 16-year-old. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014;26:353-356.
22. Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, Carneiro F, Guilford P, Blair V, Chung DC, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet* 2010;47:436-444.
23. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, Guilford P, Huntsman D, Hoogerbrugge N, Caldas C, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet* 2015;52:361-374.
24. Pedrazzani C, Corso G, Marrelli D, Roviello F. E-cadherin and hereditary diffuse gastric cancer. *Surgery* 2007;142:645-657.
25. Takeichi M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 1977;75:464-474.
26. Gumbiner BM, McCrea PD. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci Suppl* 1993;17:155-158.
27. Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, Oliveira P, Carvalho J, Ribeiro AS, Caldeira J, et al. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826:297-311.

28. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:619-627.
29. Moran CJ, Joyce M, McAnena OJ. CDH1 associated gastric cancer: a report of a family and review of the literature. *Eur J Surg Oncol* 2005;31:259-264.
30. Benusiglio PR, Caron O, Consolino E, Duvillard P, Coulet F, Blayau M, Malka D. Cleft lip, cleft palate, hereditary diffuse gastric cancer and germline mutations in CDH1. *Int J Cancer* 2013;132:2470.
31. Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, Karam R, Manouvrier S, Graziadio C, Vekemans M, et al. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet* 2006;43:138-142.
32. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, Schrader KA, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol* 2015;1:23-32.
33. Molinaro V, Pensotti V, Marabelli M, Feroce I, Barile M, Pozzi S, Laghi L, et al. Complementary molecular approaches reveal heterogeneous CDH1 germline defects in Italian patients with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53:432-445.
34. Oliveira C, Senz J, Kaurah P, Pinheiro H, Sanges R, Haegert A, Corso G, et al. Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mol Genet* 2009;18:1545-1555.
35. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 2001;20:1525-1528.
36. Donner I, Kiviluoto T, Ristimaki A, Aaltonen LA, Vahteristo P. Exome sequencing reveals three novel candidate predisposition genes for diffuse gastric cancer. *Fam Cancer* 2015;14:241-246.

37. Gaston D, Hansford S, Oliveira C, Nightingale M, Pinheiro H, Macgillivray C, Kaurah P, et al. Germline mutations in MAP3K6 are associated with familial gastric cancer. *PLoS Genet* 2014;10:e1004669.
38. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YS, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet* 2004;41:508-517.
39. Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Jr., Winchester D, Osteen R. Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 1993;218:583-592.
40. Charlton A, Blair V, Shaw D, Parry S, Guilford P, Martin IG. Hereditary diffuse gastric cancer: predominance of multiple foci of signet ring cell carcinoma in distal stomach and transitional zone. *Gut* 2004;53:814-820.
41. Rogers WM, Dobo E, Norton JA, Van Dam J, Jeffrey RB, Huntsman DG, Kingham K, et al. Risk-reducing total gastrectomy for germline mutations in E-cadherin (CDH1): pathologic findings with clinical implications. *Am J Surg Pathol* 2008;32:799-809.
42. Carneiro F, Huntsman DG, Smyrk TC, Owen DA, Seruca R, Pharoah P, Caldas C, et al. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *J Pathol* 2004;203:681-687.
43. Chun YS, Lindor NM, Smyrk TC, Petersen BT, Burgart LJ, Guilford PJ, Donohue JH. Germline E-cadherin gene mutations: is prophylactic total gastrectomy indicated? *Cancer* 2001;92:181-187.
44. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, Maung R, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med* 2001;344:1904-1909.

45. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001;121:1348-1353.
46. Humar B, Guilford P. Hereditary diffuse gastric cancer: a manifestation of lost cell polarity. *Cancer Sci* 2009;100:1151-1157.
47. Blair V, Martin I, Shaw D, Winship I, Kerr D, Arnold J, Harawira P, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:262-275.
48. Black MD, Kaneshiro R, Lai JI, Shimizu DM. Hereditary diffuse gastric cancer associated with E-cadherin germline mutation: a case report. *Hawaii J Med Public Health* 2014;73:204-207.
49. Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 1996;13:1919-1925.
50. Chan JK, Wong CS. Loss of E-cadherin is the fundamental defect in diffuse-type gastric carcinoma and infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Adv Anat Pathol* 2001;8:165-172.
51. Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, Huntsman D, Suriano G, Machado JC, Kiviluoto T, et al. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat* 2002;19:510-517.
52. Oliveira C, Seruca R, Caldas C. Genetic screening for hereditary diffuse gastric cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:201-215.
53. Shaw D, Blair V, Framp A, Harawira P, McLeod M, Guilford P, Parry S, et al. Chromoendoscopic surveillance in hereditary diffuse gastric cancer: an alternative to prophylactic gastrectomy? *Gut* 2005;54:461-468.

54. Humar B, Fukuzawa R, Blair V, Dunbier A, More H, Charlton A, Yang HK, et al. Destabilized adhesion in the gastric proliferative zone and c-Src kinase activation mark the development of early diffuse gastric cancer. *Cancer Res* 2007;67:2480-2489.
55. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153-156.
56. Sugimoto S, Komatsu H, Morohoshi Y, Kanai T. Recognition of and recent issues in hereditary diffuse gastric cancer. *J Gastroenterol* 2015;50:831-843.
57. Adachi Y, Kitano S, Sugimachi K. Surgery for gastric cancer: 10-year experience worldwide. *Gastric Cancer* 2001;4:166-174.
58. Akoh JA, Sedgwick DM, Macintyre IM. Improving results in the treatment of gastric cancer: an 11-year audit. *Br J Surg* 1991;78:349-351.
59. Barber ME, Save V, Carneiro F, Dwerryhouse S, Lao-Sirieix P, Hardwick RH, Caldas C, et al. Histopathological and molecular analysis of gastrectomy specimens from hereditary diffuse gastric cancer patients has implications for endoscopic surveillance of individuals at risk. *J Pathol* 2008;216:286-294.
60. Yamada M, Fukagawa T, Nakajima T, Asada K, Sekine S, Yamashita S, Okochi-Takada E, et al. Hereditary diffuse gastric cancer in a Japanese family with a large deletion involving CDH1. *Gastric Cancer* 2014;17:750-756.
61. Fujita H, Lennerz JK, Chung DC, Patel D, Deshpande V, Yoon SS, Lauwers GY. Endoscopic surveillance of patients with hereditary diffuse gastric cancer: biopsy recommendations after topographic distribution of cancer foci in a series of 10 CDH1-mutated gastrectomies. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1709-1717.
62. Gurzu S, Jung I, Orłowska J, Sugimura H, Kadar Z, Turdean S, Bara T, Jr. Hereditary diffuse gastric cancer--An overview. *Pathol Res Pract* 2015;211:629-632.
63. Lim YC, di Pietro M, O'Donovan M, Richardson S, Debiram I, Dwerryhouse S, Hardwick RH, et al. Prospective cohort study assessing outcomes of patients from



families fulfilling criteria for hereditary diffuse gastric cancer undergoing endoscopic surveillance. *Gastrointest Endosc* 2014;80:78-87.

64. Terdiman JP. Hereditary diffuse gastric cancer: surveillance endoscopy is not enough to save lives. *Gastroenterology* 2007;133:1730-1732; discussion 1732-1733.
65. Guilford P, Humar B, Blair V. Hereditary diffuse gastric cancer: translation of CDH1 germline mutations into clinical practice. *Gastric Cancer* 2010;13:1-10.
66. Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, et al. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 1998;58:4086-4089.
67. Shafiuddin M, Caminker M, Batra S. Hereditary linitis plastica of the stomach. *Am J Gastroenterol* 1995;90:2062-2063.
68. Bridoux V, Kianifard B, Schwarz L, Michot F, Tuech JJ. Hereditary diffuse gastric cancer: the always-forgotten Meckel's diverticulum. *Surgery* 2012;151:342.
69. Le Gal M, Ollivier L, Asselain B, Meunier M, Laurent M, Vielh P, Neuenschwander S. Mammographic features of 455 invasive lobular carcinomas. *Radiology* 1992;185:705-708.
70. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108.
71. Yu J, Li Z. The sex ratio and age of onset features of gastric cancer patients in hereditary diffuse gastric cancer families. *Fam Cancer* 2011;10:573-579.
72. Fitzgerald RC, Caldas C. Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. *Gut* 2004;53:775-778.
73. Kim JP, Kim SC, Yang HK. Prognostic significance of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Surg Oncol* 1994;3:221-227.

74. Vogelaar IP, van der Post RS, Bisseling TM, van Krieken JH, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N. Familial gastric cancer: detection of a hereditary cause helps to understand its etiology. *Hered Cancer Clin Pract* 2012;10:18.
75. Cisco RM, Ford JM, Norton JA. Hereditary diffuse gastric cancer: implications of genetic testing for screening and prophylactic surgery. *Cancer* 2008;113:1850-1856.
76. Jakubowska A, Lawniczak M, Wojnarska B, Cybulski C, Huzarski T, Byrski T, Toloczko-Grabarek A, et al. CDH1 gene mutations do not contribute in hereditary diffuse gastric cancer in Poland. *Fam Cancer* 2010;9:605-608.
77. Pinheiro H, Bordeira-Carrico R, Seixas S, Carvalho J, Senz J, Oliveira P, Inacio P, et al. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer. *Hum Mol Genet* 2010;19:943-952.
78. Oliveira C, Sousa S, Pinheiro H, Karam R, Bordeira-Carrico R, Senz J, Kaurah P, et al. Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterology* 2009;136:2137-2148.
79. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. E-cadherin alterations in hereditary disorders with emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;116:337-359.
80. Simoes-Correia J, Figueiredo J, Lopes R, Stricher F, Oliveira C, Serrano L, Seruca R. E-cadherin destabilization accounts for the pathogenicity of missense mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *PLoS One* 2012;7:e33783.
81. Suriano G, Seixas S, Rocha J, Seruca R. A model to infer the pathogenic significance of CDH1 germline missense variants. *J Mol Med (Berl)* 2006;84:1023-1031.
82. Li LC, Chui RM, Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Au HC, Nojima D, et al. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res* 2000;60:873-876.

83. Shin Y, Kim IJ, Kang HC, Park JH, Park HR, Park HW, Park MA, et al. The E-cadherin -347G->GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation. *Carcinogenesis* 2004;25:895-899.
84. Nasri S, More H, Graziano F, Ruzzo A, Wilson E, Dunbier A, McKinney C, et al. A novel diffuse gastric cancer susceptibility variant in E-cadherin (CDH1) intron 2: a case control study in an Italian population. *BMC Cancer* 2008;8:138.