Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Monika Zazula

ANALIZA MUTACJI I POLIMORFIZMÓW W GENIE *E-KADHERYNY* W SPORADYCZNYCH RAKACH ŻOŁĄDKA

praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. med. Jerzy Stachura
Pracę wykonano w Katedrze Patomorfologii CMUJ
Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jerzy Stachura

Kraków, 2005

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania:

- *Prof. dr hab. Jerzemu Stachurze, za współtworzenie niniejszej pracy. Za pasję i wizję, dzięki którym powstało nasze laboratorium oraz za znakomite zdolności menadżerskie, bez których nasze deficytowe badania nie miałyby racji bytu.*

- *Dr n. med. Zbyszkowi Rudzkiemu oraz Dr n. med. Krzysiowi Okoniowi za znakomitą współpracę, świetne pomysły i mądrą krytykę.*

- *Dr n. med. Jackowi Czopkowi za odwieczną błyskawiczną pomoc merytoryczną i komputerową, za błyskotliwość i poczucie humoru, które podtrzymuje nas na duchu w kolejnych etapach zmagań z rakiem żołądka.*

- *Dr n. med. Magdzie Białas za pełne entuzjazmu i cierpliwości wprowadzanie mnie w tajniki klasyfikacji raków żołądka.*

- *Mojemu znakomitemu zespołowi z Laboratorium Patologii Molekularnej: mgr Anastazji Stój, mgr Ani Sińczak-Kucie, mgr Agnieszce Klimkowskiej, mgr Agnieszce Małeckiej, mgr Piotrowi Wójcikowi* oraz *lek. med. Rasie Ugenskiene: za pomoc, nieustanny doping oraz za tworzenie fantastycznej atmosfery w naszym laboratorium.*

Spis treści:

1. SPIS SKRÓTÓW 4

2. WSTĘP: 8

2.1. PRZYCZYNY POWSTAWANIA RAKA ŻOŁĄDKA 9
2.1.1. Przyczyny środowiskowe 9
2.1.2. Zaburzenia genomowe w powstawaniu raka żołądka 13
2.2. CZĄSTECZKI ADHEZYJNE 20
2.2.1. α-katenina 20
2.2.2. β-katenina 21
2.2.3. P-kadheryna 24
2.2.4. E-kadheryna 25

3. CEL PRACY 49

4. MATERIAŁ I METODY 50

4.1. MATERIAŁ 50
4.2. METODY 50

5. WYNIKI 75

5.1. KLASYFIKACJA RAKÓW ŻOŁĄDKA 75
5.2. ANALIZA POLIMORFIZMÓW *CDH1* W ZBIORZE SPORADYCZNYCH RAKÓW ŻOŁĄDKA 77
5.3. ANALIZA MUTACJI W GENIE *CDH1* W ZBIORZE SPORADYCZNYCH RAKÓW ŻOŁĄDKA 80
5.4. ANALIZA METYLACJI PROMOTORA *CDH1* 94
5.5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW 107

6. DYSKUSJA 109

7. WNIOSKI 125

8. STRESZCZENIE 126

9. SUMMARY 130

10. BIBLIOGRAFIA 133

1. Spis skrótów:

A - adenina

aa – aminokwasy (ang. amino acids)

AJCC - American Joint Committee on Cancer

Ala (A) - alanina

APC – gen/białko a*denomatous polyposis coli*

APS – nadsiarczan amonu (ang. ammonium persulfate)

Arg (R) – arginina

Asn (N) – asparagina

Asp (D) – kwas asparaginowy

b – zasada purynowa lub pirymidynowa (ang. base)

bp - para zasad (ang. base pair)

C – cytozyna

CpG (wyspy) – regiony o zwiększonej gęstości sekwencji dinukleotydowej cytozyna - reszta fosforanowa - guanina

°C – stopień Celsjusza

Cys (C) - cysteina

Da – Dalton

DGC – rozlany rak żołądka (ang. Diffuse Gastric Cancer)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

CDH1 - symbol genu kodującego białko E-kadherynę

EBV – wirus Epstein-Barr

EBVaGC – raki żołądka związane z zakażeniem wirusem EBV (ang. EBV associated gastric carcinoma)

ECCU – kompleks E-kadheryna/kateniny (ang. E-cadherin Catenin Unit)

EGF – epitelialny czynnik wzrostu (ang. Epithelial Growth Factor)

EGFR – receptor epitelialnego czynnika wzrostu (ang. Epithelial Growth Factor Receptor)

EP - elektroforeza

EX – ekson (ang. exon)

FDGC - rodzinny rozlany rak żołądka, nie spełniający kryteriów IGCLC (ang. Familial Diffuse Gastric Cancer)

FGC - rodzinny rak żołądka (ang. Familial Gastric Cancer)

FGF - czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Fibroblast Growth Factor)

G – guanina

GISTs – guzy stromalne przewodu pokarmowego (ang. gastrointestinal tumors)

Gln (Q) – glutamina

Glu (E) – Kwas glutaminowy

Gly (G) - glicyna

h – godzina

HDGC – rodzinny rozlany rak żołądka, spełniający kryteria IGCLC (ang. Hereditary Diffuse Gastric Cancer)

His (H) – histydyna

HGC – rodzinny rozlany rak żołądka (ang. Hereditary Gastric Cancer)

HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (ang. Hepatocyte Growth Factor)

HNO_3 – kwas azotowy

IGCLC – Międzynarodowe Konsorcjum Raka Żołądka (ang. International Gastric Cancer Linkage Consortium)

IHC – metoda immunohistochemii

IL – interleukina

Ile (I) - izoleucyna

INT - intron

k – kilo (1000)

L-CAM – E-kadheryna

Leu (L) - leucyna

LOH – utrata heterozygotyczności (ang. Loss of Heterozigosity)

Lys (K) - lizyna

min. – minuta

mg - miligram

ml - mililitr

MDE – żel poliakrylamidowy o wysokiej rozdzielczości (ang. Mutation Detection Ehhancement gel)

Met (M) – metionina

MMR – geny i białka wchodzące w system naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. Mismatch Repair)

MSI – niestabilność mikrosatelitarnego DNA (ang. Microsatellite Instability)

MSI-H – fenotyp MSI-high

MSI-L – fenotyp MSI-low

MSS – stabilność mikrosatelit

MSP – PCR specyficzny dla metylacji (ang. Methylation-Specyfic PCR)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)

rpm – ilość obrotów na minutę

sek. – sekunda

Ser (S) - seryna

PDGF - płytkowy czynnik wzrostu (ang. Platelet-Derived Growth Factor)

Phe (F) – fenyloalanina

Pro (P) - prolina

SSCP - polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA (ang. Single Strand Conformation Polymorphism). Najpowszechniejsza metoda wykrywania mutacji i polimorfizmów oparta na metodzie PCR.

T – tymina

Ta – temperatura przyłączania *primerów*/starterów (ang. temperature of annealing)

TGF - transformujący czynnik wzrostu (ang. Transforming Growth Factor)

Thr (T) – treonina

Trp (W) - tryptofan

TSR – bufor zawierający formamid, zapobiegający przechodzeniu matrycowego DNA do kapilary w czasie EP produktów sekwencjonowania (ang. Template Suppression Reagent)

Tyr (Y) - tyrozyna

µl - mikrolitr

V – Volt

Val (V) - walina

W – Wat

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

2. Wstęp:

Rak żołądka jest jednym z najczęściej występujących u człowieka nowotworów złośliwych. Plasuje się na jednym z czołowych miejsc, jako przyczyna zgonów nowotworowych – zajmując w Polsce trzecie miejsce (po raku płuca i prostaty) wśród mężczyzn i siódme (po raku sutka, szyjki macicy, płuca, jajnika, trzonu macicy i jelita grubego) u kobiet [1, 2, 3]. Wczesne rozpoznanie choroby, dostępność narzędzi diagnostycznych oraz właściwe leczenie chirurgiczne odgrywają kluczową rolę we wzroście odsetka wyleczeń, jednak zaawansowany rak żołądka charakteryzuje się nadal wysoką śmiertelnością.

Od lat obserwuje się wyraźną tendencję spadkową w zachorowalności na ten typ nowotworu w krajach kultury zachodniej, jednak w wielu regionach świata, takich jak kraje Ameryki Łacińskiej, w Korei, Chinach, czy innych krajach rozwijających się, postęp ten nie jest aż tak zauważalny. Szacuje się jednak, że w większości krajów zachorowalność na raka żołądka w ciągu ostatnich 50-ciu lat zmalała o ok. 75% [3].

Wykazano różnice w zachorowalności na raka żołądka pomiędzy regionami świata czy poszczególnymi krajami. Opisywano zarówno różnice regionalne, jak i różnice zachorowalności wśród grup kulturowych czy etnicznych, nawet w obrębie danego państwa. Najwyższą zapadalność na tę chorobę odnotowuje się w Japonii, Chile, oraz w Meksyku [1].

W Polsce, według danych z 1999 roku, częstość raka żołądka wśród mężczyzn wynosi około 15,3 zachorowań na 100000 mieszkańców, a wśród kobiet 5,8 na 100000 mieszkańców [2].

Przyjmuje się, że największa zachorowalność na raka żołądka przypada w 6 dekadzie życia, choć różnice dla obu płci są wyraźne: szczyt zachorowań przypada u mężczyzn między 65-tym a 75-tym rokiem życia, podczas gdy u kobiet między 70-tym a 80-tym rokiem życia. Stosunek zachorowań mężczyzn do kobiet wynosi 2:1 [3].

Raki żołądka przed 40-stym rokiem życia występują stosunkowo rzadko. Jednak w Meksyku, gdzie gruczolakorak żołądka jest najczęstszym nowotworem złośliwym w

populacji, odsetek zachorowań na tę chorobę wśród pacjentów poniżej 40-tego roku życia jest najwyższy na świecie i wynosi 15% [4].

Mimo, iż jeszcze kilkadziesiąt lat temu przeważały zachorowania na raka żołądka okolicy odźwiernikowej, w ostatnich kilku dekadach odnotowano zwiększoną zachorowalność na raka żołądka w części okołowpustowej, kosztem zachorowań na raka okolicy antrum [5].

2.1. Przyczyny powstawania raka żołądka

Bezpośrednia przyczyna prowadząca do powstania raka żołądka nie jest znana. Wśród przyczyn wymienia się przede wszystkim: czynniki środowiskowe oraz zaburzenia genetyczne, czy epigenetyczne jak metylacja regionów promotorowych genów istotnych w procesie onkogenezy [1].

2.1.1. Przyczyny środowiskowe

Wśród przyczyn środowiskowych wymienia się przede wszystkim niewłaściwą dietę (wędzone pokarmy, sól kuchenną [6, 7], konserwowaną żywność, przewagę w diecie czerwonego mięsa [8], niedobory witamin oraz antyoksydantów zawartych w świeżych warzywach i owocach [9, 10]), jak również palenie tytoniu [11], przebyte zabiegi operacyjne [12], czy infekcję wirusem Epstein-Barr [13, 14, 15].

Przy rozważaniu przyczyn środowiskowych należy również wziąć pod uwagę infekcję *Helicobacter pylori* i konsekwencje wieloletniej ekspozycji śluzówki żołądka na N-nitrozaminy i inne produkty uboczne produkowane przez tę bakterię [12, 16, 17].

Infekcja Helicobacter pylori

Istnieje silny związek pomiędzy infekcją bakterią *Helicobacter pylori* a zachorowaniami na raka żołądka [18]. Co najmniej 10-letnia ekspozycja na metabolity uwalniane przez tę bakterię, jest postrzegana jako jedna z przyczyn rozwoju raka żołądka: przyjmuje się, że

właśnie ci pacjenci są szczególnie narażeni na rozwój tego nowotworu [19]. Pacjentów, u których zakażenie tą bakterią nastąpiło w dzieciństwie, a infekcja ta trwa kilkadziesiąt lat, uważa się za grupę najbardziej zagrożoną rakiem żołądka, tym bardziej, że zakażenie takie jest znacznie trudniejsze do wyleczenia, niż w przypadku osób, u których zakażenie pojawiło się w dorosłym życiu [20, 21].

Badania epidemiologiczne wskazują, że ryzyko choroby wzrasta 3 do 6-ciu razy u osób wykazujących obecność tego drobnoustroju w organizmie, w stosunku do populacji nie objętej zakażeniem tą bakterią. Zależność ta odnosi się szczególnie do raka typu jelitowego, występującego w dystalnej części żołądka [3, 17]. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż w Japonii, gdzie częstość występowania raka żołądka jest najwyższa na świecie, wśród 60 milionów ludzi, którzy wykazują obecność *H. pylori*, rak żołądka dotyka 0,4% osób zakażonych tym drobnoustrojem [22].

Zakażenie *H. pylori* jest najczęstszą przyczyną przewlekłego zapalenia śluzówki żołądka. Wielokrotnie opisywano efekt działania tej bakterii, jako sekwencję zmian prowadzących do rozwoju raka żołądka: poprzez przewlekłe i zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka i metaplazję, po dysplazję i raka [16].

Uwalniane przez *Helicobacter pylori* czynniki metaboliczne nie tylko powodują uszkodzenie komórek błony śluzowej, ale są również odpowiedzialne za pojawianie się daleko idących zmian w materiale genetycznym, transformację komórek i ich nadmierną proliferację. Komórki te stają się szczególnie podatne na działanie szerokiego spektrum mutagenów pochodzenia endo- i egzogennego [23]. Na skutek działania metabolitów *H. pylori*, DNA komórek śluzówki wykazuje podatność na uszkodzenia, a same komórki stają się znacznie bardziej wrażliwe na wolne rodniki (będące efektem zjawisk związanych z procesem zapalnym, gdzie są produkowane rodniki hydroksylowe, czy nadtlenek azotu). Rozważając rolę *H. pylori* w uszkodzeniu komórek prawidłowej śluzówki żołądka, należy wspomnieć o szczególnych, najbardziej zjadliwych podtypach tej bakterii, zawierających w swoim genomie geny *cagA* i *vacA*. Podtypy te są bezpośrednio związane z powstawaniem wrzodów i raka żołądka [24, 25]. Obecny w genomie *H. pylori* gen *cagA* odpowiada za powstawanie czynnika oddziaływującego negatywnie na komórki śluzówki żołądka:

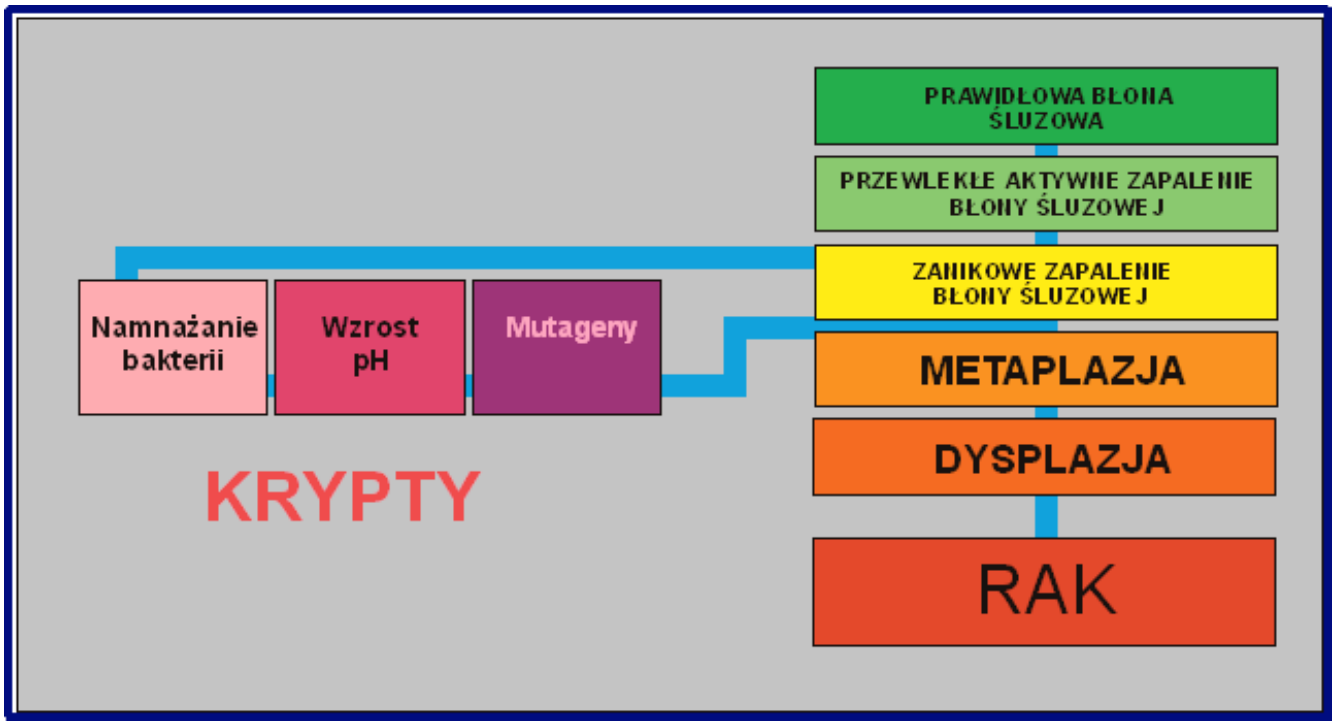
antygenu związanego z cytotoksyną A. Toksyna VacA uszkadza bezpośrednio komórki nabłonkowe, a będąc akceleratorem zmian zapalnych, pobudza ona produkcję IL-8 w komórkach nabłonka, indukując czynnik transkrypcyjny κ-B. Mechanizm oddziaływania toksyny na komórki błony śluzowej żołądka przypomina efekt domina: pojawia się wakuolizacja, zmiany w funkcjonowaniu aparatu lizosomalnego, pękanie lizosomów i działanie zawartych w nich enzymów wewnątrz komórki, tworzenie porów w obrębie błony komórkowej i w końcu apoptoza. Skutkiem tego jest eliminacja części komórek i powstawanie przerw w warstwie komórek nabłonka [24, 26, 27].

Infekcja *Helicobacter pylori* jest wiązana ze zjawiskiem niestabilności mikrosatelit. Zakażenie tym drobnoustrojem występuje znacznie częściej u pacjentów z rakiem żołądka charakteryzujących się fenotypem MSI+ w tkance nowotworowej, w porównaniu do pacjentów gdzie guzy wykazują brak niestabilności mikrosatelit. Zjawisko to jest wiązane z negatywnym oddziaływaniem tej bakterii na kompleksy naprawcze w komórce, przede wszystkim zaburzającym prawidłowe działanie białek MMR. Produkty przemiany materii *H. pylori* są odpowiedzialne za obniżanie w komórkach nabłonkowych ekspresji białek MMR - przede wszystkim obniżając prawidłowy poziom kompleksów MutS i MutL. Zjawisko upośledzenia aparatów naprawczych, będące konsekwencją chronicznej infekcji *H. pylori* może prowadzić do rozwoju raka żołądka poprzez akumulację mutacji w komórkach błony śluzowej [28].

W ostatnich latach zwrócono uwagę na zależność infekcji *H. pylori*, a epigenetycznym mechanizmem wyłączania genu *CDH1* – metylacją jego promotora [29].

Paradygmat Correi

W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia, na podstawie rozległych badań patologicznych i epidemiologicznych, zaproponowano etiologiczno-patogenetyczny model rozwoju raka żołądka. W modelu tym ukazano jego rozwój poprzez przewlekłe zapalenie, atrofię, metaplazję jelitową oraz dysplazję [30]. Model ten przedstawiono na poniższym schemacie:



Rys. 1: Hipotetyczny model etiologiczno-patogenetyczny rozwoju raka żołądka wg Correi [30].

Rozwój stanu zapalnego we wczesnym etapie tej sekwencji zdarzeń jest wiązany z zakażeniem *Helicobacter pylori* i/lub nadmiernym spożyciem soli kuchennej. Zaznaczone na schemacie stadia pośrednie, są istotnie powiązane zarówno ze spożyciem azotanów (czyli z wewnątrzżołądkową nitrozoazotynacją) jak i ochroną antyoksydacyjną poprzez przyjmowanie kwasu askorbinowego. Stadia końcowe wiąże się z przyjmowaniem β-karotenu oraz chlorku sodu [31].

Infekcja wirusem Epstein-Barr (EBV)

Wirus EBV jest wiązany z występowaniem wielu chorób, w tym mononukleozy zakaźnej, czy całego spektrum nowotworów człowieka: ziarnicy złośliwej, chłoniaków B-komórkowych, raków: żołądka, nosogardzieli, płuc [32].

Polskie źródła podają, że obecność wirusa Epstein-Barr wykryto w 12,5% badanych raków żołądka [33]. Warto nadmienić, że użyty do tych badań zbiór archiwalny raków zawiera się w analizowanej dla potrzeb niniejszej pracy grupie sporadycznych raków żołądka.

Mechanizm inwazji oraz wpływu na karcynogenezę komórek żołądka przez ten wirus nie został jeszcze dokładnie poznany [34].

Zwrócono jednak uwagę na współistnienie metylacji promotorów wielu genów oraz obecności wirusa EBV w tkance. Dodatkowo, zaobserwowano, że zjawisko hipermetylacji w EBV-pozytywnych rakach żołądka dotyczy przede wszystkim grup genów związanych ze szlakami molekularnymi procesów związanych z regulacją cyklu komórkowego (*p14, p16, COX2*), naprawą uszkodzonego DNA, adhezją komórkową oraz przerzutowaniem (E-*kadheryna, TIMP-3*), angiogenezą, transdukcją sygnału (*APC, PTEN*) czy apoptozą. Odsetek metylacji regionów CpG jest wyższy w grupie raków EBV-pozytywnych w porównaniu do grupy nie wykazującej obecności wirusa [35].

Zabiegi chirurgiczne wykonane wcześniej na żołądku

Zaobserwowano korelację pomiędzy zachorowaniami na raka żołądka a zabiegami operacyjnymi, które w przeszłości zostały wykonane na żołądku [12]. Przykładowo - częściowa gastrektomia może być przyczyną zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka, co może wiązać się ze znacznie większym, w porównaniu do całej populacji odsetkiem chorych, u których rozwija się później rak żołądka, często pojawiający się w miejscu cięcia [36].

Powyższe informacje zostały ostatnio uzupełnione o opublikowane doniesienie o roli jaką być może odgrywają w tworzeniu raka żołądka komórki macierzyste migrujące ze szpiku kostnego. Jednym z ich zadań ma być naprawa uszkodzeń w obrębie błony śluzowej żołądka. Mechanizm wchodzenia tych komórek na drogę karcynogenezy pozostaje jednak nieznany [37].

2.1.2. Zaburzenia genomowe w powstawaniu raka żołądka

Podobnie jak inne typy nowotworów złośliwych, rak żołądka jest postrzegany jako konsekwencja wielostopniowego procesu molekularnego, na skutek którego prawidłowa komórka przechodzi w komórkę nowotworową.

Zaobserwowano dużą ilość zaburzeń genomowych w powstawaniu raka żołądka. Do opisanych do tej pory należą: powstawanie oraz zaburzenia regulatorów cyklu komórkowego, czynników wzrostu, stabilności genomu, genów hamujących wzrost guza, genów kodujących cząsteczki adhezyjne czy tworzenie onkogenów [38]. Przyjmuje się, że zaburzenia te są różne w zależności od typu histologicznego nowotworu - a więc każdy typ histologiczny może mieć osobną drogę zmian molekularnych prowadzących do rozwoju raka.

Zaburzenia genetyczne związane z rakiem żołądka u człowieka, zebrano w poniższej tabeli, a część z nich omówiono w poniższych podrozdziałach.

Nieprawidłowości genów często obserwowane w rakach żołądka	Nieprawidłowości genów rzadziej obserwowane w rakach żołądka	Geny przypuszczalnie mające udział w rozwoju raka żołądka	Geny inaktywowane poprzez hipermetylację promotora
CDH1	*GENY MUTATOROWE*	*Runx-3*	*CDH1*
TFF-1	*APC*	*Interleukina 1a*	*p16*
FHIT	*DCC*	*PGFR*	*hMLH1*
cMET	β-*katenina*	*FGFR*	*APC*
HER2/neu	*Bax*	*Kaspazy*	*MGMT*
p53	*TGF-beta I-II*	*APO-1*	
EGFR	*LKB1*	*PTEN*	
p16	*k-Ras*	*p14*	
COX-2		*MGMT*	

Tab. 1: Rodzaje zaburzeń genetycznych w ludzkim raku żołądka. Wg Graziano et al. [39]. Niebieskim kolorem wyszczególniono zaburzenia związane z występowaniem fenotypu MSI, na zielono - geny związane z rozlanym rakiem żołądka. Na czerwono zaznaczono geny, których inaktywację związaną z hipermetylacją promotora obserwowano szczególnie często w rakach żołądka.

2.1.2.1. Zaburzenia stabilności genomu

Rola niestabilności genomowej w raku żołądka nie została jeszcze dokładnie wyjaśniona, mimo to jest przez badaczy ściśle wiązana z powstawaniem tego nowotworu. Wymienia się dwa typy niestabilności genomowej: duże zaburzenia na poziomie chromosomalnym i zaburzenia wysoko powtarzalnych (1–5 bp) sekwencji mikrosatelitarnego DNA [40].

Pierwszy typ to tzw. *niestabilność chromosomalna*. Jest to zjawisko wynikające z zaburzeń mitotycznych, związane z nieprawidłowym rozchodzeniem się chromosomów w czasie anafazy. Skutkiem tego może być wystąpienie nieprawidłowego garnituru chromosomowego komórki potomnej, czy dużych delecji lub insercji w obrębie poszczególnych chromosomów [41, 42]

Drugi typ zaburzeń stabilności genomu to tzw. *niestabilność mikrosatelit*. Jest to efekt połączenia błędów polimerazy DNA, z równoczesnym uszkodzeniem aparatów naprawczych, na przykład związanych z mutacjami w obrębie genów mutatorowych. Skutkiem tego są nie wychwytywane przez aparat naprawczy błędy polimerazy, która po prostu „ślizga" się po DNA. Szczególnie łatwo enzym ten ślizga się, bądź tworzy pętle na DNA, w szczególnych regionach: wysoko powtarzalnych sekwencjach mikrosatelitarnych, takich jak np. wielokrotne powtórzenia CA, które są „piętą achillesową" polimerazy DNA.

Skutkiem tych nie naprawionych pomyłek jest niekontrolowane, losowe wydłużanie lub skracanie tych repetytywnych fragmentów w komórkach potomnych [42]. Błędy te przy obecności prawidłowo działającego aparatu naprawczego w normalnych warunkach są eliminowane dzięki kompleksowi enzymów: helikazy, egzonukleazy i polimerazy, odpowiedzialnych za naprawę tych pomyłek [43].

W sytuacji uszkodzenia genów mutatorowych w czasie karcynogenezy dochodzi więc często do ujawnienia się nowego fenotypu guza (bądź fenotypów poszczególnych klonów komórek nowotworowych) związanego ze zmianami zachodzącymi w strukturze sekwencji mikrosatelitarnego DNA. Raki żołądka wykazujące niestabilność mikrosatelitarnego DNA, w porównaniu do raków o fenotypie MSS rokują nieco lepiej. Natomiast najbardziej niekorzystne prognostycznie wydają się być raki żołądka o fenotypie MSI-low [44, 45].

Interesujące jest, że w rakach żołądka wykazano zależność pomiędzy występowaniem fenotypu MSI a hipermetylacją promotora genu mutatorowego *hMLH1*, przy czym zależność ta była wyższa we wczesnych rakach żołądka w porównaniu z gruczolakami żołądka [46].

2.1.2.2. Antyonkogeny

Rola niektórych genów supresorowych została dość dokładnie poznana i opisana. Mechanizm wyłączania tych genów wiąże się ściśle z teorią *„two hits"* Knudson'a [47]. Teoria ta mówi, że w genie supresorowym do rozwoju nowotworu nie wystarczy „zwykła" mutacja upośledzająca działanie białka kodowanego przez ten gen. Aby mutacja „zaczęła działać" musi dojść do wyłączenia drugiego allela. Wyłączenie drugiego allela jest zazwyczaj skutkiem dużej delecji w obrębie chromosomu, bądź rearanżacji chromosomalnej. Hipoteza *„two hits"* po raz pierwszy została zastosowana do wyjaśnienia mutacji genu *Rb-1* w siatkówczaku płodowym (*retinoblastoma*) [48].

Do najbardziej istotnych w rozwoju raka żołądka genów supresorowych należą geny kodujące cząsteczki adhezyjne: E-kadherynę, P-kadherynę, α-kateninę (opisane w osobnym rozdziale o molekułach adhezyjnych) oraz p53, pS2, APC, DCC:

APC:

W raku żołądka mutacje w genie *APC* występują bardzo często. 20% wczesnych, sporadycznych raków żołądka wykazuje mutacje genu *APC*, co może sugerować współodpowiedzialność nieprawidłowego białka APC za wchodzenie komórek żołądka w początkowy etap karcynogenezy [49].

Przyjmuje się, że w 50% przypadków raków żołądka o wysokim stopniu zróżnicowania dochodzi do wystąpienia mutacji w tym genie: zwykle są to - inaczej niż w rakach jelita grubego – mutacje zmiany sensu.

p53:

Gen *p53* bywa nazywany „aniołem stróżem genomu". Białkowy produkt tego genu odpowiada za kontrolę cyklu komórkowego. Konsekwencją uszkodzenia tego genu jest nadmierna, niekontrolowana proliferacja komórek.

Uważa się, że mutacje somatyczne *p53* w ludzkich nowotworach są zlokalizowane w eksonach 5-8 [50].

Mutacje *p53* mogą pełnić rolę informatywną w procesie określania stopnia zezłośliwienia tkanki. Przyjmuje się, że mutacje w genie *p53* pojawiają się najczęściej na etapie gruczolaka i są w raku żołądka stosunkowo późnym zdarzeniem molekularnym w procesie karcynogenezy [51].

Raki przewodu pokarmowego charakteryzują się podobieństwem jeśli chodzi o zmiany w obrębie *p53*. W przypadku raków nisko zróżnicowanych najczęściej obserwuje się mutacje, gdzie połączone trzema mostkami wodorowymi pary CG, zamieniane są na połączone dwoma mostkami wodorowymi pary AT. Tego typu zmiany wiąże się, z mutagennym wpływem N-nitrozamin działających na prawidłowe komórki śluzówki żołądka. W dobrze zróżnicowanych rakach żołądka występują zwykle zmiany w obrębie par AT [51].

Mutacje genu *p53* mogą dotyczyć sporadycznych raków żołądka, bądź pojawiać się w komórkach linii germinalnej, w zespole Li-Fraumeni. Zespół ten dziedziczy się autosomalnie dominująco [48]. Efektem uszkodzenia genu *p53* we wszystkich komórkach organizmu jest występowanie szerokiego spektrum nowotworów złośliwych u osób, będących nosicielami tej wady. Oprócz raków żołądka występują u nich raki sutka, nowotwory układu nerwowego, tkanek miękkich, chłoniaki, białaczki czy nowotwory kory nadnerczy [48]. Zakaz wykonywania prześwietleń rentgenowskich u tych pacjentów ma więc wysokie uzasadnienie, gdyż są oni niezwykle narażeni na powstawanie nowotworów.

W sporadycznych rakach żołądka do mutacji *p53* dochodzi w ok. 1/3 gruczolaków i 2/3 raków wysoko zróżnicowanych, zwykle tych wykazujących aneuploidię. Rokowanie przy mutacji genu *p53* jest zwykle niekorzystne. Ostatnie prace donoszące o postępach w terapii genowej guzów ze zmutowanym *p53* wydają się być obiecujące [52].

pS2:

Rola znajdującego się na chromosomie 1, kodującego presenilinę genu *pS2 (PSEN2*) jest głównie kojarzona z dziedziczeniem choroby Alzheimera. Jego rola w rozwoju raka żołądka nie jest dokładnie poznana. Wiadomo, że prawidłowe komórki błony śluzowej wykazują ekspresję tego białka, gdy tymczasem zjawisko to nie występuje w 76% raków

żołądka. Zaobserwowano, że *knock-out* tego genu u myszy wiąże się z rozwojem gruczolaków żołądka. Obecnie trwają badania nad znaczeniem metylacji promotora tego genu w rozwoju raka żołądka [56].

DCC:

Pełna nazwa leżącego na dłuższym ramieniu chromosomu 18 genu *DCC* brzmi: „*Deleted in Colorectal Cancer*". Jest to gen, którego wyłączanie jest niezwykle częste w rakach przewodu pokarmowego, w szczególności, jak wskazuje nazwa, w rakach jelita grubego. Zaobserwowano dwa zjawiska dotyczące *DCC*, ściśle powiązane z rakiem żołądka: występowanie zjawiska LOH w wysoko zróżnicowanych rakach, oraz związek z przerzutami, szczególnie do wątroby, co może być związane z uszkodzeniami prawidłowego białka. Jednak należy podkreślić, iż rola genu *DCC* w rakach przewodu pokarmowego nie została w pełni wyjaśniona.

Inne geny supresorowe:

Istnieją również inne geny supresorowe, które kodują białka takie jak kadheryny czy kateniny, które biorą udział w patogenezie raka żołądka. Ekspresja tych białek jest znacznie niższa w rakach nisko zróżnicowanych niż w rakach dobrze zróżnicowanych [53]. Stwierdzono, że w porównaniu do raków żołądka typu jelitowego, w rozlanych rakach żołądka ekspresja E-kadheryny ulega obniżeniu [54]. W rakach żołądka, ekspresja innych białek adhezyjnych (α-kateniny i P-kadheryny) jest znacznie niższa w rakach nisko zróżnicowanych, w porównaniu do raków wysoko zróżnicowanych [53].

E-kadheryna jako supresor wzrostu, działa na zasadzie inhibicji kontaktowej, indukując gwałtowne zatrzymanie cyklu komórkowego, poprzez dodatnią regulację *p27*, który pełni funkcje inhibitora kinaz CDK [55].

Białka wchodzące w skład kompleksów adhezyjnych zostały szerzej opisane w rozdziale dotyczącym molekuł przylegania.

2.1.2.3. Rola onkogenów w raku żołądka

W karcynogenezie raka żołądka istotną rolę odgrywają receptory czynników wzrostu, których zaburzenia są związane z transformacją nowotworową: w komórkach raka żołądka wykryto zaburzenia funkcji wewnątrzbłonowych kinaz tyrozynowych [56, 57]. Kinazy te należą do jednej z czterech grup onkoprotein, do receptorów czynników wzrostu. Pozostałe grupy to: czynniki wzrostu, białka wewnątrzjądrowe oraz białka pełniące rolę przekaźników w komórce [58].

Do protoonkogenów odgrywających główną rolę w karcynogenezie raka żołądka można zaliczyć wewnątrzbłonowe kinazy tyrozynowe: K-sam, c-met oraz HER-2/neu (c-erbB2*)* [59]. Oprócz tych białek, w ostatnich latach pojawiły się doniesienia o roli innych protoonkogenów takich jak *K-ras* i *Hst-1,* nadmiernie amplifikowanych w wysoko zróżnicowanych rakach żołądka [56].

K-sam to białko o własnościach kinazy tyrozynowej. Do amplifikacji *K-sam* nigdy nie dochodzi w rakach żołądka o wysokim stopniu zróżnicowania, za to wysoka jego amplifikacja powszechnie występuje w rakach z włóknistym podścieliskiem lub niskozróżnicowanych. W przeciwieństwie np. do c-met, kinaza ta jest związana z późnymi stadiami karcynogenezy, wręcz można mówić o późnej amplifikacji *K-sam* w komórkach nowotworów, które weszły w fazę tworzenia przerzutów [56].

Białko c-met jest receptorem dla HGF o aktywności kinazy tyrozynowej. Produkcja HGF w warunkach fizjologicznych jest aktywowana przez szereg cytokin. W żołądku HGF jest produkowany przez fibroblasty. W czasie transformacji nowotworowej komórek błony śluzowej żołądka, c-met podlega amplifikacji. Efektem tego jest między innymi nadmierna produkcja cytokin, powodująca „samonapędzanie" się c-met [38]. W komórkach śluzówki żołądka amplifikacja *c-met* pojawia się najprawdopodobniej we wczesnych stadiach transformacji nowotworowej i dotyczy jedynie zaawansowanych raków żołądka [56].

Rolę białka o własności kinazy tyrozynowej HER-2/neu i jego nadekspresję wiąże się głównie z karcynogenezą komórek gruczołowych sutka. Guzy wykazujące nadekspresję HER-2/neu rokują z reguły niekorzystnie. Nadmierną amplifikację tego onkogenu obserwowano również w dobrze zróżnicowanych rakach żołądka [56].

2.1.2.4. Zaburzenia genów kodujących cząsteczki adhezyjne

Wiele genów kodujących cząsteczki adhezyjne jest zaliczanych do grupy genów supresorowych. Konsekwencją uszkodzenia tych genów są zaburzenia adhezji komórkowej związane z osłabieniem, bądź całkowitym zniszczeniem, zwykle bardzo mocnych połączeń międzykomórkowych.

Dokładne omówienie cząsteczek adhezyjnych i konsekwencje upośledzenia ich funkcji zostanie przedstawione w następnym rozdziale.

2.2. Cząsteczki adhezyjne

Dotychczas poznano kilka rodzin cząsteczek adhezyjnych. Są to: kadheryny (E-, P-, N-), kateniny (α-, β- i γ-), selektyny (P-, E-, L-), rodzina immunoglobulin (MAdCAM, ICAMs, NCAM) i integryny. W poniższym rozdziale opisano molekuły adhezyjne odgrywające szczególną rolę w rozwoju raka żołądka.

2.2.1. α-katenina

Gen *CTNNA1* kodujący α-kateninę znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu piątego. Białko to wchodzi w skład kompleksu ECCU (α-katenina/β-katenina/E-kadheryna), odpowiadając między innymi za prawidłową adhezję międzykomórkową, czy przyleganie komórek do podłoża. W skład kompleksu może również wchodzić γ-katenina. Te trzy kateniny odgrywają rolę ogniwa łączącego cytoszkielet z domeną cytoplazmatyczną E-kadheryny. Upośledzenie funkcji któregokolwiek z białek wchodzących w skład kompleksu często powoduje odłączanie komórek nowotworowych od guza pierwotnego, co wiąże się z inwazją raka i powstawaniem przerzutów.

Nie tylko E-kadheryna może tworzyć kompleksy z kateninami: w prawidłowej siatkówce, bądź siatkówczaku, α- i β-katenina są związane z N-kadheryną [60].

CTNNA1 koduje białko o masie 120 kDa [61, 62]. Ludzka α-katenina wykazuje bardzo dużą homologię (99,2%) w stosunku do białka mysiego [63, 64]. Transkrypt *CTNNA1* ma długość 3,4 kb i składa się z szesnastu eksonów kodujących 906 aminokwasów [64].

Gen wykazuje równomierną ekspresję we wszystkich prawidłowych tkankach. Zaburzenia na poziomie genu mogą wpływać na powstanie upośledzonego, bądź skróconego produktu białkowego, wpływając tym samym na rozwój szerokiego spektrum nowotworów, w tym raka żołądka [65, 66].

Po raz pierwszy zjawisko karcynogenezy związane z nieprawidłowym transkryptem α-kateniny opisano w 1992 roku. Wykazano wtedy, że komórki linii PC9 wywodzącej się z ludzkiego raka płuc, przy zachowanej prawidłowej ekspresji E-kadheryny, traciły swoją przyczepność, dzieląc się gwałtownie już jako pojedyncze komórki. Zjawisku temu towarzyszyły nieprawidłowości w budowie i funkcjonowaniu α-kateniny. Działo się tak nawet w przypadku pojawiania się bardzo małej ilości nieprawidłowych cząsteczek białka – co wiązało się z obniżeniem ekspresji genu [67].

Jak wspomniano, w obrębie połączeń kontaktowych komórek, α-katenina tworzy kompleks z β-kateniną oraz E-kadheryną, kotwicząc je do cytoszkieletu aktynowego.
α-katenina występuje jako homodimer, jednak w obecności β-kateniny tworzy z nią heterodimer 1:1. Na podstawie analizy obrazów uzyskanych dzięki krystalografii rentgenowskiej wykazano, że domena białka odpowiedzialna za interakcje z β-kateniną znajduje się pomiędzy 57 a 264 resztą aminokwasową [68].

2.2.2. β-katenina

Podobnie, jak pozostałe kateniny, β-katenina jest białkiem cytoplazmatycznym, którego kompleks z α-kateniną i E-kadheryną jest kluczowym elementem wchodzącym w skład *zonula adherens*. W ten sposób β-katenina współodpowiada za przyleganie sąsiadujących komórek, ich wzajemną komunikację, czy ich prawidłowy wzrost i rozwój.

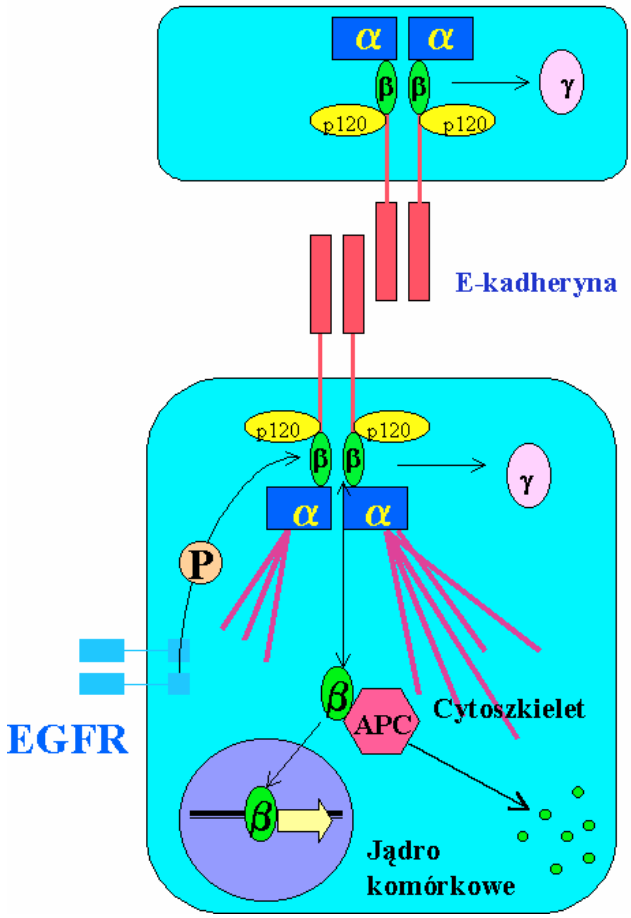
β–katenina jest kodowana przez znajdujący się na krótszym ramieniu chromosomu 3, w pozycji 3p22-3p21.3, gen *CTNNB1* [69]. Gen ten nie wykazuje podobieństwa do genu

kodującego α-kateninę, jednak samo białko jest aż w 70% podobne do występującej w desmosomach γ-kateniny [70].

W 1996 roku van Roy i Berx wykazali, że gen *CTNNB1* składa się z 16 eksonów, rozciągając się na długości 23,2 kb. Alternatywny *splicing* w obrębie ostatniego eksonu powoduje powstanie wariantu białka skróconego o 159 bp od końca 3'. Region promotorowy jest bogaty w pary GC i zawiera sekwencję TATA-box [71].

W 1997 roku dwie grupy badaczy jednocześnie wskazały na gen *APC*, jako na negatywny regulator poziomu β-kateniny [72, 73]. Wykazano w ten sposób, że regulacja poziomu tego białka odgrywa kluczową rolę w przypadku działania *APC*, jako genu supresorowego, a regulacja ta może być zaburzona zarówno poprzez mutacje tego genu, jak i zmiany w obrębie genu *CTNNB1* [73].

Cytoplazmatyczny koniec białka E-kadheryny tworzy kompleks z β- lub γ-kateniną, który łączy się z cytoszkieletem aktynowym za pośrednictwem α-kateniny. Niezwiązana, znajdująca się w cytoplazmie β–katenina jest natychmiast degradowana przez białko APC. Wszelkie anomalie związane z tym szlakiem biochemicznym prowadzą do nagromadzenia się nie związanej β-kateniny w cytoplazmie, a białko to przemieszcza się do jądra komórkowego, stymulując tam transkrypcję genów targetowych. β–katenina oddziaływuje i jest fosforylowana przez receptor typu kinazy tyrozynowej dla EGF [73]. Interakcje te przedstawia poniższy schemat:



Rys. 2: Schemat przemian biochemicznych oraz interakcji β-kateniny w komórce.

Mutacje genu *CTNNB1* obserwuje się w bardzo szerokim spektrum nowotworów. W raku żołądka wykazano istotną statystycznie korelację zaburzeń ekspresji β-kateniny z rozlanym typem raka żołądka, gdzie jako zaburzenia ekspresji klasyfikowano zarówno nadekspresję, jak i obniżenie ekspresji białka. Zaburzenia ekspresji białka dotyczyły 77% pacjentów i były również związane z głębokością nacieku, natomiast nie wykazano jakiegokolwiek związku ze stopniem inwazji do okolicznych węzłów chłonnych [74].

Ostatnie badania nad podwójnymi, pierwotnymi gruczolakorakami jelita grubego i żołądka wykluczyły ich związek z mutacjami w obrębie genu *CTNNB1* [75]. W liniach komórkowych wywodzących się z raka jelita grubego wykazano aż 26% mutacji *CTNNB1.* W 40% linii z mutacją nie wykazano obecności kompleksu z α-kateniną oraz APC [76]. Zakłócenie aktywności kompleksu β–katenina /TCF4 (czynnik transkrypcyjny) w raku jelita grubego powoduje gwałtowne zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 w puli

proliferujących do tej pory prawidłowo komórek, znajdujących się w obrębie uchyłków jelita grubego, przy równoczesnym rozpoczęciu różnicowania komórkowego [77]. Morin opisał 3 raki jelita grubego ze zmutowanym genem kodującym β-kateninę, gdzie somatyczna mutacja dotyczyła miejsc potencjalnej fosforylacji. Wszystkie te guzy były heterozygotami pod względem miejsca w którym zaszła mutacja, co skłoniło badaczy do wysunięcia hipotezy o związku mutacji z pojawieniem się w obrębie cytoplazmy puli β-kateniny, niewrażliwej na działanie białka APC [72].

Oprócz raka żołądka i jelita grubego, nieprawidłowości związane z β–kateniną mogą być przyczyną szeregu chorób. Białko to aktywuje na przykład ekspresję genu *PKD1* (związanego z dziedziczną wielotorbielowatością nerek) [78].

W raku sutka wykazano, że ekspresja cykliny D1 jest uzależniona od poziomu β-kateniny w komórkach nowotworowych. Wysoka aktywność tego białka jest wiązana w raku sutka z niekorzystnym rokowaniem. Obecnie, duże nadzieje wiąże się z terapią tego nowotworu nakierowaną na obniżenie aktywności β-kateniny [79].

Pojawiły się interesujące doniesienia o roli mutacji związanych z hiperregulacją β-kateniny w rozwoju czerniaka złośliwego. W 7 z 26 linii komórkowych wywodzących się z ludzkiego czerniaka wykryto nieprawidłowy, bardzo wysoki poziom tego białka. W większości przypadków wiązało się to z mutacjami *CTNNB1*. Mutacje te dotyczyły zaburzeń *splicingu*, bądź były mutacjami zmiany sensu, a ich efektem była post-translacyjna destabilizacja białka oraz akceleracja wiązania β-kateniny do czynników transkrypcyjnych Lef i Tcf [80].

Mutacje genu kodującego β-kateninę wykryto również w rakach jajnika, czy nowotworach wątroby [81, 82, 83].

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, w *retinoblastoma* oraz prawidłowej tkance siatkówki, β–katenina tworzy kompleks z α–kateniną oraz N-kadheryną [60].

2.2.3. P-kadheryna

P-kadheryna (kadheryna łożyskowa) jest kodowana przez gen *CDH3*, który znajduje się na chromosomie 16, bezpośrednio za genem *CDH1*. Japońskie badania dotyczące

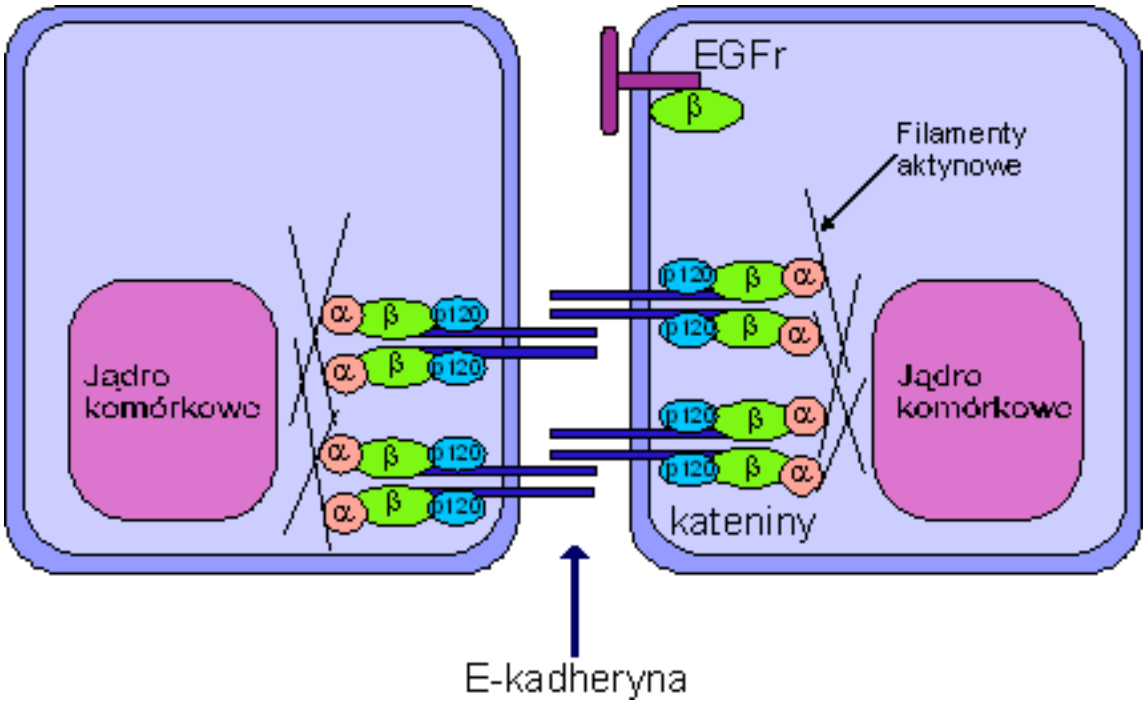
ekspresji P-kadheryny wykazały jej prawidłowy poziom w 54% raków żołądka, jednak był on zmienny i wykazywał fluktuacje w zależności od poziomu ekspresji E-kadheryny w tych tkankach [84].

2.2.4. E-kadheryna (uwomorulina, L-CAM, kadheryna-1, UVO, CDHE, CAM 120/80)

Jednym z istotnych czynników związanych z powstawaniem rozlanych raków żołądka jest E-kadheryna. Jest ona specyficznym, zależnym od kationów wapnia białkiem, które wraz z kateninami odgrywa kluczową rolę w adhezji komórkowej w obrębie epitelium.

Kodujący E-kadherynę gen *CDH1* znajduje się na 16 chromosomie i jest kodowany przez 16 eksonów, obejmujących ok. 100 kb genomowego DNA [85].

E-kadheryna poprzez domenę wewnątrzkomórkową związana jest z β i α-kateniną, a więc pośrednio i z cytoszkieletem. Jest to połączenie niezbędne dla prawidłowej budowy tkanek, prawidłowej morfologii komórek, czy różnicowania komórkowego.



Rys. 3: Schemat interakcji pomiędzy kompleksami E-kadheryna/kateniny dwóch sąsiadujących komórek nabłonkowych.

Morfogeneza tak różnych elementów organizmu jak: płuca, mieszki włosowe czy, zęby jest inicjowana w warstwie komórek pnia, które zmieniają swoją polaryzację, tworząc struktury zawiązków organów. Dzieje się tak na skutek równoczesnego odbioru przez komórkę pnia dwóch zewnętrznych sygnałów: białka Wnt stabilizującego β-kateninę, oraz białka noggin powodującego uruchomienie produkcji czynnika transkrypcyjnego Lef1 (Lymphoid Eenhancer-Binding Factor 1). β–katenina oddziaływuje z DNA i aktywuje kompleksy transkrypcyjne Lef1, co prowadzi do ujemnej regulacji genu *CDH1*, którego produkt białkowy, E-kadheryna, odpowiada za utrzymanie prawidłowej polaryzacji komórki oraz adhezję międzykomórkową [86]. Tak więc bez mechanizmu angażującego te dwa zewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, wyłączające na pewien czas prawidłowe działanie E-kadheryny w komórce, niemożliwa byłaby morfogeneza, zmiany w polaryzacji oraz różnicowanie komórek pnia. W 1995 roku opublikowano wyniki eksperymentu nad mutantami *CDH1* na modelu zwierzęcym. Efekt fenotypowy był analizowany w komórkach macierzystych w embrionach mysich, a mutacja dotyczyła usunięcia fragmentu sekwencji odpowiedzialnego za przyłączanie kationów wapnia - przez co połączenia adhezyjne zostały całkowicie zaburzone. Komórki macierzyste z tak zmutowaną *E-kadheryną* użyto w celu uzyskania myszy, które były nosicielami mutacji. Heterozygoty pod względem mutacji były płodne i z pozoru normalne. Homozygotyczne mutacje w embrionach były letalne, a polaryzacja ich komórek była całkowicie zaburzona [87].

W świetle powyższych informacji oczywistym jest, że zredukowana ekspresja E-kadheryny jest jednym z głównych czynników związanych z dysfunkcją adhezji międzykomórkowej, zaburzeniem hamowania kontaktowego komórek, rozwojem raka i wreszcie z występowaniem przerzutów. Postuluje się, że zmiany ekspresji lub funkcji *E-kadheryny* mogą być związane z częściową lub całkowitą redukcją przylegania potomnych komórek do nowotworowej komórki „macierzystej", co wiąże się z ich zwiększoną zdolnością do lokalnej inwazji [88].

W 1994 roku japońska grupa badawcza wykazała obecność mutacji *CDH1* w ludzkich, nowotworowych liniach komórkowych. Analizowano 10 linii, których rozrost był charakterystyczny dla komórek z zaburzonymi funkcjami adhezyjnymi, co objawiało się

między innymi upośledzeniem przylegania komórkowego. Można było przypuszczać, że część tych zaburzeń jest powiązana z obniżeniem ekspresji *E-kadheryny*. Wyniki były interesujące. W czterech liniach nie wykazano w ogóle mRNA *CDH1*. W następnych czterech liniach nie wykazano żadnych zmian w obrębie sekwencji, poziomu mRNA czy ekspresji białka. W pozostałych 2 liniach (MKN-45 i KATO III), które wywodziły się z ludzkiego raka żołądka, sekwencje mRNA wykazywały nieprawidłowości: mutacje znajdowały się w miejscach odpowiedzialnych za połączenia eksonów z intronami, co wiązało się z zaburzeniami *splicingu*. Dodatkowo, w obu przypadkach natywny allel nie został wykryty, co sugerowało jego inaktywację zgodnie z hipotezą *„two hits"* [89].

Dzięki powyższym informacjom, jak i na podstawie analizy występowania mutacji tego genu w rakach jajnika i endometrium, gdzie również występowało zjawisko wyłączania drugiego allela, gen *CDH1* zakwalifikowano do grupy supresorów nowotworu [90]. Rok później, przedstawiając badania nad zrazikowymi rakami sutka, Berx wykazał, że *CDH1* może odgrywać kluczową rolę jako silny supresor inwazji/nowotworu. Odnotowano również, że częściowa lub całkowita utrata ekspresji tego supresora, jest skorelowana ze stopniem złośliwości guza [91].

Produkt białkowy genu *CDH1* u człowieka nie zawsze jest prawidłowy. Zahamowanie czynności E-kadheryny jest najczęściej następstwem mutacji somatycznej, lub skutkiem hipermetylacji promotora tego genu [92]. Stwierdzono, że w porównaniu do raków żołądka typu jelitowego, w rozlanych rakach żołądka ekspresja E-kadheryny ulega obniżeniu [93]. Również w rakach żołądka typu mieszanego komponenta rozlana wykazuje nietypową ekspresję E-kadheryny.

Wykazano na transgenicznym modelu mysim, że utrata ekspresji *CDH1* jest związana z przejściem wysoko zróżnicowanego gruczolaka w inwazyjnego raka, a związana z mutacjami *CDH1* utrata funkcji adhezyjnych jest przyczyną, a nie konsekwencją tak ukierunkowanej progresji nowotworu [94].

Jak wspomniano, *E-kadheryna* odgrywa najbardziej istotną rolę w patologii raków przewodu pokarmowego, czy zrazikowego raka sutka. Przyjmuje się, że obniżona ekspresja E-kadheryny to zły marker prognostyczny w wielu typach nowotworów złośliwych:

upośledzona ekspresja białka (również związana z hipermetylacją promotora) jest związana z występowaniem raków o agresywnym przebiegu, niezróżnicowanych lub słabo zróżnicowanych [95, 96]. W niektórych typach nowotworów E-kadheryna może być zastępowana przez N-kadherynę, co wiąże się ze zwiększeniem stopnia inwazyjności komórek nowotworowych [97].

Mutacje *CDH1* są najczęstszymi mutacjami somatycznymi w rozlanych rakach żołądka, co lokuje je pod względem częstości występowania przed stosunkowo nielicznymi mutacjami β-*kateniny* i *APC*. Przyjmuje się, że do 56% przypadków sporadycznych, rozlanych raków żołądka wykazuje mutacje *CDH1* [39]. Mutacje rodzinne *CDH1* występują częściej w niskozróżnicowanych rakach żołądka.

Do mutacji *E-kadheryny* co do których nie ma wątpliwości, ze ich efektem jest powstanie nieprawidłowo działającego białka, zalicza się: mutacje skracające białko - związane z pojawieniem się kodonu stop w obrębie któregokolwiek z eksonów, mutacje zmiany ramki odczytu, oraz mutacje upośledzające *splicing*, występujące w sąsiedztwie lub w obrębie miejsca donorowo-akceptorowego: AG/GT (AG/GU). W przeciwieństwie do genów kodujących inne kadheryny, w *E-kadherynie* miejsca połączeń ekson-intron są wysoce konserwatywne [39].

Na podstawie przeprowadzonych badań nad rakiem jelita grubego, uważa się, że w tym typie nowotworu nie ma żadnego związku pomiędzy występowaniem mutacji *CDH1* a obniżeniem ekspresji kodowanego przez ten gen białka [98].

Poza mutacjami, istnieje kilka molekularnych mechanizmów inaktywacji E-kadheryny. Oprócz hipermetylacji promotora, występuje również inaktywacja na drodze interakcji ze Snai1 (represora transkrypcji), ujemnej, postranslacyjnej regulacji poziomu białka poprzez fosforylację katenin, bądź poprzez związaną ze szlakiem receptora kinaz tyrozynowych degradację E-kadheryny na drodze endocytozy [39].

W tym roku doniesiono o kolejnej możliwości – po raz pierwszy opisano w raku żołądka inaktywację drugiego allela u członków rodziny HDGC poprzez delecję, która zaszła w guzie, wewnątrz sekwencji kodującej *CDH1* [99]. Należy wspomnieć, iż inaktywacja

natywnego allela *CDH1* spowodowana zjawiskiem utraty heterozygotyczności była opisywana do tej pory w wielu typach nowotworów, między innymi w raku sutka, czy raku pęcherza moczowego. Jednak w rozlanych rakach żołądka mechanizm ten występuje niezwykle rzadko i jest zastąpiony hipermetylacją regionu promotorowego *E-kadheryny*.

Transkrypcja mysiej *E-kadheryny* jest pod kontrolą silnego represora *Snai1* (homologa *SNAI1* u *Drosophila*, czynnika transkrypcyjnego z motywem palca cynkowego), który oddziaływuje na promotor mysiej *E-kadheryny*. Tak więc, zaburzenia w działaniu represora *Snai1* mogą przyczyniać się do zaburzeń ekspresji *E-kadheryny* [100]. W obrębie regionu promotorowego *CDH1* występują trzy sekwencje typu E-box, współdziałające w procesie obniżania poziomu ekspresji *CDH1* przez *Snai1* [101]. Związana z nieprawidłowym działaniem *Snai1* utrata ekspresji *E-kadheryny* była obserwowana w wielu epitelialnych mysich liniach komórkowych, gdzie odnotowano wysoką ekspresję mRNA *Snai1*, przy jednocześnie zredukowanej ekspresji *E-kadheryny*. Należy zaznaczyć, że te linie komórkowe charakteryzowały się wysoką inwazyjnością oraz skłonnością do tworzenia przerzutów, gdy tymczasem w liniach gdzie komórki zachowywały się „łagodnie" poziomy ekspresji *Snai1* oraz *E-kadheryny* były prawidłowe [100]. Dodatkowo zaobserwowano, że redukcja poziomu *Snai1* wpływa na odtwarzanie mRNA oraz białka E-kadheryny [101].

Poza rakiem żołądka ujemną regulację poziomu E-kadheryny oraz towarzyszących katenin obserwowano w wielu nowotworach złośliwych. W komórkach czerniaka, indukcja endoteliny-1 za pomocą promieniowania UV, poprzez jej receptor ETRB, prowadzi to do kaskadowej aktywacji kaspazy-8, nie kierując jednak komórki na szlak apoptozy. Endotelina-1 odpowiada również za tworzenie przejściowych kompleksów kaspazy-8 z E-kadheryną i kateninami. Ten szlak biochemiczny uwidacznia kolejny mechanizm rozwoju nowotworu złośliwego na drodze inaktywacji E-kadheryny [102].

W raku jelita grubego występuje bardzo ciekawy mechanizm akceleracji zdolności migracyjnych komórek nowotworowych, w który zaangażowane jest nieprawidłowo skrócone białko APC, oddziaływujące na połączenia komórkowe, za które odpowiada E-kadheryna. Nadekspresja ASEF (APC-Stimulated G nucleotide exchange factor) powoduje redukcję adhezji międzykomórkowej [103].

E-kadheryna odgrywa również ważną rolę w infekcji związanej z zanieczyszczeniem żywności pałeczką *Listeria monocytogenes*. Wytwarza ona patogen internalinę, która oddziaływuje z receptorem infekowanej przez bakterię komórki ludzkiego epitelium. Tym receptorem komórki gospodarza, który wchodzi w interakcję z internaliną, umożliwiając bakterii inwazję, jest właśnie E-kadheryna [104].

Gen CDH1

Kodujący E-kadherynę gen *CDH1* został po raz pierwszy sklonowany w 1997 roku. Stwierdzono, że struktura tego genu bardzo przypomina inne kadheryny i jest on wysoce konserwatywny ewolucyjnie, wykazano duże podobieństwo sekwencji *CDH1* do kurzego *L-CAM.* W przypadku mysiej E-kadheryny podobieństwo do ludzkiej uwomoruliny, zarówno sekwencji nukleotydowej, jak aminokwasowej, wynosiło 80% [105]. U człowieka *CDH1* jest genem charakteryzującym się występowaniem wielu polimorfizmów [106].

CDH1 znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 16-go, w locus 16q22.1. Jest on złożony z 16 eksonów, obejmujących wraz z piętnastoma fragmentami intronowymi ok. 100 kb genomowego DNA.

Gen ten zawiera 2,6 kb sekwencji kodującej białko E-kadherynę [39]. Sekwencja kodująca to stosunkowo krótkie eksony (115-2245 bp) i ogromnie zróżnicowane pod względem długości sekwencje intronowe: gdzie najkrótszy intron 4 składa się z 120 bp, natomiast olbrzymi intron 2 ma aż 65 kb długości [107].

W poniższej tabeli przedstawiono informacje o długości poszczególnych eksonów *CDH1*:

EKSON	DŁUGOŚĆ (bp)
1	171
2	115
3	224
4	144
5	156
6	145
7	176
8	129
9	183
10	245
11	146
12	225
13	228
14	131
15	144
16	2245

Tab. 2: Długości (bp) poszczególnych eksonów genu *CDH1*.

Najdłuższy, bo zawierający 2269 bp ekson 16 *CDH1*, prawie wyłącznie koduje niezwykle długi, nie podlegający translacji region na końcu 3'. Obszary poly(T) i poly(A) wzdłuż tego regionu mogą być bardzo podatne na występowanie błędów replikacyjnych, które wpływają na mRNA E-kadheryny, zaburzając drugorzędową strukturę oraz wpływając negatywnie na stabilność tego białka.

W *CDH1* - jak przystało na gen supresorowy, do wyłączenia genu, czego efektem jest karcynogeneza, musi dojść na obydwóch allelach, zgodnie z hipotezą *„two hits"* Knudson'a. Poniżej przedstawiono „dziką" sekwencję genu *CDH1:* na podstawie sekwencji mRNA genu *CDH1* nr Z13009 z banku genów NCBI/OMIM *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)*

```
   1 agtggcgtcg gaactgcaaa gcacctgtga gcttgcggaa gtcagttcag actccagccc
  61 gctccagccc ggcccgaccc gaccgcaccc ggcgcctgcc ctcgctcggc gtccccggcc
 121 agccatgggc ccttggagcc gcagcctctc ggcgctgctg ctgctgctgc aggtctcctc
 181 ttggctctgc caggagccgg agccctgcca ccctggcttt gacgccgaga gctacacgtt
 241 cacggtgccc cggcgccacc tggagagagg ccgcgtcctg ggcagagtga attttgaaga
 301 ttgcaccggt cgacaaagga cagcctattt ttccctcgac acccgattca aagtgggcac
 361 agatggtgtg attacagtca aaaggcctct acggtttcat aacccacaga tccatttctt
 421 ggtctacgcc tgggactcca cctacagaaa gttttccacc aaagtcacgc tgaatacagt
 481 ggggcaccac caccgccccc cgccccatca ggcctccgtt tctggaatcc aagcagaatt
 541 gctcacattt cccaactcct ctcctggcct cagaagacag aagagagact gggttattcc
 601 tcccatcagc tgcccagaaa atgaaaaagg cccatttcct aaaaacctgg ttcagatcaa
 661 atccaacaaa gacaaagaag gcaaggtttt ctacagcatc actggccaag gagctgacac
 721 acccccctgtt ggtgtcttta ttattgaaag agaaacagga tggctgaagg tgacagagcc
 781 tctggataga gaacgcattg ccacatacac tctcttctct cacgctgtgt catccaacgg
 841 gaatgcagtt gaggatccaa tggagatttt gatcacggta accgatcaga atgacaacaa
 901 gcccgaattc acccaggagg tctttaaggg gtctgtcatg gaaggtgctc ttccaggaac
 961 ctctgtgatg gaggtcacag ccacagacgc ggacgatgat gtgaacacct acaatgccgc
1021 catcgcttac accatcctca gccaagatcc tgagctccct gacaaaaata tgttcaccat
1081 taacaggaac acaggagtca tcagtgtggt caccactggg ctggaccgag agagtttccc
1141 tacgtatacc ctggtggttc aagctgctga ccttcaaggt gaggggttaa gcacaacagc
1201 aacagctgtg atcacagtca ctgacaccaa cgataatcct ccgatcttca atcccaccac
1261 gtacaagggt caggtgcctg agaacgaggc taacgtcgta atcaccacac tgaaagtgac
1321 tgatgctgat gcccccaata ccccagcgtg ggaggctgta tacaccatat tgaatgatga
1381 tggtggacaa tttgtcgtca ccacaaatcc agtgaacaac gatggcattt tgaaaacagc
1441 aaagggcttg gattttgagg ccaagcagca gtacattcta cacgtagcag tgacgaatgt
1501 ggtacctttt gaggtctctc tcaccacctc cacagccacc gtcaccgtgg atgtgctgga
1561 tgtgaatgaa gcccccatct ttgtgcctcc tgaaaagaga gtggaagtgt ccgaggactt
1621 tggcgtgggc caggaaatca catcctacac tgcccaggag ccagacacat ttatggaaca
1681 gaaaataaca tatcggattt ggagagacac tgccaactgg ctggagatta atccggacac
1741 tggtgccatt tccactcggg ctgagctgga cagggaggat tttgagcacg tgaagaacag
1801 cacgtacaca gccctaatca tagctacaga caatggttct ccagttgcta ctggaacagg
1861 gacacttctg ctgatcctgt ctgatgtgaa tgacaacgcc cccataccag aacctcgaac
1921 tatattcttc tgtgagagga atccaaagcc tcaggtcata aacatcattg atgcagacct
1981 tcctcccaat acatctccct tcacagcaga actaacacac ggggcgagtg ccaactggac
2041 cattcagtac aacgacccaa cccaagaatc tatcattttg aagccaaaga tggccttaga
2101 ggtgggtgac tacaaaatca atctcaagct catggataac cagaataaag accaagtgac
```

2161 caccttagag gtcagcgtgt gtgactgtga aggggccgcc ggcgtctgta ggaaggcaca

2221 gcctgtcgaa gcaggattgc aaattcctgc cattctgggg attcttggag gaattcttgc

2281 tttgctaatt ctgattctgc tgctcttgct gtttcttcgg aggagagcgg tggtcaaaga

2341 gcccttactg cccccagagg atgacacccg ggacaacgtt tattactatg atgaagaagg

2401 aggcggagaa gaggaccagg actttgactt gagccagctg cacaggggcc tggacgctcg

2461 gcctgaagtg actcgtaacg acgttgcacc aaccctcatg agtgtccccc ggtatcttcc

2521 ccgccctgcc aatcccgatg aaattggaaa ttttattgat gaaaatctga aagcggctga

2581 tactgacccc acagccccgc cttatgattc tctgctcgtg tttgactatg aaggaagcgg

2641 ttccgaagct gctagtctga gctccctgaa ctcctcagag tcagacaaag accaggacta

2701 tgactacttg aacgaatggg gcaatcgctt caagaagctg gctgacatgt acggaggcgg

2761 cgaggacgac taggggactc gagagaggcg ggccccagac ccatgtgctg ggaaatgcag

2821 aaatcacgtt gctggtggtt tttcagctcc cttcccttga gatgagtttc tggggaaaaa

2881 aaagagactg gttagtgatg cagttagtat agctttatac tctctccact ttatagctct

2941 aataagtttg tgttagaaaa gtttcgactt atttcttaaa gctttttttt ttttcccatc

3001 actctttaca tggtggtgat gtccaaaaga tacccaaatt ttaatattcc agaagaacaa

3061 ctttagcatc agaaggttca cccagcacct tgcagatttt cttaaggaat tttgtctcac

3121 ttttaaaaag aaggggagaa gtcagctact ctagttctgt tgttttgtgt atataatttt

3181 ttaaaaaaaa tttgtgtgct tctgctcatt actacactgg tgtgtccctc tgccttttt

3241 ttttttttta agacagggtc tcattctatc ggccaggctg gagtgcagtg gtgcaatcac

3301 agctcactgc agccttgtcc tcccaggctc aagctatcct tgcacctcag cctcccaagt

3361 agctgggacc acaggcatgc accactacgc atgactaatt ttttaaatat ttgagacggg

3421 gtctccctgt gttacccagg ctggtctcaa actcctgggc tcaagtgatc ctcccatctt

3481 ggcctcccag agtattggga ttacagacat gagccactgc acctgcccag ctccccaact

3541 ccctgccatt ttttaagaga cagtttcgct ccatcgccca ggcctgggat gcagtgatgt

3601 gatcatagct cactgtaacc tcaaactctg gggctcaagc agttctccca ccagcctcct

3661 ttttattttt ttgtacagat ggggtcttgc tatgttgccc aagctggtct taaactcctg

3721 gcctcaagca atccttctgc cttggccccc caaagtgctg ggattgtggg catgagctgc

3781 tgtgcccagc ctccatgttt taatatcaac tctcactcct gaattcagtt gctttgccca

3841 agataggagt tctctgatgc agaaattatt gggctctttt agggtaagaa gtttgtgtct

3901 ttgtctggcc acatcttgac taggtattgt ctactctgaa gacctttaat ggcttccctc

3961 tttcatctcc tgagtatgta acttgcaatg ggcagctatc cagtgacttg ttctgagtaa

4021 gtgtgttcat taatgtttat ttagctctga agcaagagtg atatactcca ggacttagaa

4081 tagtgcctaa agtgctgcag ccaaagacag agcggaacta tgaaaagtgg gcttggagat

4141 ggcaggagag cttgtcattg agcctggcaa tttagcaaac tgatgctgag gatgattgag

4201 gtgggtctac ctcatctctg aaaattctgg aaggaatgga ggagtctcaa catgtgtttc

4261 tgacacaaga tccgtggttt gtactcaaag cccagaatcc ccaagtgcct gcttttgatg

4321 atgtctacag aaaatgctgg ctgagctgaa cacatttgcc caattccagg tgtgcacaga

```
4381 aaaccgagaa tattcaaaat tccaaatttt ttcttaggag caagaagaaa atgtggccct
4441 aaaggggggtt agttgagggg tagggggtag tgaggatctt gatttggatc tcttttttatt
4501 taaatgtgaa tttcaacttt tgacaatcaa agaaaagact tttgttgaaa tagctttact
4561 gtttctcaag tgttttggag aaaaaaatca accctgcaat cacttttttgg aattgtcttg
4621 atttttcggc agttcaagct atatcgaata tagttctgtg tagagaatgt cactgtagtt
4681 ttgagtgtat acatgtgtgg gtgctgataa ttgtgtattt tctttgggggg tggaaaagga
4741 aaacaattca agctgagaaa agtattctca aagatgcatt tttataaatt ttattaaaca
4801 attttgttaa accat aaaaa aaaaaaaa
```

Mutacje germinalne CDH1

Opisano kilka dziedzicznych zespołów genetycznych, związanych z predyspozycją do zachorowań na raka żołądka. Z pewnością, jednym z najbardziej spektakularnych przykładów jest analiza zachorowań w rodzinie Napoleona Bonaparte [108].

Źródła podają, że nie więcej niż 3% raków żołądka może mieć podłoże dziedziczne [95]. Wśród nich aż ¼ jest związana z mutacjami germinalnymi w obrębie genu *CDH1* [109].

Do tej pory opisano wiele interesujących przypadków dziedzicznej predyspozycji w kierunku raka żołądka, związanych z zespołem HDGC, gdzie wykazano mutacje linii germinalnej, które upośledzają pracę białka E-kadheryny. W literaturze opisano dotychczas 45 różnych mutacji germinalnych *CDH1* u ponad 100 rodzin na całym świecie. Zwykle są one związane ze skróceniem produktu białkowego, najczęściej domeny sygnałowej [110]. Interesującym jest fakt, że w sporadycznych rakach żołądka tego typu mutacje nie występują [111].

HDGC jest to zespół autosomalnie-dominujący [39]. Zgodnie z mendlowskimi regułami dziedziczenia istnieje 50% prawdopodobieństwa, iż poszczególni członkowie rodziny HDGC odziedziczą germinalną mutację *E-kadheryny*. Przyjmuje się, że mutacje *CDH1* w rodzinach spełniających kryteria HDGC są w 80% mutacjami, których efektem jest skrócone białko [112]. Penetracja tego genu w rodzinach HDGC wynosi 80%, a przeciętny wiek wystąpienia raka żołądka to 37 lat [113]. Najmłodszy zgon odnotowano w rodzinach

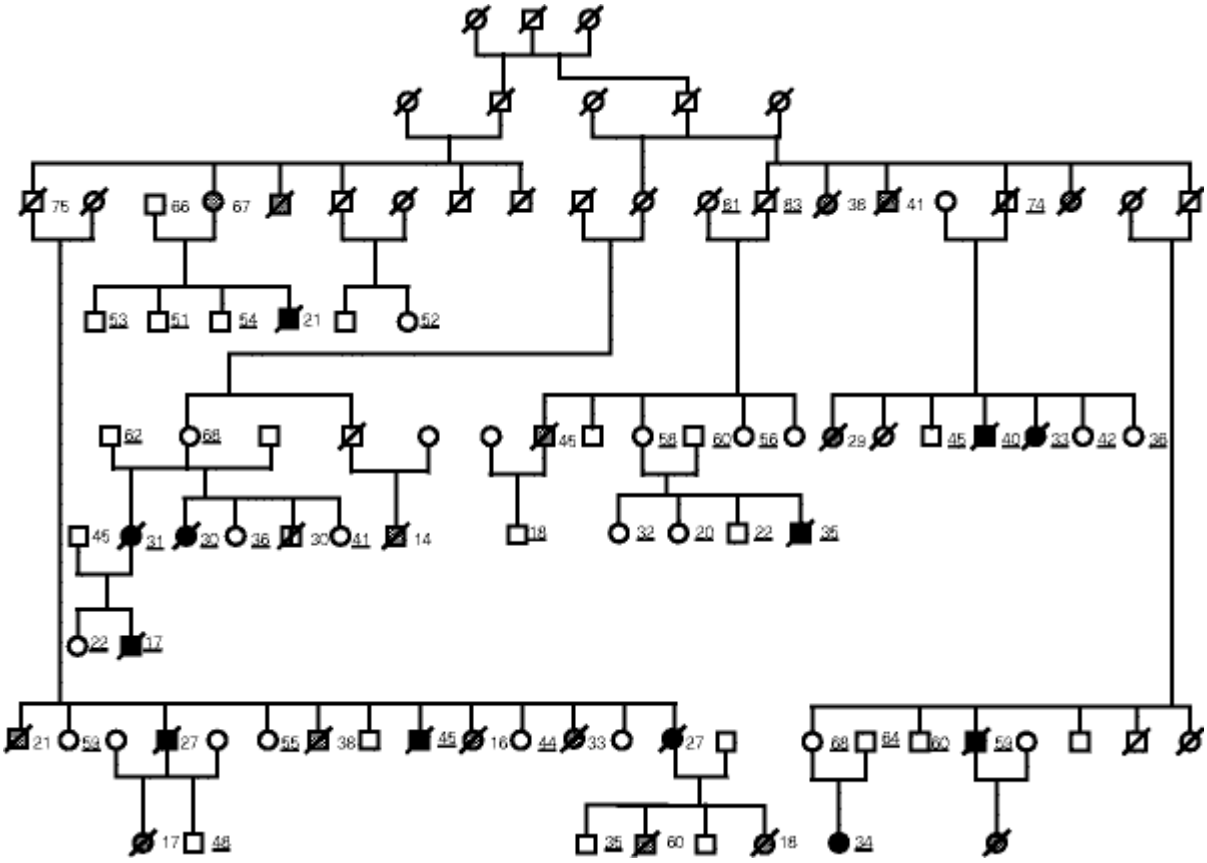
HDGC w wieku 14 lat, średni wiek zgonów wynosi 40 lat i jest on znacznie niższy, niż w przypadku sporadycznych raków żołądka [114].

Odziedziczenie mutacji *CDH1* związanej z występowaniem nieprawidłowego białka nie jest jednak wyznacznikiem zachorowania na raka żołądka, ale świadczy o predyspozycji w kierunku tej choroby. Huntsman podaje, że rozlany rak żołądka rozwija się u ¾ nosicieli mutacji w genie *CDH1* [115]. Predyspozycja ta charakteryzuje się efektem kumulatywnym, dla przykładu: w wieku 50-ciu lat istnieje 21% ryzyka, że u mężczyzny rozwinie się rak żołądka, u kobiety prawdopodobieństwo w tym wieku jest znacznie wyższe i wynosi 46%. Analogicznie, w wieku 80-ciu lat wynosi ono u mężczyzn ok. 67%, u kobiet zaś 83% [110, 116]. Ponadto, u kobiet z zespołem HDGC istnieje 20-40% ryzyko wystąpienia zrazikowego raka sutka w ciągu całego życia [117]. Oprócz zrazikowych raków sutka mutacje germinalne *CDH1* wiąże się również z występowaniem w rodzinach HDGC raków jelita grubego i prostaty [118].

Mutacje germinalne w genie *CDH1* po raz pierwszy opisano na przykładach kilku rodzin maoryskich, w których w kolejnych pokoleniach występowały rozlane raki żołądka w młodym wieku. Do początku 2005 roku podobnych rodzin na całym świecie zidentyfikowano do tej pory 102, jednak na bieżąco pojawiają się coraz to nowe doniesienia o kolejnych rodzinach i wariantach allelicznych genu. Członkom rodziny, którzy mimo, że jeszcze nie chorowali, a charakteryzują się mutacjami blokującymi prawidłową pracę białka E-kadheryny, proponuje się profilaktyczną, całkowitą gastrektomię [113].

Mutacje germinalne w obrębie *CDH1*, związane z rodzinnymi zachorowaniami na rozlanego raka żołądka, opisał po raz pierwszy w 1998 roku Guilford. Wykazał on mutacje tego genu u trzech rodzin maoryskich z Nowej Zelandii obciążonych rozlanymi rakiem żołądka. Były to raki pojawiające się przed 40-stym rokiem życia, nisko zróżnicowane, zaawansowane w momencie wykrycia. W jednej z rodzin opisano mutację związaną z podstawieniem G->T w eksonie 7, w miejscu będącym donorem *splicingu*, co prowadziło do powstania skróconego, nieprawidłowego transkryptu białkowego. W kolejnych dwóch przypadkach odnotowano odpowiednio pojawienie się kodonu stop w środku eksonu 13 oraz mutację związaną z przesunięciem ramki odczytu w eksonie 15. Badania te po raz

pierwszy dowiodły związku występowania rozlanych, dziedzicznych raków żołądka z mutacjami w obrębie genu *CDH1* [119].



Rys. 4: Drzewo genealogiczne rodziny maoryskiej z występującym rozlanym rakiem żołądka u podłoża którego występowała mutacja w genie *CDH1* wg Guilford et al. [119].

Zaledwie miesiąc później opublikowano pierwsze europejskie wyniki badań nad dziedzicznymi mutacjami w genie *E-kadheryny*, gdzie wykazano kolejne mutacje germinalne *CDH1*. Badania przeprowadziły wspólnie dwie grupy z Wielkiej Brytanii i Portugalii. Przeanalizowano przypadki raków żołądka u 18-stu europejskich rodzin [120].

W 1999 roku wykazano bezpośredni związek mutacji w *CDH1* z predyspozycją do występowaniem rozlanego raka żołądka oraz raków jelita grubego. Badania te dotyczyły 8 irlandzkich i brytyjskich rodzin z rozlanymi rakami żołądka. Kryteria doboru były następujące:

1. W rodzinie występowały co najmniej 2 rozlane raki żołądka u krewnych pierwszego stopnia, a co najmniej jeden z nich zachorował poniżej 50-go roku życia.
2. Lub przypadki występowania w rodzinie co najmniej trzech zachorowań na raka żołądka, bez względu na wiek.

Z ośmiu rodzin, u dwóch (25%) zidentyfikowano nie opisywane wcześniej mutacje germinalne. Pierwsza z nich typu nonsens dotyczyła angielskiej rodziny, w której w kolejnych pokoleniach rak żołądka był zdiagnozowany u poszczególnych w wieku: 27, 50 i 38 lat. Zmiana dotyczyła tranzycji G->A, w 59 nukleotydzie w eksonie 2, co powodowało zamianę trypsyny (20) na kodon stop. U następnej rodziny, gdzie wykryto germinalną mutację typu *splice-site* związaną z tranzycją A->G w miejscu akceptorowym *splicingu* w pozycji EX2–2 a ekson kończył się na 49 nukleotydzie. Efektem obu mutacji było więc powstawanie nieprawidłowo skróconej E-kadheryny, a skrócenie białka zachodziło w obrębie domeny peptydu sygnałowego, która jest odcinana od strony N-terminalnej dojrzałego białka. W jednej z rodzin opisano również zjawisko niepełnej penetracji genu oraz rozwój w wieku 30 lat raka jelita grubego u nosiciela mutacji. Badania te nie tylko wykazały, że dziedziczne występowanie mutacji *CDH1* nie jest jedynie ograniczone do populacji maoryskiej, udowodniły, że germinalne mutacje *CDH1* mogą mieć związek z wcześnie występującymi rakami jelita grubego. Rzuciły też nowe światło na częstość występowania germinalnych mutacji tego genu w rodzinach HDGC, która wynosi 25% [121]. Nieco większy odsetek mutacji w rodzinach HDGC wykazali w badaniach z 2002 roku Portugalczycy. Przeanalizowano 11 rodzin obciążonych rakami żołądka. U 34,6% rodzin HDGC znaleziono mutacje germinalne *CDH1* [122].

Przeprowadzone w Korei badania nad rakiem żołądka, który jest w tym kraju najczęściej występującym nowotworem, pozwoliły oszacować odsetek mutacji germinalnych *CDH1* u koreańskich rodzin z HDGC, który wynosił aż 40% [123].

Odpowiedzią australijskich badaczy na te wyniki były rozszerzone badania Guilforda nad kolejnymi rodzinami wykazującymi predyspozycję w kierunku rozlanego raka żołądka. Analizowano mutacje germinalne *CDH1* u pięciu takich rodzin, oraz u jednej rodziny z

rozlanymi rakami żołądka i wcześnie występującymi rakami sutka. We wszystkich sześciu przypadkach wykazano obecność mutacji wpływającej negatywnie na białko, wszystkie mutacje były heterozygotami. Nie wykazano żadnych „gorących miejsc" występowania mutacji [124].

Spowodowane różnymi szacunkami zamieszanie w ocenie odsetka mutacji *CDH1* w rodzinach HDGC postanowiła uporządkować wiodąca w tych badaniach grupa z Portugalii. Według tych badaczy, rodziny, w których występuje rozlany rak żołądka to zarówno spełniające ścisłe kryteria rodziny HDGC, których do tej pory zidentyfikowano 102, oraz rodziny FDGC, które nie spełniają ostrych kryteriów Konsorcjum IGCLC (*International Gastric Cancer Linkage Consortium*) - jest ich 87 na całym świecie. Odsetek wykrytych mutacji *CDH1* w obu tych grupach wynosi odpowiednio: 25-40% i 8,0% [112].

W 2001 roku grupy badawcze z Kanady i Portugalii zaproponowały algorytm postępowania w przypadku wykrycia u pacjenta mutacji germinalnej w obrębie *CDH1*. Algorytm ten uwzględniał wstępne badania przesiewowe, dokładną analizę mutacji w genie, analizę histopatologiczną wycinków błony śluzowej oraz postępowanie chirurgiczne związane z profilaktyczną gastrektomią u młodych osób, u których wykryto mutację manifestującą się fenotypowo „kikutem białkowym" E-kadheryny. Zgodnie z tymi wytycznymi rutynową diagnostykę endoskopową proponuje się tym pacjentom co 6-12 miesięcy, bez względu na wiek, począwszy od momentu wykrycia mutacji, bądź w wieku o 5-10 lat niższym, niż najmłodsze dotychczasowe zachorowanie w rodzinie [125]. Potwierdzeniem celowości wykonania tak poważnego zabiegu, jakim jest całkowita gastrektomia, u młodych nosicieli mutacji, było odnajdywanie u wszystkich osób poddanych profilaktycznej gastrektomii, drobnych skupisk komórek sygnetowatych rozrzuconych na obszarze całego żołądka [115]. Liczba tego typu ognisk nie przekracza zazwyczaj 200 u jednej osoby [39]. Informacja ta jest bardzo ważna zarówno dla lekarzy, jak i dotkniętych mutacją członków rodzin: wielokrotnie bowiem pojawiały się doniesienia o fałszywie negatywnych wynikach badania endoskopowego u nosicieli mutacji. W 2001 roku Chun opisał rodzinę z bardzo silnie udokumentowaną historią zachorowań na raka żołądka o rozlanym typie histologicznym, u której wykryto mutację germinalną w pozycji 1558, gdzie występowała

insercja C - co powodowało oczywiście przesunięcie ramki odczytu. Wszystkie pięć osób, u których wykryto mutację poddano badaniom endoskopowym, które nie wykazały jakichkolwiek zmian związanych z nowotworzeniem, zarówno w obrazie makroskopowym, jak i w przypadku pobranych do analizy histopatologicznej wycinków. Pomimo tego, wszyscy nosiciele mutacji w rodzinie zostali poddani profilaktycznej gastrektomii. Usunięte tkanki bardzo dokładnie przebadano. U wszystkich osób poddanych gastrektomii, pomimo nie budzącego niepokoju wyniku badania endoskopowego, w wielu obszarach żołądka odnaleziono skupiska komórek sygnetowatych w obrębie błony śluzowej [126]. Analogiczne sytuacje były od tej pory często opisywane.

Kolejnym krokiem naprzód w badaniach mutacji genu *E-kadheryny* wśród rodzin obciążonych rakami żołądka są najnowsze badania *International Gastric Cancer Linkage Consortium*, którego trzon tworzą naukowcy z Kanady i Portugalii. Na ich podstawie opublikowano doniesienie o kolejnej grupie rodzin, dla której Konsorcjum rekomenduje bardzo silne wskazania do analizy mutacji w genie *CDH1*. Są to rodziny z występującymi u ich członków rakami żołądka, również typu jelitowego, w skrócie określane jako rodziny FGC (HGC). Rodziny te były kwalifikowane do badań na podstawie występowania wśród ich członków co najmniej jednego rozlanego raka żołądka poniżej 50-go roku życia. Pozostałe raki żołądka pod względem histologicznym były typu jelitowego. Wykonano analizę mutacji *CDH1* u 42 takich rodzin. Odsetek znalezionych mutacji *CDH1* w rodzinach FGC był niespodziewanie wysoki i wynosił 48%. Zarówno w rodzinach FGC z mutacjami germinalnymi *E-kadheryny*, jak i w rodzinach nie wykazujących mutacji obserwowano przypadki zrazikowych raków sutka. Wskazuje to na konieczność poszukiwań innych genów mogących mieć związek z występowaniem raków żołądka czy sutka w rodzinach HGC [127].

Mutacje CDH1 w sporadycznych rakach żołądka

Szacuje się, że do 56% przypadków sporadycznych, rozlanych raków żołądka wykazuje mutacje w obrębie *E-kadheryny* [39].

W 1998 roku zespół Berx'a opisał 69 mutacji somatycznych genu *CDH1*. Wśród nich zaledwie kilka dotyczyło mutacji zmiany sensu, natomiast większość była mutacjami typu *splice-site* oraz powodującymi skrócenie białka insercjami, delecjami czy mutacjami typu nonsens. Główną różnicą pomiędzy typami mutacji w rozlanych rakach żołądka, a zmianami w zrazikowych rakach sutka było występowanie w tych rakach dwóch różnych typów zmian – odpowiednio: zmian związanych z zaburzeniami *splicingu* w rozlanych rakach żołądka oraz mutacji powodujących powstanie kikuta białkowego w zrazikowych rakach sutka, czemu często towarzyszyło zjawisko utraty heterozygotyczności [111].

Zaobserwowano, że charakterystyczne dla mutacji germinalnych *CDH1* mutacje związane z powstaniem nie funkcjonalnego kikuta białkowego (najczęściej w obrębie domeny sygnałowej) w sporadycznych rakach żołądka nie występują [111].

Hipermetylacja regionu CpG promotora CDH1

Wśród wielu mechanizmów molekularnych powodujących nieprawidłowości działania E-kadheryny, należy wymienić najczęstszy sposób inaktywacji genu *CDH1* w rakach żołądka - poprzez metylację jego promotora. Hipermetylacja regionów CpG w obrębie fragmentów genów, gdzie w warunkach fizjologicznych metylacja nie zachodzi, wiąże się utratą transkrypcji [128]. Hipermetylacja promotorów odgrywa bardzo ważną rolę jako dodatkowa droga regulacji ekspresji, alternatywna do zaburzeń związanych z inaktywacją genów, związaną na przykład z negatywnym wpływem mutacji.

Metylacja cytozyn w obrębie wysp CpG jest często obserwowana jako zjawisko fizjologiczne, w tak powszechnych mechanizmach epigenetycznych, jak inaktywacja chromosomu X, czy procesach związanych ze starzeniem [129, 130].

Zmiana profilu metylacyjnego DNA jest efektem szerokiego spektrum zaburzeń epigenetycznych, zachodzących w procesie nowotworzenia. Zarówno hipometylacja w obrębie genomu, jak i selektywna hipermetylacja sekwencji DNA są bardzo częstym zjawiskiem w wielu typach nowotworów. Hipermetylacja promotorów zachodzi szczególnie często w obrębie genów takich jak: *CDH1, p16, p15, p14, p73, APC, BRCA1, hMLH1, GSTP1, MGMT, TIMP3* oraz *DAPK* [131]. W obrębie poszczególnych typów nowotworów występują

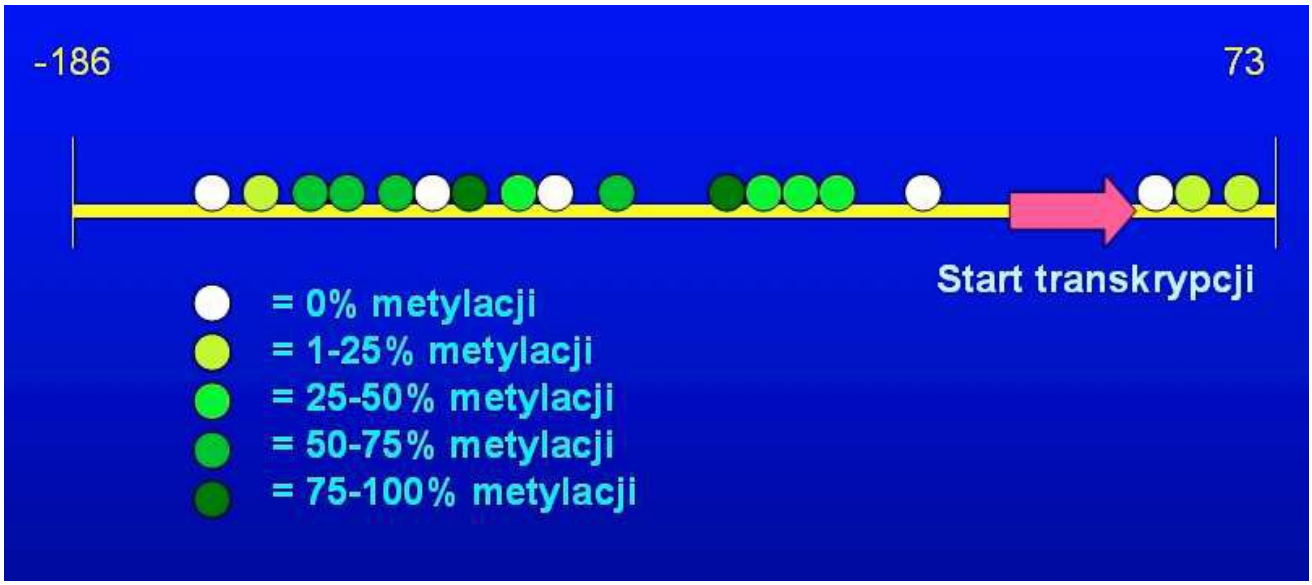
unikalne, charakterystyczne wzory i kombinacje metylacji promotorów poszczególnych genów, a cześć genów jest hipermetylowana swoiście dla określonych typów raka [131].

Rak żołądka jest jednym z nowotworów, które wykazują wysoką częstość nieprawidłowej metylacji wysp CpG w obrębie bardzo wielu genów. Hipermetylacja promotora *CDH1* jest postrzegana jako kluczowy etap w procesie karcynogenezy w nisko zróżnicowanych, rozlanych rakach żołądka [39].

Należy wspomnieć, że ten epigenetyczny mechanizm wyłączania genu może być procesem odwracalnym [132]. Ponieważ przypuszcza się, że hipermetylacja promotora genu kodującego E-kadherynę jest kluczowym etapem karcynogenezy w nisko zróżnicowanych, rozlanych rakach żołądka, duże nadzieje wiąże się z badaniami nad czynnikami demetylującymi, jako potencjalnymi czynnikami anty-nowotworowymi [39].

Dopiero w 2000 roku zwrócono uwagę, że pacjenci z mutacjami germinalnymi *CDH1*, pod względem których byli heterozygotami, zapadają na raka żołądka, pomimo, że nie występuje u nich utrata heterozygotyczności w guzach. Obserwacja ta skłoniła badaczy do poszukiwania alternatywnej drogi inaktywacji genu, wykazując obecność metylacji w obrębie jego promotora w 3 z 6 badanych raków [133]. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, ze metylacja promotora genu *E-kadheryny* może być „drugim uderzeniem" w procesie rozwoju nowotworu, które wyłącza drugi allel zgodnie z hipotezą Knudson'a [47].

W badaniach nad rakiem żołądka wykazano, że poziom hipermetylacji promotorów genów *p16* i *hMLH1* systematycznie wzrasta wraz z przemianami w obrębie przechodzenia od stanu przewlekłego zapalenia błony śluzowej poprzez metaplazję, w kierunku gruczolaków i raków żołądka, co ciekawe, promotory tych genów na etapie zapalenia błony śluzowej żołądka nie są w ogóle zmetylowane. Wyniki te sugerują, że metylacja w obrębie regionów promotorów niektórych genów pojawia się na stosunkowo wczesnych etapach nowotworzenia, wykazując w kolejnych etapach tego procesu tendencję do nasilania się i kumulacji [134].



Rys. 5: Mapa metylacji CpG w obrębie promotora *CDH1* wg Machado et al. [135].

Graziano i Guilford szacują, że odsetek metylacji może wahać się, pomiędzy 40-80% przypadków [39]. Według portugalskich badaczy, 56% rozlanych raków żołądka wykazuje zjawisko hipermetylacji promotora *CDH1* [135]. W badaniach nad równoległą hipermetylacją promotorów kilku istotnych w karcynogenezie raka żołądka genów, w tym genów mutatorowych oraz *CDH1*, ta sama grupa badawcza donosi o hipermetylacji promotora *CDH1* w 51% wszystkich badanych sporadycznych rakach żołądka. W badaniach tych wykazano również zależność pomiędzy fenotypem MSI wysokiego stopnia czy diploidią komórek raka, a równoległą hipermetylacją badanych genów [133]. Portugalskie badania przynoszą jeszcze jedną, bardzo interesującą informację: 66,7% rozlanych raków żołądka wykazujących mutację charakteryzowało się hipermetylacją wyspy CpG promotora *E-kadheryny* [136].

Doniesienia Wheeler'a przynoszą nieco inny szacunek: 46% sporadycznych raków żołądka wykazywało hipermetylację promotora *CDH1* [137, 138]. W populacji japońskiej wynik ten był nieco wyższy i wynosił 52% [139].

Uważa się, że hipermetylacja promotora *CDH1* w rozlanych rakach żołądka wiąże się z niekorzystnym rokowaniem: wśród pacjentów, u których usunięto nowotwór, który przerzutował do okolicznych węzłów chłonnych, aż 67% pacjentów nie wykazujących

hipermetylacji promotora *CDH1* przeżyło ponad 5 lat. W przypadku pacjentów z nieprawidłowo zmetylowanym promotorem ponad pięcioletnie przeżycie zaobserwowano jedynie u 35% chorych [140].

W szerokim spektrum nowotworów złośliwych u człowieka, zaburzenia metylacji promotorów występują bardzo często, co jest najczęściej związane z utratą ekspresji genu. Jest to najpowszechniejsza przyczyna inaktywacji genu *CDH1* i poza rakami żołądka została opisana w wielu typach nowotworów [92, 141, 142]. Kluczową rolę metylacji promotora *E-kadheryny* zaobserwowano w obrębie szlaku karcynogenezy raka jelita grubego. Przypuszcza się, że ten epigenetyczny mechanizm inaktywacji *E-kadheryny* bezpośrednio wiąże się w rakach jelita grubego z rozwojem nowotworu oraz z przejściem od przewlekłego stanu zapalnego w kierunku raka. Z tego powodu metylacja promotora *CDH1* jest uważana za biomarker rozwoju raka u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [143].

Jak wspomniano, hipermetylacja promotora *CDH1* występuje również w innych rakach, jak rak sutka, wątroby, pęcherza moczowego czy jajnika [144, 145]. W raku jajnika wykazano hipermetylację promotora *CDH1* w 21% przypadków [146]. Bardzo podobny odsetek metylacji promotora tego genu obserwowano w przypadku raka pęcherza moczowego [147]. W rakach wątroby donoszono o 33% hipermetylowanych przypadków [148].

Interesujące doniesienie na temat metylacji promotora *CDH1* w raku krtani i jego przerzutach opublikował 2 lata temu polsko-niemiecki zespół, w którego skład wchodzili badacze z Akademii Medycznej we Wrocławiu. W rakach tych wykryto hipermetylację promotora *CDH1* w 40% przypadków, jednak w tkankach przerzutów odsetek ten był prawie dwukrotnie wyższy i wynosił 77% [149].

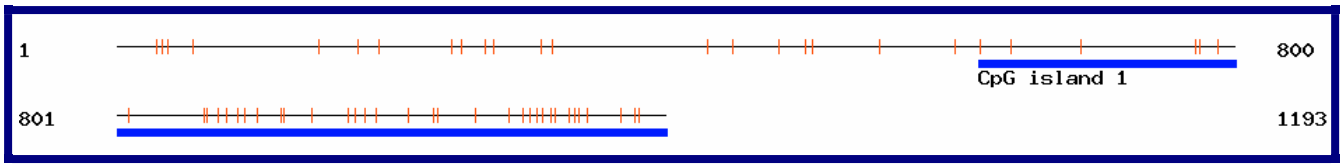
W nowotworach stromalnych przewodu pokarmowego (GISTs), odsetek ten wynosi 37%, a zjawisko hipermetylacji promotora *CDH1* jest istotnym czynnikiem predykcyjnym i jest wiązane z 5-cio letnim przeżyciem bez nawrotu choroby. U pacjentów wykazujących brak metylacji dotyczy ono 83% przypadków, u pacjentów ze zmetylowanym promotorem odsetek ten jest o 28% mniejszy [150].

Jednak metylacja promotora *CDH1* w nowotworach złośliwych nie jest regułą. W raku prostaty, zarówno linie komórkowe, jak i tkanka nowotworowa nie wykazywały zaburzeń w metylacji promotora *CDH1*, wykazując jednocześnie nieprawidłowości w metylacji promotorów innych genów [151].

Poniżej przedstawiono sekwencję regionu promotorowego *CDH1* (na podstawie banku genów OMIM). Na fioletowo zaznaczono kodon kodujący pierwszy aminokwas w białku - metioninę, na niebiesko – metylowane miejsca CpG:

```
   1 tctagaaaaa ttttttaaaa aattaggccg ctcgagcgag agtgcagtgg ctcacgcctg
  61 taatccaaca cttcaggagg ctgaagaggg tggatcacct gaggtcagga gttccagacc
 121 agcctggcca acatggtgaa accccgtctt gtactaaaaa tacaaaatta gccggtgtgg
 181 tggcacacgc ctgtagtccc agctactcaa taggctgaga caggagagtc tcttgaaccc
 241 ggcaggcgga ggttgcagtg agccgagatc gtgccactgc actccagcct gggcaagaca
 301 gagcgagact ccgtctcaaa aaatacaaac aaaacaaaca aacaaaaaat taggctgcta
 361 gctcagtggc tcatggctca cacctgaaat cctagcactt tgggaggcca aggcaggagg
 421 atcgcttcag cccaggagtt cgagaccagg ctgggcaata cagggagaca cagcgccccc
 481 actgcccctg tccgccccga cttgtctctc tacaaaaagg caaaagaaaa aaaaaattag
 541 cctggcgtgg tggtgtgcac ctgtactccc agctactaga gaggctgggg ccagaggacc
 601 gcttgagccc aggagttcga ggctgcagtg agctgtgatc gcaccactgc actccagctt
 661 gggtgaaaga gtgagcccca tctccaaaac gaacaaacaa aaaatcccaa aaaacaaaag
 721 aactcagcca agtgtaaaag ccctttctga tcccaggtct tagtgagcca ccggcggggc
 781 tgggattcga acccagtgga atcagaaccg tgcaggtccc ataacccacc tagaccctag
 841 caactccagg ctagagggtc accgcgtcta tgcgaggccg ggtgggcggg ccgtcagctc
 901 cgccctgggg aggggtccgc gctgctgatt ggctgtggcc ggcaggtgaa ccctcagcca
 961 atcagcggta cgggggggcgg tgctccgggg ctcacctggc tgcagccacg cacccctct
1021 cagtggcgtc ggaactgcaa agcacctgtg agcttgcgga agtcagttca gactccagcc
1081 cgctccagcc cggccgacc cgaccgcacc cggcgcctgc cctcgctcgg cgtcccggc
1141 cagccatggg cccttggagc cgcagcctct cggcgctgct gctgctgctg cag
```

Poniżej przedstawiono schemat metylacji i częstość występowania powtórzeń CG w obrębie promotora *CDH1*, gdzie zaznaczono obszar wyspy CpG:



Rys. 6: Schemat przedstawiający możliwe miejsca metylacji w obrębie promotora *CDH1* na podstawie programu komputerowego *CpG Island Searcher* (*http://www.uscnorris.com/cpgislands/cpg.cgi*).

Zjawisko metylacji dotyczące wyłącznie jednego allela, w sytuacji gdy homolog danego genu nie wykazuje metylacji jest nazywane *hemimetylacją*.

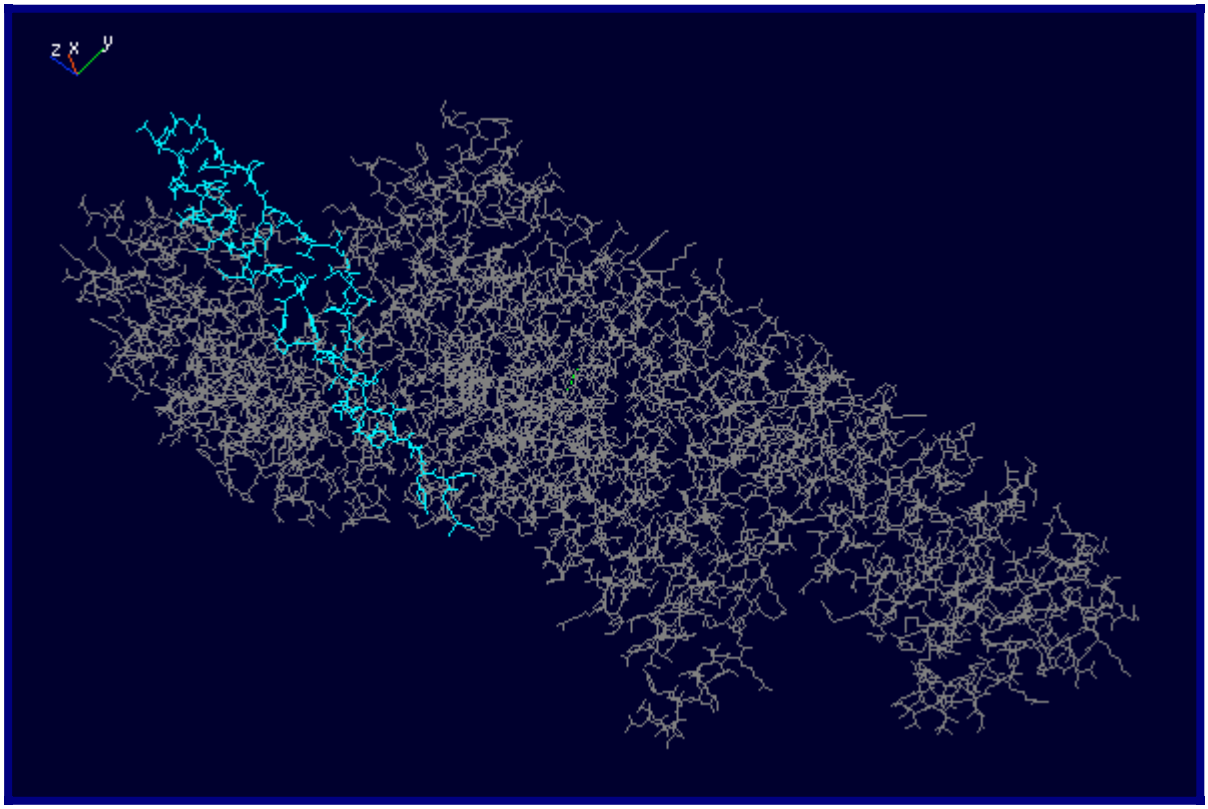
Budowa białka E-kadheryny

E-kadheryna jest homodimerem trans-membranowym i powstaje dzięki translacji mRNA *CDH1*. Białko to zbudowane jest z 882 reszt aminokwasowych.

Jest to białko zależne od jonów wapnia, współdziałające w kompleksach z kateninami, poprzez które kotwiczy do cytoszkieletu aktynowego poprzez koniec C-terminalny, oraz do naprzeciwległej E-kadheryny za pomocą domeny N-terminalnej.

E-kadheryna jest białkiem o masie 120 kDa. Ta glikoproteina charakteryzuje się dużą (składającą się z pięciu segmentów) domeną zewnątrzkomórkową (ekson 4-12) przechodzącą w stosunkowo krótki segment transmembranowy (ekson 13-14) i kolejno w krótka domenę cytoplazmatyczną (ekson 14-16), która kotwiczy do cytoszkieletu aktynowego za pośrednictwem katenin. Eksony 1 i 2 *E-kadheryny* kodują sekwencję sygnałową o długości 27 aminokwasów. Eksony 3 i 4 są odpowiedzialne za kodowanie sekwencji prekursorowej białka o długości 154 aminokwasów. Właściwe białko o długości 728 aminokwasów kodują eksony 4-16.

C-terminalna domena cytoplazmatyczna E-kadheryny charakteryzuje się niezwykle wysoką konserwatywnością budowy, co wiąże się z funkcjonowaniem białka jako molekuły adhezyjnej. Dzięki naprzeciwległym domenom N-terminalnym, sąsiadujące komórki mogą tworzyć bardzo mocne połączenia w obrębie homodimerów naprzeciwległych E-kadheryn. Jakiekolwiek zaburzenia w budowie tego fragmentu białka mogą powodować upośledzenie, bądź utratę funkcji adhezyjnych. Struktura fragmentu C-terminalnej domeny wchodząca w bezpośrednie interakcje z β-kateniną jest bardzo skomplikowana. Schemat tego połączenia przedstawia przestrzenny model takiej interakcji.

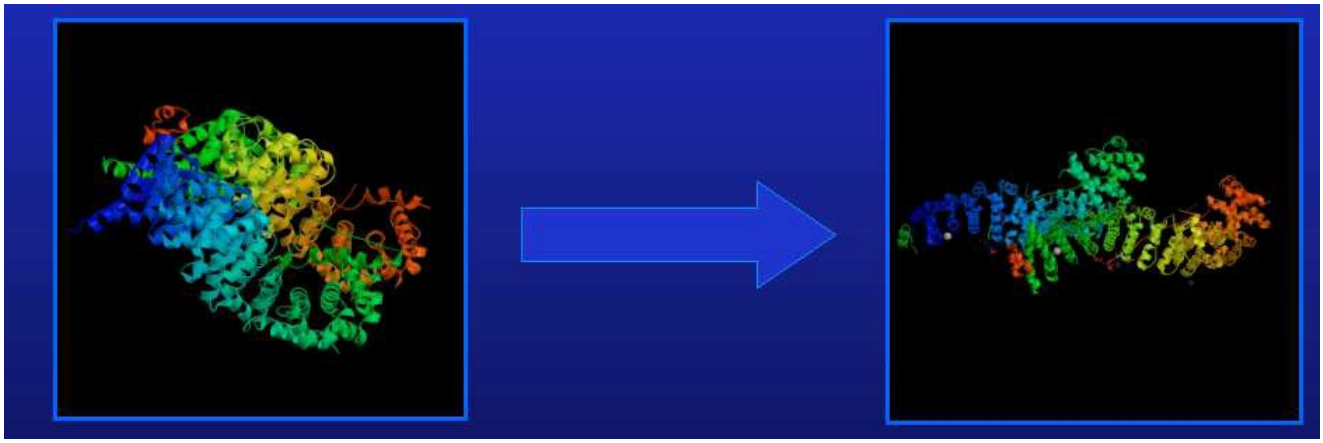


Rys. 7: Model E-kadheryny w kompleksie z β-kateniną w oparciu o szkielety węglowe białek. Na niebiesko został zaznaczony fragment domeny cytoplazmatycznej E-kadheryny odpowiadający fragmentowi kodowanemu przez ekson 14 (niebieski) w interakcji z β-kateniną (szary). Obraz przeanalizowany za pomocą programu *Deep View* po analizie danych z krystalografii rentgenowskiej mysiego kompleksu E-kadheryna/β–katenina.

Kluczowym warunkiem do uzyskania prawidłowej konformacji przestrzennej białka E-kadheryny, umożliwiającej ECCU połączenie z naprzeciwległym kompleksem, jest przyłączanie dwuwartościowych jonów wapnia. Dzięki temu białko z formy pasywnej może przejść w formę aktywną, która jako jedyna ma zdolność wiązania się z inną, tak samo zaktywowaną E-kadheryną. Przyłączanie kationów wapnia w obrębie strefy zwanej potocznie „kieszenią wapniową" jest niezwykle ważnym elementem w prawidłowym działaniu białka.

Tak więc konformacja przestrzenna uwomoruliny zależy od przyłączania jonów wapnia do bogatych w Asp/Glu stref „kieszeni wapniowych" znajdujących się w N-terminalnej części białka. Te sekwencje aminokwasowe są bardzo konserwatywne

ewolucyjnie, nie tylko w przypadku rodziny kadheryn, ale i pomiędzy różnymi gatunkami [107].



Rys. 8: Zmiana konformacji przestrzennej kompleksu E- kadheryna/katenina po przyłączeniu jonów wapnia. E-kadheryna z konformacji pasywnej, po przyłączeniu kationów wapnia, przyjmuje konformację aktywną, która umożliwia naprzeciwległym białkom wzajemne interakcje. Schematy cząsteczek zaczerpnięto z internetowej bazy PDB (*http://www.rcsb.org/pdb/*).

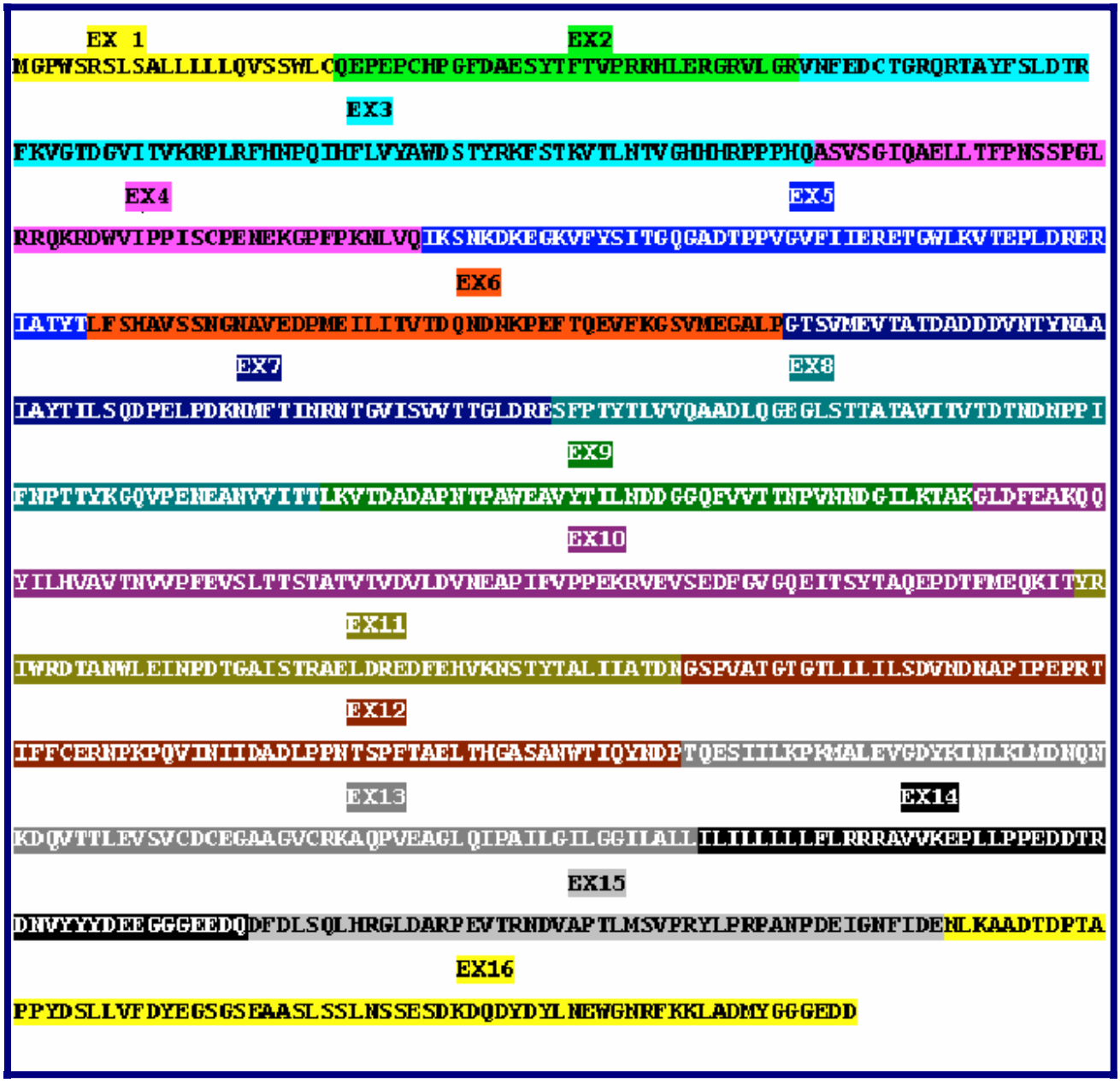
Mutacja fragmentu *CDH1* związanego z przyłączaniem wapnia w obrębie tych „kieszeni" może wiązać się z dramatyczną zmianą konformacji tych fragmentów, która uniemożliwia przyłączanie kationów wapnia. Konsekwencją tego stanu rzeczy jest pozostawanie białka w stanie pasywnym i zaburzenie prawidłowej adhezji w obrębie epitelium.

Na podstawie analizy krystalograficznej domeny zewnątrzkomórkowej C-kadheryny u *Xenopus*, określono mechanizm molekularny połączeń międzykomórkowych, za które odpowiadają kadheryny [152]. Dwie, leżące naprzeciw siebie kadheryny mogą występować w formie połączeń cis-, jak i trans-, wchodząc w interakcje odpowiednio w obrębie tej samej, jak i sąsiadujących komórek. W połączeniach cis- nie wykazano tworzenia jakichkolwiek heterodimerów pomiędzy kadherynami. Heterodimery w połączeniach typu trans pomiędzy E-kadheryną i P-kadheryną wykazano poprzez interakcje zamków (suwaków) leucynowych c-Jun i c-Fos, które w procesie dimeryzacji tworzyły struktury pierścieniowe. Pierścienie te w

konfiguracji cis- były pojedyncze, a w trans– podwójne, jednak ich formacja była ściśle uzależniona od stężenia jonów wapnia [153].

Określenie u myszy trójwymiarowej struktury C-terminalnej domeny E-kadheryny przyniosło informację, która zaskoczyła badaczy. Okazało się bowiem, że białko to wykazuje strukturalne podobieństwo do niezależnych od jonów wapnia immunoglobulin, co sugeruje wspólne powinowactwo ewolucyjne tych grup białek [154].

Poniżej przedstawiono schemat translacji przedstawionego powyżej regionu kodującego *CDH1*. Wyszczególniony został podział na eksony.



3. Cel Pracy:

W ramach tego projektu dokonano analizy mutacji i polimorfizmów w genie *CDH1,* w archiwalnym zbiorze sporadycznych raków żołądka znajdującym się w naszym Zakładzie. W tym celu podjęte zostały próby oceny częstości występowania mutacji i polimorfizmów w tym genie. Za pomocą metod PCR i SSCP wyłoniono fragmenty genów różniące się od innych badanych przypadków pod względem konformacji przestrzennej jednoniciowych fragmentów, sekwencjonowano je oraz analizowano ewentualne efekty poszczególnych zmian. Jest to kontynuacja poprzednich badań nad rakiem żołądka w Zakładzie Patomorfologii CMUJ [45].

Dodatkowym celem tej pracy było zbadanie hipermetylacji w obrębie promotora genu *CDH1*, zarówno w kontekście wykrytych mutacji, jak też odwołując się do poprzednio uzyskanych przez naszą grupę badawczą wyników.

4. Materiał i Metody:

4.1. Materiał

Do badań wykorzystano materiał chirurgiczny nadsyłany do Katedry Patomorfologii CMUJ z I-szej Katedry Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej CMUJ w latach 1996-2000, oraz jeden przypadek przesłany przez Szpital Miejski w Toruniu. W Katedrze Patomorfologii CMUJ poddano badaniu zaawansowane raki żołądka, pochodzące od nie wyselekcjonowanych osiemdziesięciu czterech pacjentów: sześćdziesięciu dwóch mężczyzn oraz dwudziestu dwóch kobiet w przedziale wiekowym 30-81 lat. W styczniu 2005 roku żyło jedynie 14 osób z badanej grupy.

W momencie kwalifikacji do badań w żadnym z powyższych przypadków dane kliniczne oraz historia choroby nie wskazywały na to, że rak żołądka występował rodzinnie, tak więc wszystkie przypadki zakwalifikowano do grupy raków występujących sporadycznie.

4.2. Metody

Do badań wykorzystywano tkankę nieutrwaloną, zamrożoną bezpośrednio po otrzymaniu w temperaturze -80 stopni Celsjusza oraz w jednym przypadku tkankę zatopioną w bloczku parafinowym.

Z każdego żołądka wyodrębniono próbki tkanki nowotworowej oraz niezmienionej błony śluzowej żołądka, a następnie dokonano rutynowej ekstrakcji DNA.

4.2.1. Izolacja DNA

Izolacja DNA z tkanki świeżej

Izolacja genomowego DNA zarówno z tkanki kontrolnej jak i z guza została przeprowadzona za pomocą zestawu *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Germany). Protokół częściowo zmodyfikowano w porównaniu do oryginalnej instrukcji, zmiany te wpłynęły dodatnio na jakość uzyskanego DNA.

Pobrane w warunkach jałowych fragmenty tkanki kontrolnej (śluzówki z poza obszaru guza) i nowotworowej zostały pofragmentowane na sześciany o długości krawędzi ok. 5 mm, umieszczane po kilka sztuk w probówce typu eppendorf o pojemności 1,5 ml, szybko zamrażane w ciekłym azocie, a następnie przez dłuższy czas przechowywane w temperaturze –80°C.

Izolacja DNA została przeprowadzona w następujących etapach:

1. LIZA

Fragmenty tkanki zostały rozmrożone i poszatkowane na jałowym podłożu na małe fragmenty za pomocą jałowego skalpela. Do tak przygotowanej, umieszczonej w probówce typu eppendorf tkanki dodawano po 360 µlbuforu ATL

2. TRAWIENIE

Do próbki wymieszanej z buforem lizującym dodawano 40 µl proteinazy K, worteksowano, a następnie inkubowano próbki w piecyku hybrydyzacyjnym z kołyską, w temperaturze 56^0C, przez 24 godziny, tak aby próbka została zlizowana, a znajdujący się w probówce roztwór stał się klarowny.

3. DEAKTYWACJA ENZYMU

Próbki krótko wirowano, aby usunąć pozostałości roztworu ze ścianek, dodawano 400 µl buforu AL. i worteksowanoprzez60sek.,następniewceludeaktywacjienzymupróbkiinkubowano w 70^0C przez 15 min.

4. IZOLACJA DNA NA KOLUMNACH

Próbki krótko wirowano, aby usunąć pozostałości roztworu ze ścianek, dodawano 400 µl etanolu 99%, a następnie zawartość probówki worteksowano, krótko wirowano, aby usunąć pozostałości roztworu ze ścianek i uważnie przenoszono zawartość eppendorfa wraz z precypitatem do *QIAamp Spin Column*, unikając zamoczenia brzegów kolumny. Następnie zawartość kolumn wirowano z prędkością 8000 rpm przez 1 min. *QIAamp Spin Column* umieszczano na nowej, czystej *collection tube* , poprzednią - zawierającą przesącz wyrzucano.

Kolejnym etapem było płukanie za pomocą buforów AW1 i AW2 kolumienki: do wnętrza kolumny nanoszono centralnie, bez uszkadzania podłoża *sephadexowego,* 500 µl buforu AW1, starając się nie zamoczyć brzegów kolumny, a następnie kolumnę wirowano w warunkach 8000 rpm/1 min. *QIAamp Spin Column* umieszczano ponownie na nowej *collection tube* i operację płukania przeprowadzano przy użyciu 500 µl buforu AW2, wirując kolumnę przez 3 minuty przy maksymalnej prędkości uzyskanej na wirówce *Heraeus biofuge*

fresco, przy 13000 rpm. Następnie po zwirowaniu umieszczano *QIAamp Spin Column* na *nowej collection tube*, usuwając przesącz i centralnie na kolumnę nakrapiano 50 µl wody, wykonywano krótki spin do 2000 rpm, tak, aby woda mogła wniknąć w złoże kolumny, odstawiano kolumnę na 5 min, a następnie DNA wymywano z kolumny wirując w warunkach 8000 rpm/1 min. Wymyty z kolumny roztwór zawierający DNA (ok. 40 µg/µl) rozporcjowywano i magazynowano w warunkach –80°C oraz 4°C. Jakość DNA sprawdzano na żelu agarozowym.

Izolacja DNA z tkanki zatopionej w parafinie

Izolacja DNA wykonywana była również za pomocą zestawu *QIAamp DNA Mini Kit*, po odparafinowaniu próbki. Sposób odparafinowania jest elementem kluczowym w procedurze izolacji DNA ze skrawków parafinowych. Poniżej przedstawiono procedurę odparafinowania, która pozwala na otrzymanie fragmentów DNA długości do ok. 650 bp:

PROCEDURA ODPARAFINOWYWANIA TKANKI I ZMODYFIKOWANEJ LIZY:

1. Do 1-10 pociętych skrawków parafinowych o grubości 3 µm dodać 1 ml ksylenu.
2. Próbki zworteksować i inkubować przez 15 minut w 56^0C w piecyku hybrydyzacyjnym.
3. Wirować 12000 rpm przez 15 minut.
4. Zlać supernatant, zebrać resztę ksylenu.
5. Czynności 1-4 wykonać jeszcze co najmniej dwukrotnie, tak, aby pozbyć się całkowicie ksylenu.
6. Za trzecim razem należy dokładnie osuszyć tkankę z etanolu
7. *Pellet* rozpuścić w 1 ml 98 % etanolu.
8. Inkubować 5 minut w temperaturze pokojowej.
9. Zwirować na 12000 rpm przez 10 minut.
10. Zebrać nadsącz.
11. *Pellet* suszyć w wirówce próżniowej przez ok. 20 minut w temperaturze 45^0C, po 10 min. sprawdzić stopień wysuszenia próbki.

LIZA:

12. Do umieszczonej w eppendorfie tkanki dodać 180 µl buforu ATL oraz 20 µl proteinazy K.
13. Tkankę inkubować w temp. 56^0C przez 48 h, po 24 h ponownie dodać proteinazę K.
14. Pozostałe czynności wykonywać, jak w przypadku tkanki świeżej.

4.2.2. Reakcja PCR

Następnie w przypadku każdej próbki, zarówno DNA pochodzącego z normalnej śluzówki, jak DNA z tkanki nowotworowej, przeprowadzono oddzielną amplifikację metodą PCR wszystkich szesnastu eksonów genu *CDH1*. *Primery* (IDT, USA) zastosowane w przypadku tych reakcji kotwiczą we fragmentach intronowych, co umożliwia w ten sposób zarówno analizę całych fragmentów kodujących, jak i daje możliwość uwzględnienia miejsc biorących udział w wycinaniu intronów, których ewentualne mutacje mogą powodować wypadnięcie całych eksonów podczas *splicingu*.

Dla każdego regionu kodującego genu *CDH1* reakcję PCR wykonano przynajmniej dwukrotnie w następujących warunkach:

Reakcja była przeprowadzana w 25 µl objętości

10 x STR *buffer* ----------2,5 µl (Promega Corp, USA)

20 µM *primer* F (*Forward Primer*)---------- 1,0 µl (IDT Inc., USA)

20 µM *primer* R (*Reverse Primer*) ---------- 1,0 µl (IDT Inc., USA)

Polimeraza DNA *Red Taq* (1U/µl) ---------- 1,0 µl (Sigma-Aldrich, USA)

Woda do iniekcji ----------17,5 µl (Polpharma S.A.)

Genomowe DNA ---------- 2,0 µl roztworu z elucji kolumny

Wszystkie reakcje amplifikacji były przeprowadzane przy użyciu termocyklera *T3* (Biometra GmbH, Germany). Reakcje amplifikacji zostały ujednolicone w ten sposób, że poszczególne programy różniły się jedynie temperaturą przyłączania starterów oznaczoną jako *Ta*.

Reakcje PCR były co najmniej dwukrotnie powtarzane, zarówno dla tkanki kontrolnej, jak i nowotworowej. Na tym etapie pracy wykonano ok. 6000 reakcji PCR.

Warunki reakcji PCR:

Początkowa denaturacja: 94°C ------- 5 min ---------- x

Cykle | 94°C --------30 sek. / Ta(°C) ----- 30 sek. / 72°C --------45 sek. | 35x

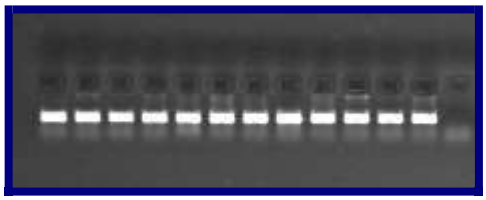
Końcowe wydłużanie: 72°C ------- 7 min ---------- x

Poniżej przedstawiono sekwencje poszczególnych starterów, temperatury przyłączania *primerów* (*Ta*), oraz długości otrzymywanych produktów amplifikacji:

EX	Sekwencje *primerów*	Warunki reakcji PCR *Ta* (°C)	długość produktu (bp)
1	**1F** 5'- TACGGGGGGCGGTGCTCCGG–3' **1R** 5'- GAATGCGTCCCTCGCAAG –3'	**70**	**284**
2	**2F** 5'- TCACCCGGTTCCATCTAC–3' **2R** 5'- TTCCAACCCCTCCCTACT –3'	**58**	**198**
3	**3F** 5'- GTCTTTAATCTGTCCAATTTCC –3' **3R** 5'- AAACAACAGCGAACTTCTCAG –3'	**55**	**309**
4	**4F** 5'- CTTGTTCCTCATCTTCTTTC –3' **4R** 5'- CCCTTTCTCTCCTTGGTACT –3'	**58**	**237**
5	**5F** 5'- GTTGGGATCCTTCTTTACTA –3' **5R** 5'- AAATCCTGGGTGGATGTTAC –3'	**58**	**256**
6	**6F** 5'- CTCACTTGGTTCTTTCAG -3' **6R** 5'- AACCTTTGGGCTTGGACA -3'	**58**	**246**
7	**7F** 5'- AGCTTGTCTAAACCTTCATC -3' **7R** 5'- GCTTAGACCATCACTGTATT -3'	**58**	**328**
8	**8F** 5'- TTGGTTGTGTCGATCTCTCT -3' **8R** 5'- CAGTGGTACCCTTAGTTCAT -3'	**58**	**223**

9	**9F** 5'- GTACTTGTAATGACACATCTC -3' **9R** 5'- TGCCAGTTTCTGCATCTTGC -3'	**58**	**252**
10	**10F** 5'- ACTTCATTGTTTCTGCTCTC -3' **10R** 5'- AACCAGTTGCTGCAAGTCAG -3'	**60**	**308**
11	**11F** 5'- GTTGTTTGCTGGTCCTATTC -3' **11R** 5'- GAACTAGCTAGGAGGTCGAG -3'	**58**	**253**
12	**12F** 5'- TGGGGATTCATTACTGTTGC -3' **12R** 5'- GCATGGCAGTTGGAGCAAAG -3'	**58**	**326**
13	**13F** 5'- TTTCCTCCCCTGGTCTCATC -3' **13R** 5'- TGAGTCACTTGCCAGCTGGA -3'	**60**	**297**
14	**14F** 5'- CTCTCAACACTTGCTCTGTC -3' **14R** 5'- AGAGATCACCACTGAGCTAC -3'	**58**	**209**
15	**15F** 5'- CATAGCCCTGTGTGTATGAC -3' **15R** 5'- CGGATGCTTTGGCTTTCCAC -3'	**58**	**248**
16	**16F** 5'- AGATGACAGGTGTGCCCTTC -3' **16R** 5'- ATTTCTGCATTTCCCAGCAC -3'	**58**	**315**

Następnie, 5 µl produktu reakcji poddawano elektroforezie na 2% żelu agarozowym w warunkach: 110V, 10 min., w celu kontroli prawidłowego przebiegu reakcji. Wszystkie żele agarozowe wykonane w czasie przygotowywania niniejszej pracy posiadały długość 10cm.



Rys. 9: Na zdjęciu pokazano przykładowy wynik reakcji PCR na żelu agarozowym, tu dla eksonu 8 *CDH1*.

Pozostałą ilość mieszaniny uzyskanej z reakcji PCR (20 µl) zachowywano w celu analizy produktu na żelu MDE. Próbki te magazynowano przez wiele miesięcy w temperaturze 4°C.

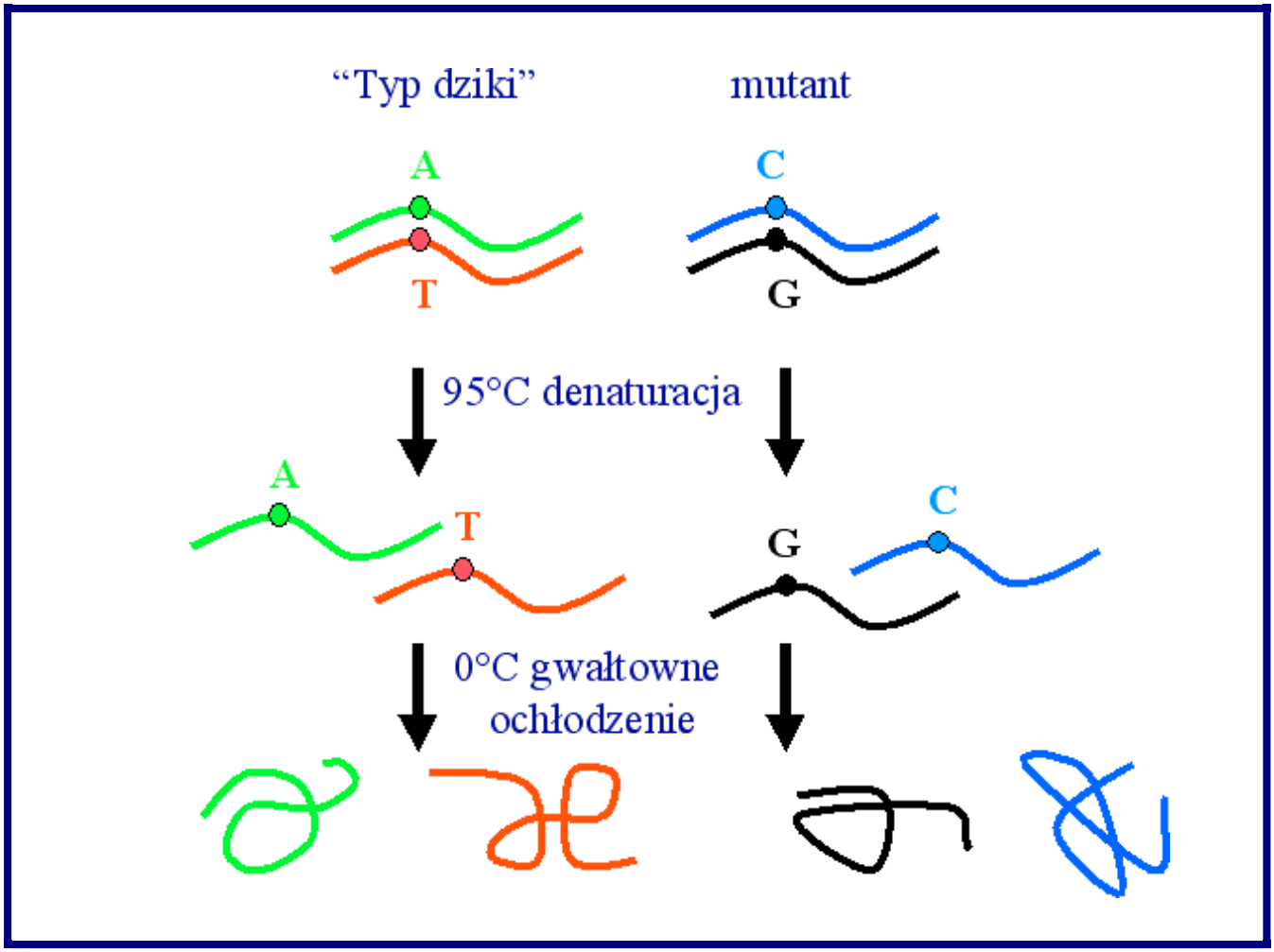
4.2.3. SSCP

Kolejnym etapem była analiza produktów metodą SSCP, gdzie zdenaturowane produkty amplifikacji zostały poddane elektroforezie pionowej na wysokorozdzielczym żelu MDE *(Cambrex, USA)*.

Metoda SSCP *(Single Strand Conformation Polymorphism)* polega na amplifikacji wybranych fragmentów genów, denaturacji produktu, a następnie przeprowadzeniu elektroforezy pionowej na specjalnie przeznaczonym do badań mutacji wysokorozdzielczym żelu MDE. Elektroforeza musi być przeprowadzana w ściśle kontrolowanych warunkach prądowych i termicznych. Po przeprowadzeniu elektroforezy, obecne na żelu MDE zdenaturowane produkty amplifikacji uwidacznia się za pomocą srebrzenia, a żel przenosi się na specjalny papier i suszy w warunkach próżniowych.

Każdy zdenaturowany, jednoniciowy fragment DNA w zależności od przyjętej konformacji przestrzennej migruje inaczej, z inną szybkością. Tego typu struktura zostaje wymuszona na cząsteczce jednoniciowego DNA, które przyjmuje w danym momencie najbardziej korzystną energetycznie konformację przestrzenną.

W przypadku obecności nietypowych wariantów genowych, na żelu pojawiają się dodatkowe prążki, w innych niż w przypadku „typu dzikiego" miejscach, gdyż każdy zdenaturowany fragment DNA migruje inaczej. Tak więc w przypadku obecności polimorfizmów, czy mutacji, na żelu w bardzo prosty sposób można uzyskać dodatkowe prążki, co sprawia, że SSCP jest obecnie najpopularniejszą metodą przesiewową w analizie mutacji i polimorfizmów.



Rys. 10: Zasada metody SSCP. Konformacja przestrzenna (a tym samym szybkość migracji w żelu) fragmentu DNA zależy od jego budowy.

W przypadku detekcji dodatkowych prążków wskazujących na obecność mutacji czy polimorfizmów, niezbędne jest oczywiście sekwencjonowanie: „nietypowe" fragmenty genów zostają zreamplifikowane, a następnie przesekwencjonowane w celu określenia mutacji i polimorfizmów w obrębie zreamplifikowanych fragmentów. Dzięki SSCP sytuacja jest uproszczona, ponieważ bada się tu wyłącznie dodatkowe prążki, zwykle wycinając je z żelu. Ekstrahuje się z nich DNA, reamplifikuje je, a następnie sekwencjonuje osobno produkt zgodnie z kierunkiem nici sensownej *(forward)* jak i antysensownej *(reverse)*. W przypadku niniejszej pracy cała procedura począwszy od pierwszej reakcji PCR została powtórzona co najmniej dwukrotnie.

Po przeprowadzeniu elektroforezy, obecne na żelu produkty amplifikacji uwidaczniano za pomocą srebrzenia.

Poniżej przedstawiono protokół przygotowania żelu MDE. Stężenie, skład żelu oraz warunki elektroforezy zależały od badanego eksonu.

PRZYGOTOWANIE 0,6x i 0,8x ŻELU MDE DO SSCP:

Żel należy przygotować w probówce ze stożkowym dnem o pojemności 50 ml i po dodaniu TEMED-u natychmiast wylać pomiędzy płyty: czas polimeryzacji wynosi ok. 7 minut.

1. 5,6 ml buforu TBE 5×
2. 14 ml MDE 2× (MDE, Cambrex Inc, USA) – 0,8x (10,5 ml MDE 2x)– 0,6x
3. W razie potrzeby dodać 3,5 ml glicerolu (Sigma-Aldrich, USA)
4. 300 µl 10% APS (Sigma-Aldrich, USA)
5. Dopełnić do 35 ml wodą dejonizowaną
6. Zakręcić probówkę i wymieszać wszystkie składniki
7. Dodać 35 µl TEMED-u (Sigma-Aldrich, USA), ponownie wymieszać i natychmiast wylać żel pomiędzy płyty. Bardzo szybko włożyć grzebień 15 lub 24-dołkowy. Pozostawić żel na jedna godzinę do całkowitego spolimeryzowania.

Do probówki nakładano 4-6 µl produktu amplifikacji wymieszanego z taką samą objętością denaturującego buforu obciążającego którego skład przedstawiono poniżej:

BUFOR OBCIĄŻAJĄCY DO ŻELU MDE

(na objętość 1 ml)

950 µl formamidu (Sigma-Aldrich, USA)

2,5 mg *xylene cyanol* (Sigma-Aldrich, USA)

2,5 mg *bromophenol blue* (Sigma-Aldrich, USA)

45 µl wody do iniekcji (Polpharma S.A.)

Następnie próbki denaturowano (95°C przez 4 min., po czym gwałtownie ochładzano do 4°C) i nakładano na żel MDE, uprzednio przepłukując buforem studzienki, w celu usunięcia resztek żelu. Elektroforeza była przeprowadzana przy użyciu aparatu *Protean II XI Cell* (Bio-Rad Laboratories, USA). Odpowiednią temperaturę żeli osiągnięto za pomocą systemu chłodzenia *MultiTemp III* (Amersham Pharmacia-Biotech, USA). Elektroforezę przeprowadzano w buforze TBE 1x.

Poniżej przedstawiono warunki elektroforezy pionowej oraz skład żelu MDE dla każdego eksonu genu *CDH1*:

EKSON	Stężenie żelu MDE [%]	Temperatura żelu [ºC]	Moc prądu [W]	Czas migracji [godz.]	Glicerol [%]
1	**80**	**20**	**4**	**15**	**0**
2	**80**	**8**	**4**	**18**	**0**
3	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
4	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
5	**60**	**8**	**4**	**18**	**10**
6	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
7	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
8	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
9	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
10	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
11	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**

12	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
13	**80**	**20**	**4**	**17**	**0**
14	**60**	**8**	**4**	**19**	**10**
15	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**
16	**80**	**8**	**4**	**17**	**0**

Po zakończonej elektroforezie wyjmowano płyty wraz z żelem z aparatu, delikatnie oddzielano żel, który oznaczano tak, aby nie można było w dalszych etapach pomylić stron żelu, który jest całkowicie przezroczysty. Następnie żel delikatnie przemieszczano do pojemnika wypełnionego wodą podwójnie destylowaną. W celu uwidocznienia poddanego migracji produktu amplifikacji, żel poddawano procedurze srebrzenia.

4.2.4. Srebrzenie żeli MDE

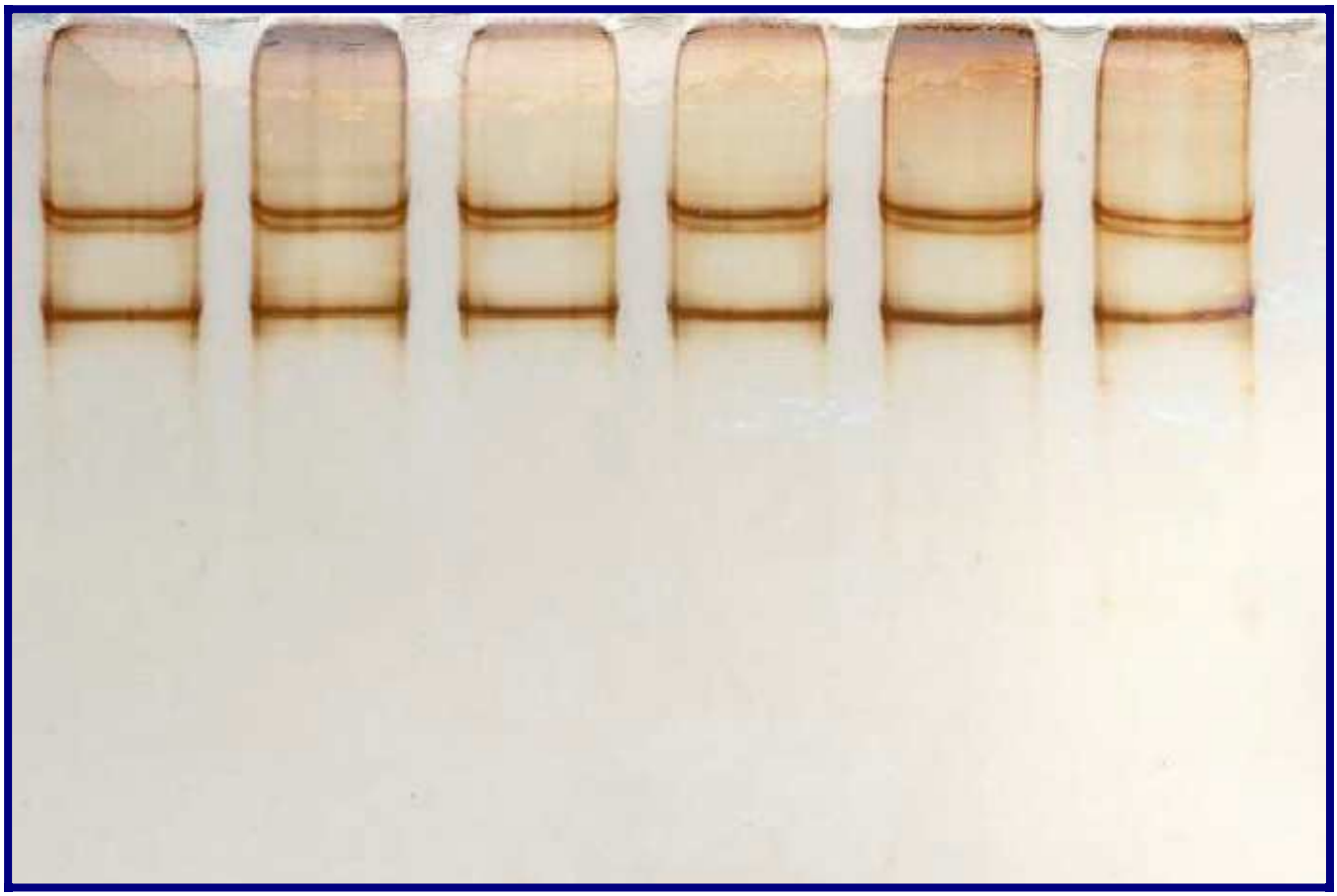
Poniżej przedstawiono protokół srebrzenia żeli MDE. Procedura ta pozwala na uzyskanie żeli o bardzo wyraźnych prążkach, przy prawie bezbarwnym tle. Wszystkie procedury należy wykonywać ograniczając do minimum, lub całkowicie eliminując dotykanie żeli. Rutynowo przeprowadzano srebrzenie 2-4 żeli MDE, na co pozwala ich duża elastyczność i trwałość.

SREBRZENIE ŻELI MDE:

1. Żele przenieść do kuwety z 10% etanolem na 5 min. Kuwetę należy umieścić na kołysce.
2. Żele przenieść do 1% kwasu azotowego na 3 minuty.
3. Przepłukać żele (ok. 1 min.) wodą redestylowaną.
4. Żele zalać 0,012 M azotanem srebra – płukać przez 20 minut w ciemności. W międzyczasie przygotować 0,28 M węglan sodu (Merck GmbH, Germany)
5. Przepłukać żele 1 – 2 min wodą redestylowaną
6. Umieścić żele w niewielkiej objętości (np. 0,5 l) węglanu sodu, kołysać przez kilka sekund, następnie roztwór węglanu sodu zlać.
7. Do reszty węglanu dodać formalinę (Sigma-Aldrich, USA) - końcowe stężenie 0,019%
8. Płukać żel węglanem (kilkukrotnie - wlewać ok. 0,5 l, a następnie zlewać go gdy się zaciemni i wlewać kolejną porcję - dopóki nie pojawią się prążki (ok. 15 minut).
9. Zatrzymać reakcję 10% kwasem octowym – 2 minuty.
10. Żel wypłukać w wodzie (ok. 1 min).
11. Przenieść żel na przezroczystą folię, przykryć bibułą Whatman'a.

Wysrebrzony żel przenoszono na pociętą na kwadraty bibułę filtracyjną 3MM (Whatman, USA) i suszono w suszarce do żeli *583 Gel Dryer* (Bio-Rad Laboratories, USA) podłączonej do pompy próżniowej *Hydro-Tech* (Bio-Rad Laboratories, USA), przez 45 min., w temperaturze 80°C.

Poniżej przedstawiono zdjęcie wysrebrzonego w ten sposób żelu:



Rys. 11: Fragment wysrebrzonego żelu SSCP, próbki nr 52-54 N i T, ekson 16 *CDH1.*

Wysuszone, zabezpieczone folią żele opisywano, analizowano i katalogowano. W przypadku obecności dodatkowych prążków, prążki te wycinano, a zawarte w nich DNA poddawano procedurze sekwencjonowania. Dla każdego produktu amplifikacji wykonywano co najmniej dwa powtórzenia elektroforezy na żelu MDE. W czasie przygotowywania niniejszej pracy wykonano ok. 400 żeli MDE.

4.2.5. Reamplifikacja DNA

Wstępnie, dodatkowe prążki obecne w przypadku zarówno tkanki normalnej, jak i nowotworowej, zakwalifikowano jako występujące w populacji polimorfizmy. Zakładano, że obecność dodatkowych prążków jedynie w przypadku DNA pochodzącego z guza wskazuje na obecność mutacji somatycznej. DNA ekstrahowano i ponownie amplifikowano zarówno z

prążków migrujących w nietypowy sposób na żelach MDE, jak i prążków kontrolnych. Ekstrakcję można z sukcesem wykonywać z prążków ze zmagazynowanych żeli nawet kilka lat po wykonaniu elektroforezy żelu MDE. Dodatkowo, jako kontrolę wykonywano reakcję sekwencjonowania dla tego samego fragmentu amplifikowanego bezpośrednio z genomowego DNA danej próbki.

Ekstrakcja DNA z prążka

Aby wykonać ekstrakcję DNA z poszczególnych prążków, należało usunąć z żelu MDE folię zabezpieczającą, a następnie skalpelem wyciąć precyzyjnie wybrany prążek. Suchy kawałek akrylamidu oddzielano od papieru, do którego żel był przyczepiony i umieszczano go w probówce typu eppendorf. Do prążka w zależności od wielkości, dodawano 100 μl wody do iniekcji, tak aby prążek był całkowicie zanurzony.

Kolejnym etapem było umieszczenie probówki z prążkiem na 15 min. w temperaturze 65°C, po czym przenoszono ją natychmiast do -20°C, gdzie pozostawała przez 15 min. Tę procedurę powtarzano trzykrotnie. DNA przenikało do wody, w której zanurzony był prążek. Do reamplifikacji używano tego roztworu.

PCR reamplifikacyjny

Protokół reamplifikacyjnego PCR-u jest analogiczny jak poprzedni, z tą tylko różnicą, że zamiast 2 μl genomowego DNA, należy użyć 10 μl roztworu DNA po ekstrakcji z prążka, a co za tym idzie 9,2 μl H_2O.

Elektroforeza produktu reamplifikacji

Następnym etapem postępowania z fragmentem DNA uzyskanym z wyciętego prążka, a następnie reamplifikowanym, jest elektroforeza na żelu agarozowym, mająca na celu oczyszczenie produktu z *primerów* i *dimerów*, w celu uzyskania jak najczystszej matrycy do sekwencjonowania.

Wykonywano 20-minutową elektroforezę na 2% żelu agarozowym, przy 90V, na aparacie *Sub-cell GT* (Bio-Rad Laboratories, USA). Jednak tym razem elektroforezie poddawano całość produktu reamplifikacji, czyli 25 µl.

Wycinanie produktu z żelu agarozowego

Uzyskane prążki wycinano za pomocą skalpela z żelu agarozowego. Dzięki zawartości w żelu bromku etydyny, a co za tym idzie interkalacji tego związku pomiędzy strukturę DNA, jest możliwe precyzyjne wycięcie prążka z żelu. W czasie przygotowywania niniejszej pracy prążki wycinano bezpośrednio na transiluminatorze UV. Wycinano wyłącznie fragment agarozy zawierający właściwy produkt. Wycięte prążki umieszczano w 1,5 ml probówkach typu eppendorf, a następnie ważono.

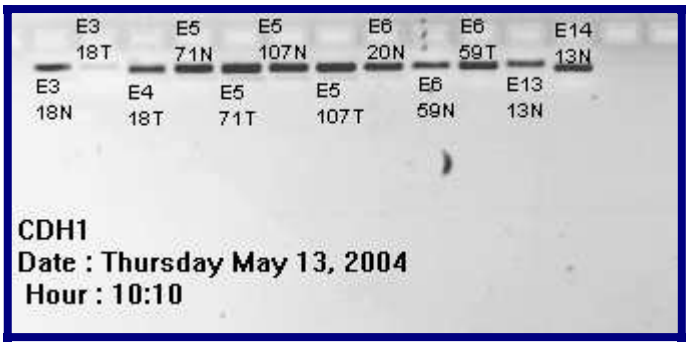
Ekstrakcja produktu reamplifikacji z agarozy

Zreamplifikowany i wycięty w postaci prążka produkt ekstrahowano z agarozy za pomocą kolumn zawierających *sephadex* i zestawu *Agarose QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen GmbH, Germany), protokół wykonuje się zgodnie z zaleceniami producenta:

Ekstrakcja DNA z prążka agarozowego:

1. Wyciąć prążek DNA czystym skalpelem i umieścić w probówce.
2. Zważyć agarozę.
3. Dodać 3 objętości buforu QG, na 1 objętość agarozy.
4. Inkubować probówkę w 50°C przez 10 min.
5. Dodać 1 objętość izopropanolu (Sigma-Aldrich, USA).
6. Nanieść na kolumnę rozpuszczona agarozę.
7. Wirować 13000 rpm/1 min.
8. Usunąć roztwór z probówki, a kolumnę przepłukać 750 µl buforu PE.
9. Usunąć bufor PE poprzez wirowanie 13000 rpm/1 min.
10. Wstawić kolumny do nowych probówek
11. Nanieść centralnie na kolumnę 30 µl wody i pozostawić przez 5 min.
12. Wirować 13000 rpm/1 min.
13. Nanieść na żel agarozowy 5 µl roztworu.

Po ekstrakcji uzyskuje się ok. 25 µl roztworu DNA. Jakość ekstrakcji określa się porównując poszczególne ekstrahowane roztwory, wykonując elektroforezę na 1,5% żelu agarozowym. Elektroforezie poddaje się 5 µl roztworu uzyskanego z elucji kolumny. Elektroforezę wykonuje się przy 110V, w czasie ok. 7 min. Na jej podstawie określano ilość matrycowego DNA potrzebnego do reakcji sekwencjonowania:



Rys. 12: Zdjęcie przykładowego żelu agarozowego, na którym uwidoczniono DNA otrzymane z elucji. Zostanie ono użyte jako matryca do sekwencjonowania. Do reakcji sekwencyjnego PCR-u należy użyć jako matrycy 2 µl roztworu w przypadku prążka o intensywnej fluorescencji (np.: E3 18N, E6 59T, czy E5 71T). W przypadku mniej intensywnego prążka należy użyć 5 µl roztworu (E3 18T). Zdjęcie w negatywie.

Należy dodać, że w każdym przypadku występowania na żelu MDE dodatkowych, wskazujących na obecność mutacji bądź polimorfizmów prążków, jako kontrolę sekwencjonowano produkt amplifikowany bezpośrednio z genomowego DNA dla eksonu, w którym metodą SSCP znaleziono dodatkowy prążek.

4.2.6. Sekwencjonowanie

PCR sekwencyjny

PCR sekwencyjny przeprowadzano przy użyciu zestawu zawierającego fluorescencyjnie znakowane terminatory *Big Dye* wersja *1.1* i *3.1* (Applera Corp, USA). Osobne reakcje przeprowadzano dla nici sensownej jak i antysensownej.

Na podstawie ocenianego prążka zawierającego produkt reamplifikacji po elucji z kolumny, można określić ilość matrycy potrzebną do wykonania reakcji. Zwykle są to 2 µl, jednak w przypadku nieefektywnej elucji (słabej jakości prążka) należy pobrać nawet do 6 µl roztworu zawierającego matrycę do sekwencjonowania. Ocena eksperymentatora oparta na doświadczeniu, jest na tym etapie elementem kluczowym.

Poniżej przedstawiono protokół reakcji sekwencjonowania dla jednej próbki:

PCR sekwencyjny:

BD Seq buffer 5x ..... 2,0 µl

primer Forvard (lub *Reverse*) ----------1,0 µl (3,2 pmola)

Ready Reaction Mix ..... 4,0 µl Woda

dejonizowana ----do 20,0 µl

Matrycowe DNA ---------- 2,0 – 5,0 µl roztworu z elucji

Warunki reakcji sekwencjonowania

Reakcję przeprowadzono przy pomocy termocyklera *T3* (Biometra GmbH, Germany):

Warunki reakcji sekwencyjnego PCR:

Początkowa denaturacja: 96°C ------- 1 min ----------x

Cykle	96°C ------- 10 sek. 50°C ------ 30 sek. 60°C -------- 4 min.	25x

PCR sekwencyjny trwa ok. 2,5 h. Aby jednak produkt sekwencjonowania mógł zostać poddany elektroforezie i przeanalizowany, musi zostać oczyszczony z wyznakowanych fluorescencyjnie, niesparowanych dideoksynukleotydów. Najbardziej ekonomicznym sposobem oczyszczania jest precypitacja produktu.

Oczyszczanie produktów sekwencjonowania – precypitacja

Precypitacja produktu sekwencjonowania była wykonywana przy użyciu chlorku magnezu i etanolu. W czasie precypitacji należy zwrócić uwagę na bardzo mały *pellet* DNA, aby przez przypadek nie usunąć go wraz z nadsączem. Precypitację należy wykonać w następujący sposób: Do 100 µl schłodzonego do temperatury –20°C etanolu o stężeniu 95%, należy dodać 40 µl schłodzonego do ok. 4°C $MgCl_2$ (2mM). Związki należy wymieszać i dodać do nich mieszaninę, z której będzie się wytrącać produkt reakcji sekwencjonowania. Roztwór należy zworteksować i natychmiast umieścić w temperaturze –20°C na 60 min. Po tym czasie mieszaninę należy zwirować w temperaturze 4°C w warunkach: 14000rpm/ 30min., zlać ostrożnie *supernatant*, pozostawiając *pellet* DNA, który przemywa się również schłodzonym do temperatury –20°C etanolem o stężeniu 70%, w ilości 250 µl. Następnie należy ponownie zwirować probówki w takich samych jak wyżej warunkach, całkowicie zlewając nadsącz. *Pellet* należy suszyć w temperaturze 65°C przez 10 min. Tak oczyszczone produkty sekwencjonowania mogą być poddawane elektroforezie kapilarnej po dokładnym rozpuszczeniu *pelletu* DNA w zawierającym formamid buforze TSR (Applera Corp, USA).

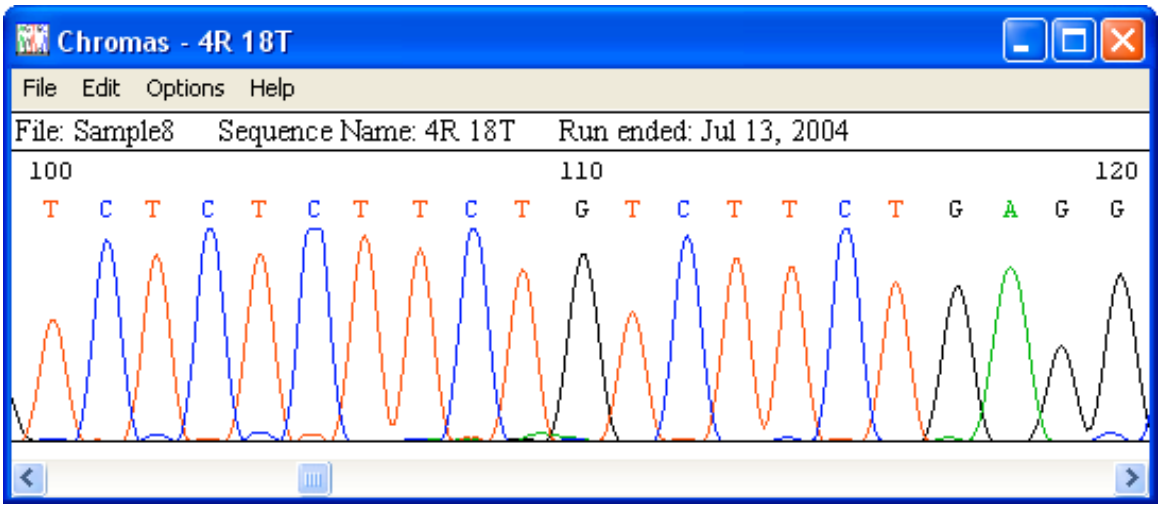
4.2.7. Elektroforeza kapilarna produktów sekwencjonowania

Oczyszczone produkty sekwencjonowania były poddawane elektroforezie kapilarnej na aparacie *ABI PRISM 310* (Applied Biosystems, USA). Sprecypitowany produkt sekwencjonowania zawieszano w 20 µl buforu TSR w taki sposób, że *pellet* uzyskany z precypitacji był przeciągany ok. 30 razy przez końcówkę pipety. Następnie próbki denaturowano przez 5 min. w temperaturze 95°C, po czym przenoszono na 10 min. na lód. Po stworzeniu właściwego protokołu rozmieszczenia próbek (*Sample Shit*) i listy iniekcyjnej, zdenaturowane próbki poddawano elektroforezie kapilarnej.

Elektroforezę poszczególnych próbek wykonywano w świetle lasera argonowego w następujących warunkach: filtr E, polimer POP6, 15kV, czas iniekcji 30 sek., czas EP 120 min., kapilara różowa 60 cm.

4.2.8. *Analiza wyników sekwencjonowania*

Wyniki uzyskane z aparatu były analizowane za pomocą programu komputerowego dostarczanego przez producenta (*Sequencing Analysis Software*), przenoszone z komputera Macintosh na PC, analizowane za pomocą programu CHROMAS.



Rys. 13: Przykładowy obraz sekwencji wyświetlony w formacie PC, za pomocą programu CHROMAS.

Uzyskane sekwencje zapisywano w formacie FASTA i porównywano z prawidłowymi sekwencjami z banków genów przy użyciu dostępnego w sieci internetowej programu BLAST.

```
Query: 7      ttcattttgtcttcagatcaaatccaacaaagacaaagaaggcaaggttttctacagcat 66
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 152201 ttcattttgtcttcagatcaaatccaacaaagacaaagaaggcaaggttttctacagcat 152260

Query: 67     cactggccaaggagctgacacacccccctgttggtgtctttattattgaaagagaaacagg 126
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 152261 cactggccaaggagctgacacacccccctgttggtgtctttattattgaaagagaaacagg 152320
```

Rys. 14: Fragment eksonu 5 *CDH1*, porównywany za pomocą programu BLAST do sekwencji chromosomu 16. Fragmenty te nie wykazują różnic.

Wyniki analizowano i sprawdzano zgodność sekwencji na nici wiodącej oraz opóźnionej za pomocą funkcji *„Reverse Compliment"* programu CHROMAS. W przypadku wystąpienia zmian związanych z obecnością mutacji, bądź polimorfizmów analizowano je zarówno na poziomie nukleotydów, jak i poziomie translacji.

Poniżej przedstawiono symbole oznaczeń kodonów którym posługiwano się w analizie wyników uzyskanych z sekwenatora:

	T			**C**			**A**			**G**		
T	TTT	Phe	F	TCT	Ser	S	TAT	Tyr	Y	TGT	Cys	C
	TTC	Phe	F	TCC	Ser	S	TAC	Tyr	Y	TGC	Cys	C
	TTA	Leu	L	TCA	Ser	S	TAA	stop	*	TGA	stop	*
	TTG	Leu	L	TCG	Ser	S	TAG	stop	*	TGG	Trp	W
C	CTT	Leu	L	CCT	Pro	P	CAT	His	H	CGT	Arg	R
	CTC	Leu	L	CCC	Pro	P	CAC	His	H	CGC	Arg	R
	CTA	Leu	L	CCA	Pro	P	CAA	Gln	Q	CGA	Arg	R
	CTG	Leu	L	CCG	Pro	P	CAG	Gln	Q	CGG	Arg	R
A	ATT	Ile	I	ACT	Thr	T	AAT	Asn	N	AGT	Ser	S
	ATC	Ile	I	ACC	Thr	T	AAC	Asn	N	AGC	Ser	S
	ATA	Ile	I	ACA	Thr	T	AAA	Lys	K	AGA	Arg	R
	ATG	Met	M	ACG	Thr	T	AAG	Lys	K	AGG	Arg	R
G	GTT	Val	V	GCT	Ala	A	GAT	Asp	D	GGT	Gly	G
	GTC	Val	V	GCC	Ala	A	GAC	Asp	D	GGC	Gly	G
	GTA	Val	V	GCA	Ala	A	GAA	Glu	E	GGA	Gly	G
	GTG	Val	V	GCG	Ala	A	GAG	Glu	E	GGG	Gly	G

Rys. 15: Kod genetyczny oraz odpowiadające poszczególnym kodonom symbole aminokwasów, używane podczas analizy wyników.

W związku z licznymi rozbieżnościami literaturowymi, w niniejszej pracy zdecydowano się zastosować numerację pozycji poszczególnych nukleotydów w genie w taki sposób, że numerację rozpoczęto od pierwszego nukleotydu w kodonie pierwszym (Met) genu *CDH1:* -124 bp w stosunku do sekwencji mRNA genu *CDH1* nr Z13009 z banku genów NCBI/OMIM *(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)*, zawierającej fragment promotorowy. Sekwencja ta została przytoczona we wstępie niniejszego opracowania.

Nomenklatura stosowana w tej pracy do określania wariantów genowych została zastosowana zgodnie z konwencją zaproponowaną w 2001 roku przez Antonarakis'a [155].

Matematyczna analiza mutacji intronowych

Matematyczna analiza mutacji w obrębie intronów oraz ich wpływu na *splicing* została wykonana na podstawie algorytmu:

$$Ri(j)=\sum_{l}\sum_{b=a}^{t} s(b,l,j)R_{iw}(b,l)$$

gdzie: *s(b,l,j)* to macierz binarna dla sekwencji nr *j*, której komórki posiadają wartość równą 1 dla zasady *b* w pozycji *l* oraz współczynnika *a* przybierającego wartość 0 w każdym innym miejscu, a R_{iw} to macierz ważona, wyrażająca model połączenia *splice-site* [156]. Obliczenia zostały przeprowadzone za pomocą komputera, przy użyciu *wersji beta* oprogramowania „*Automated Splice Site Analyses*", które zostało udostępnione przez autorów na stronie internetowej: http://splice.cmh.edu/

4.2.9. Wykrywanie metylacji promotora genu CDH1

Poziom metylacji DNA regionu bogatego w CpG w obrębie promotora genu *CDH1* określano przy pomocy metody MSP (*Methylation-Specyfic PCR*). Analiza ta polega na chemicznej modyfikacji (dezaminacji) próbki DNA za pomocą dwusiarczku sodu. W ten sposób niezmetylowane cytozyny są zamieniane na uracyl, a następnie w czasie reakcji PCR

na tyminę. PCR wykonuje się przy użyciu *primerów* specyficznych zarówno dla zmetylowanego, jak i niezmetylowanego fragmentu promotora.

Należy zwrócić uwagę na możliwość uzyskania wyników fałszywie pozytywnych. Kluczową sprawą wydaje się być bardzo precyzyjne przestrzeganie czasów inkubacji oraz bardzo dokładne pipetowanie.

Protokół wykrywania hipermetylacji regionów CpG promotora *CDH1* jest czasochłonny i obejmuje 4 etapy:

PROTOKÓŁ wykrywania metylacji promotora genu CDH1:

1. Część pierwsza, denaturacja w NaOH i inkubacja DNA w dwusiarczku sodu:

1- W eppendorfie umieścić:

35 μL TE

15 μL roztworu DNA (otrzymanego z izolacji na kolumnie, stężenie ok. 40 μg/μl)

5,5 μL 3M NaOH

2- Inkubować w 37^{o}C przez 15 minut.

3- Inkubować w 95^{o}C przez 4 minuty.

W czasie inkubacji sporządzić następującą mieszaninę:

15 ml 2,8 M dwusiarczku sodu (Sigma-Aldrich, USA) + 1 ml hydrochinonu (3M, pH 5; Sigma-Aldrich, USA) + 600μL NaOH 10 M (Sigma-Aldrich, USA)

4- Przełożyć eppendorfy natychmiast na lód.

5- Do każdej próbki dodać 500 μl powyższej mieszaniny i zworteksować.

6- Nałożyć warstwę oleju mineralnego (Sigma-Aldrich, USA).

7- Inkubować w 55^{o}C przez 16 h w całkowitej ciemności.

2. Część druga (oczyszczanie DNA z soli zestawem *Wizard Cleanup* i odsiarczanie w NaOH) 1- W nowym eppendorfie umieścić 1 ml buforu *Wizard Cleanup* (Promega GmbH, Germany). 2- Dodać próbki DNA bez oleju mineralnego.

3- Przygotować kolumny nałożyć je na *manifold* (Promega GmbH, Germany). 4- Podłączyć próżnię. Otworzyć zawory i zassać próbki.

5- Przemyć kolumny 80% izopropanolem.

6- Umieścić kolumny w czystych, opisanych eppendorfach i zwirować je przez 2 min. na 11000 rpm.

7- Znów umieścić kolumny w czystych eppendorfach i przemyć je 50 µl ciepłego TE (40-50°C).

8- Wirować 1 min. na 11000 rpm, przelać przesącz do nowej probówki.

9- Do przesączu dodać 3M NaOH i inkubować w 37°C przez 15 minut.

10- Dodać 55 µl octanu amonu (6M, pH7).

11- Dodać 220 µl etanolu 96%.

12- Umieścić probówkę w –20°C na 1 godz., a następnie wirować przez 30 min. w 14000 rpm (4 °C).

13- Zlać supernatant za pomocą pipety i przemyć *pellet* 500 µl etanolu 70%.

14- Wirować 15 min. na 14000 rpm, zlać supernatant, pozwolić wyschnąć *pellecie*, po czym dodać 25 µl dejonizowanej wody. Przechowywać DNA w –20°C.

3. Część trzecia - PCR

Tak przygotowane DNA jest matrycą dla dwóch reakcji PCR, jednej z *primerami* rozpoznającymi sekwencję zmetylowaną i drugi z *primerami* dla sekwencji niezmetylowanej. Oba PCR-y charakteryzują się następującymi warunkami:

Mix:

2,5 µl 10x STR *buffer* (Promega GmbH, Germany)

2 µl *primera* F-*forward* (0,1 ug/µl)

2 µl *primera* R-*reverse* (0,1 ug/µl)

0,5 µl $MgCl_2$ (25mM)

0,5 µl Polimerazy DNA (Red Taq DNA Polymerase, Sigma) 1U/µl

15,0 µl H_2O

oraz: 1,5 µl powyższego roztworu DNA

Używano następujących *primerów* (IDT):

Wykrywanie zmetylowanego fragmentu:

ECAD-MP-F 5'-GGTGAATTTTTAGTTAATTAGCGGTAC-3'
ECAD-MP-R 5'-CATAACTAACCGAAAACGCCG-3'

Wykrywanie niezmetylowanego fragmentu:

ECAD-NM-F 5'-GGTAGGTGAATTTTTAGTTAATTAGGTGTA-3'
ECAD-NM-R 5'-ACCCATAACTAACCAAAAACACCA-3'

Warunki termiczne PCR:

95°C - 10 min.

(95°C 30 sek., 57°C 30 sek., 72°C 1 min.)-32 cykle

72°C - 10min

4. Część 4 – elektroforeza na żelu agarozowym

Elektroforeza wszystkich produktów PCR na 2% żelu agarozowym, 100 V, 15 min.

Poniżej przedstawiono przykładowy wynik analizy metylacji promotora genu *CDH1*:

Rys. 16: Zdjęcie przedstawia hemimetylację próbek 1, 2 i 3 (prążki zarówno dla zmetylowanego produktu, jak i niezmetylowanego) oraz całkowitą metylację próbki Met+ (prążek wyłącznie w przypadku produktu wykazującego metylację). Jako O oznaczona jest próbka kontrolna (ślepa). Zdjęcie w negatywie.

Wszystkie badania promotora *CDH1* wykonane dla potrzeb tej pracy zostały dla każdej próbki powtórzone co najmniej czterokrotnie, a ocena prążków została dokonana przez dwóch niezależnych obserwatorów, którzy we wszystkich przypadkach jednakowo ocenili uzyskane na żelu agarozowym wyniki. Tak restrykcyjny sposób analizy prążków

wydaje się być konieczny ze względu na możliwość uzyskania wyników fałszywie pozytywnych związanych z niedokładnym przestrzeganiem protokołu.

4.3 Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane za pomocą pakietów statystycznych *Statistica for Windows 5.0* (Statsoft Inc, USA) oraz *Excel* (Microsoft, USA).

Ocenę zależności pomiędzy poszczególnymi zmiennymi wykonywano testami Fisher'a (jednostronnym) oraz testami $\chi 2$. Zmienne powiązane analizowano testem Wilcoxon'a, natomiast porównania grupowe badano za pomocą testu nieparametryczną metodą analizy wariancji Kruskalla-Wallisa (*ANOVA*). Analizę wariancji dwóch grup analizowano testem F, zaś średnie porównywano za pomocą testu U Mann-Withney. Zmienne o rozkładzie normalnym analizowano metodą t Studenta. Współczynniki korelacji Spearman'a oraz Pearson'a posłużyły do analizy związków pomiędzy zmiennymi. Do analizy przeżywalności posłużono się metodą Kaplana-Meier'a [157].

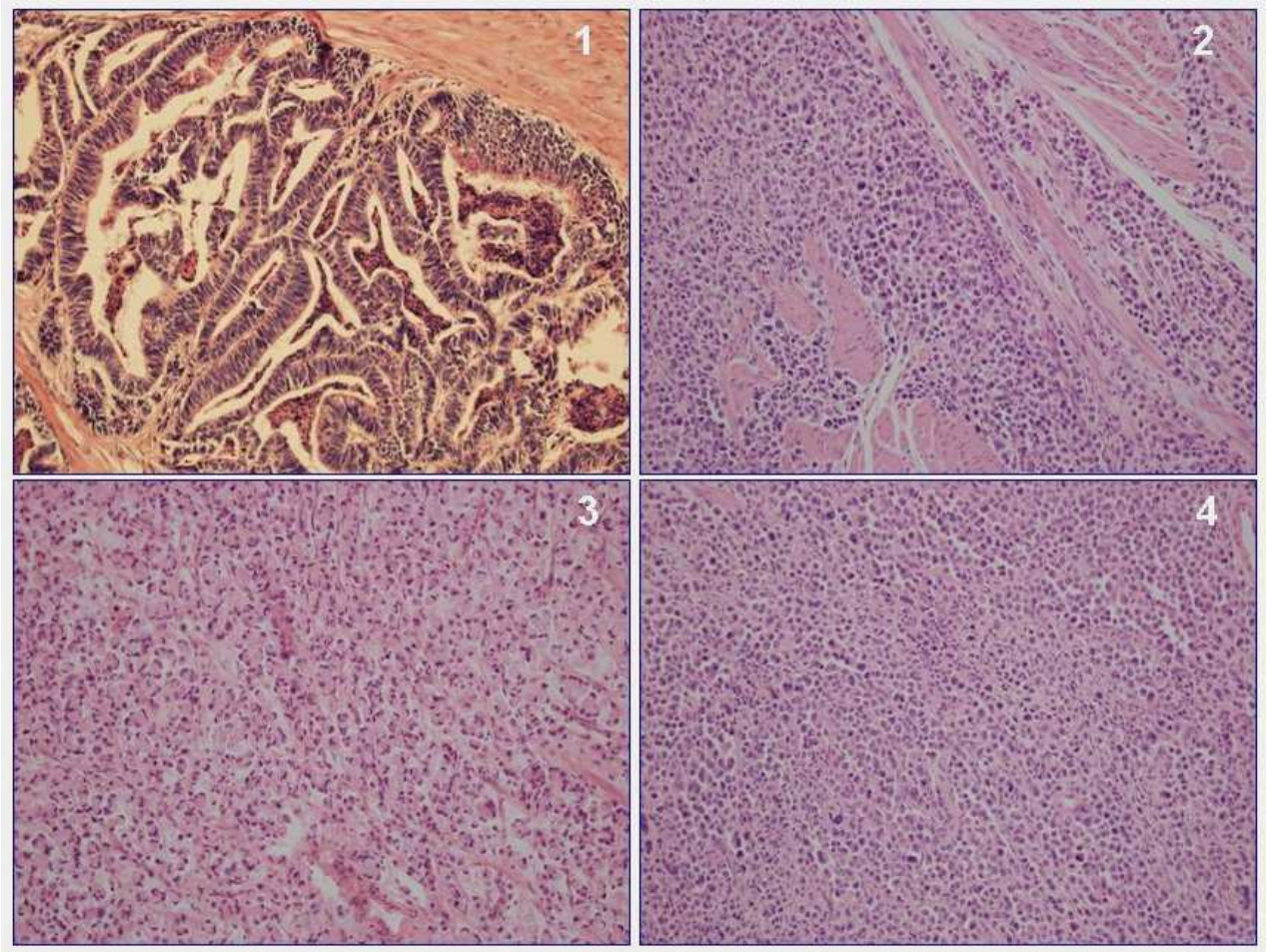
Za znamienny statystycznie przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$. W dyskusji otrzymanych wyników zwracano uwagę na zależności o nieco większym poziomie istotności, gdzie $p \in (0,05; 0,15)$, zaznaczając istnienie *trendu*, bądź *tendencji* do wystąpienia danej zależności.

5. *Wyniki:*

5.1. Klasyfikacja raków żołądka

Klasyfikacja raków żołądka została przeprowadzona przez dr n. med. Magdalenę Białas. Podziału dokonano zgodnie z klasyfikacją WHO, Lauren'a [158] , oraz Goseki [160].

Na poniższej rycinie przedstawiono przykłady raka żołądka typu jelitowego, oraz raka rozlanego, klasyfikowanych wg Lauren'a:



Rys. 17: Przykładowe zdjęcie losowo wybranych preparatów w barwieniu eozyna-hematoksylina. Zdjęcia przedstawiają odpowiednio: 1-rak żołądka typu jelitowego, 2-rak żołądka typu rozlanego, 3-rak żołądka typu rozlanego, widoczne komórki sygnetowate, 4-rak żołądka typu rozlanego, obszar lity. Powiększenie obiektywu 20x.

Średnia wieku i ponad-pięcioletnie przeżycie

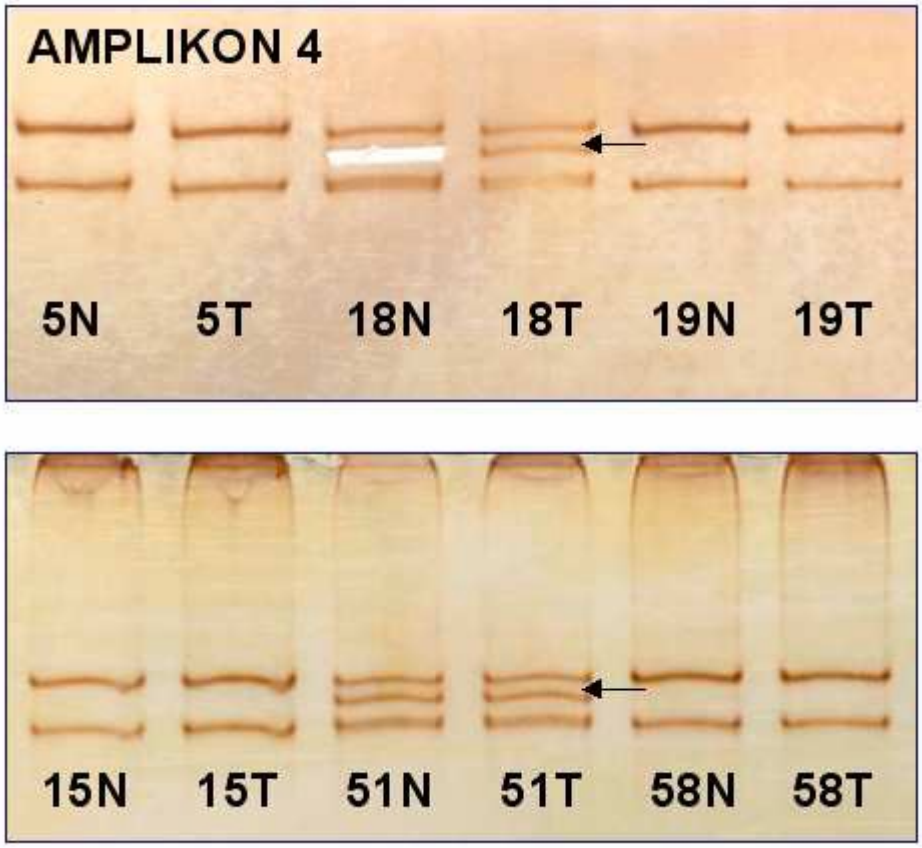
W badanej grupie średnia wieku mężczyzn w momencie rozpoznania choroby wynosiła: 62,8±11,0 lat, kobiety chorowały średnio w wieku 64,8±9,8 lat.

Warto zwrócić uwagę, że chorzy, którzy przeżyli ponad 2000 dni (5,5 roku) to grupa ludzi nieco młodszych w momencie zachorowania (średnio 58,4±8,7 lat) niż średnia zachorowań dla całej grupy (62,7±10,7 lat). W grupie tej były dwie kobiety i pięciu mężczyzn. Wszyscy ci pacjenci, w momencie rozpoznania wykazywali wysoki stopień zaawansowania nowotworu T4 *(wg WHO/AJCC)*, sześciu z siedmiu w ogóle nie było poddanych leczeniu chemioterapią, a jedyna osoba, którą poddano takiemu leczeniu, nie zakończyła go i nadal żyje, pomimo obecności jednego odległego przerzutu w momencie rozpoznania. Pacjenci ci charakteryzowali się znacznie niższym odsetkiem przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych – trzech z nich nie wykazywało ich w ogóle, w pozostałych przypadkach odsetek ten wahał się od 4-59% (średnio 24%), gdy średni odsetek przerzutów w grupie, która nie dożyła 2000-go dnia po operacji był ponad 3,5 x większy.

Obecnie, z 7 osób, które przeżyły dłużej niż 2000 dni, żyje jedynie 5 (jeden rak rozlany i 4 jelitowe wg Lauren'a). Dwóch pacjentów, którzy przeżyli ponad 2000 dni, lecz zmarły, były operowane nieco dawniej niż niż inne osoby z tej grupy: na przełomie 1996 i 1997 roku. Jedna z nich (rak mieszany wg Lauren'a) była nosicielem mutacji zaburzającej *splicing* (przypadek nr 8), przez raka miała zajęte 59% węzłów okołożołądkowych, a naciek obejmował cały żołądek, druga (rak rozlany wg Lauren'a) miała zajęte 9% okolicznych węzłów chłonnych. Ciekawym wydaje się być fakt, że jedyną różnicą (poza okresem przeprowadzonego zabiegu operacyjnego) w porównaniu do 5-ciu przypadków z przeżyciem ponad 2000 dni, u zmarłych pacjentów z tej grupy, nie wykazano ekspresji białkowej MSH2 metodą imminohistochemii. Próba jest zbyt mała, aby doszukiwać się tu jakichkolwiek zależności statystycznych.

5.2. Analiza polimorfizmów CDH1

W badanym za pomocą metody SSCP materiale, około 81% przypadków wszystkich analizowanych w tym projekcie raków żołądka wykazywało zmiany wstępnie zakwalifikowane jako polimorfizmy, a dodatkowy prążek był obecny zarówno w próbce kontrolnej (N) jak i nowotworowej (T). Najczęściej występował polimorfizm w eksonie 13 oraz intronie 4.



Rys. 18: Przykładowe zdjęcie losowo wybranych żeli MDE, gdzie dzięki technice SSCP wykazano obecność dodatkowych prążków, odpowiadających amplikonowi 4 genu *CDH1*. Zmiana ma charakter polimorfizmu (531+10G->C, EX4+10) - dodatkowe prążki dotyczyły zarówno tkanki prawidłowej (N) jak i tkanki nowotworowej (T). W próbce 18N widoczne miejsce po wycięciu prążka.

Wykryte za pomocą metody SSCP dodatkowe prążki poddano sekwencjonowaniu. Na jego podstawie okazało się, iż w ten sposób zostały wykryte niespodziewanie aż 3 przypadki

mutacji germinalnych, w próbkach nr 20, 39 i 71, co zmieniło odsetek polimorfizmów, który wynosił ostatecznie 77% przypadków wykazujących co najmniej jeden polimorfizm.

Interesującym jest fakt wykrycia nie opisywanego do tej pory polimorfizmu w eksonie 14 genu *CDH1 (2194 CGG->AGG: Arg->Arg)*, występującego w 2/84 analizowanych próbek, w raku mieszanym, oraz raku rozlanym.

Opis poszczególnych przypadków, oraz wyniki sekwencjonowania dodatkowych prążków przedstawiono w poniższych tabelach. Na niebiesko zaznaczono przypadki nie opisywanego dotychczas polimorfizmu w eksonie 14 genu *CDH1*. Na czerwono zaznaczono zmiany, które po analizie sekwencjonowania określono jako przypadkowo wykryte mutacje germinalne. Zmiany te dokładniej zostały opisane w podrozdziale dotyczącym mutacji.

W poniższej tabeli nie zaznaczono przypadków wykazujących polimorfizm w kodonie 692 *E-kadheryny*, gdyż zmiana ta w postaci homo i heterozygoty dotyczyła 62/84 przypadków. Ten wariant alleliczny został opisany osobno.

Nr przyp.	Płeć	Wiek	Wielkość guza [cm]	% węzłów z przerzutem	Klasyfikacja Lauren'a	Polimorfizm SSCP	Zmarł
17	M	57	7	0	Rozlany	EX 12	NIE
18	M	70	5	32	Mieszany	INT 4	TAK
20	K	70	9	50	Mieszany	EX 6	TAK
35	M	65	10	92	Rozlany	INT 4 EX 14	TAK
39	M	72	11	32	Rozlany	EX 4	TAK
41	M	35	6	0	Rozlany	INT 4 EX 14	NIE
46	K	65	3	14	Jelitowy	INT 4 LOH w tkance nowotworowej	TAK
51	K	61	4	0	Rozlany	INT 4	NIE
59	M	44	8	62	Mieszany	EX 14	TAK
71	M	71	10	80	Mieszany	INT 4	TAK

Tab. 3: Dane kliniczne charakteryzujące poszczególne przypadki raków żołądka, wykazujące w analizie SSCP „dodatkowe" prążki. Bardzo powszechny polimorfizm w eksonie 13 *CDH1* został opisany osobno.

Poniżej w tabeli przedstawiono szczegółowy opis wykrytych polimorfizmów genu *CDH1*, poza opisanym osobno, powszechnym polimorfizmem w kodonie 692 w eksonie 13:

Nr przyp.	Polimorfizm	Wynik sekwencjonowania	Kodon	Efekt na poziomie aa/białka	Długość przeżycia
17	EX 12	(1896) CAC -> CAT: His -> His	632	BRAK (SILENT)	ŻYJE
18	INT 4	(531+10) G -> C	EX4+10	NIEZNANY	5 mies.
20	EX 6	(932) TCT->ACT: Ser->Thr	270	ob. polarny -> ob. polarny domena N-terminalna	4,5 mies.
35	INT 4 EX 14	(531+10) G -> C (2194) CGG->AGG: Arg -> Arg	EX4+10 732	NIEZNANY BRAK (SILENT)	5 mies.
39	EX 4	(465) GAC ->GAG: Asp -> Glu	135	kw. polarny-> kw. polarny domena N-terminalna	5,5 mies.
41	INT 4	(531+10) G -> C	EX4+10	NIEZNANY	ŻYJE
46	INT 4	(531+10) G -> C	EX4+10	NIEZNANY	18 mies.
51	INT 4	(531+10) G -> C	EX4+10	NIEZNANY	ŻYJE
59	EX 14	(2194) CGG->AGG: Arg -> Arg	732	BRAK (SILENT)	61 mies.
71	INT 4	(532-8) G -> C	EX5-8	Nieprawidłowy *splicing*	4,5 mies.

Tab. 4: Wyniki sekwencjonowania „dodatkowych" prążków otrzymanych metodą SSCP, obecnych zarówno w tkance kontrolnej, prawidłowej, jak i nowotworowej. Na niebiesko zaznaczono nie opisywany dotychczas polimorfizm, na czerwono przypadkowo wykryte mutacje germinalne. Efekt opisanych wcześniej polimorfizmów, zaznaczony, jako „nieznany", przytaczany jest za publikacjami źródłowymi.

Zmiana w eksonie 14-tym, obecna zarówno w tkance kontrolnej, jak i nowotworowej, została zakwalifikowana jako polimorfizm ze względu na jej częstość występowania w badanej grupie u osób nie spokrewnionych (2,4%) oraz efekt zmiany na poziomie białka *(silent)*. Pod względem występowania, polimorfizm ten może mieć charakter lokalny.

Powszechny polimorfizm w eksonie 13, w kodonie 692 występuje w przedstawionych przez nas badaniach w 74% przypadków. Warto zwrócić uwagę, że zmiana ta (2076 GCC->GCT: Ala->Ala) jest bardzo powszechna i występuje zarówno w postaci homo-

(C-C i T-T), jak i heterozygotycznej (T-C). Poniżej, w tabeli przedstawiono odsetek poszczególnych wariantów polimorficznych w kodonie 692 w badanej grupie:

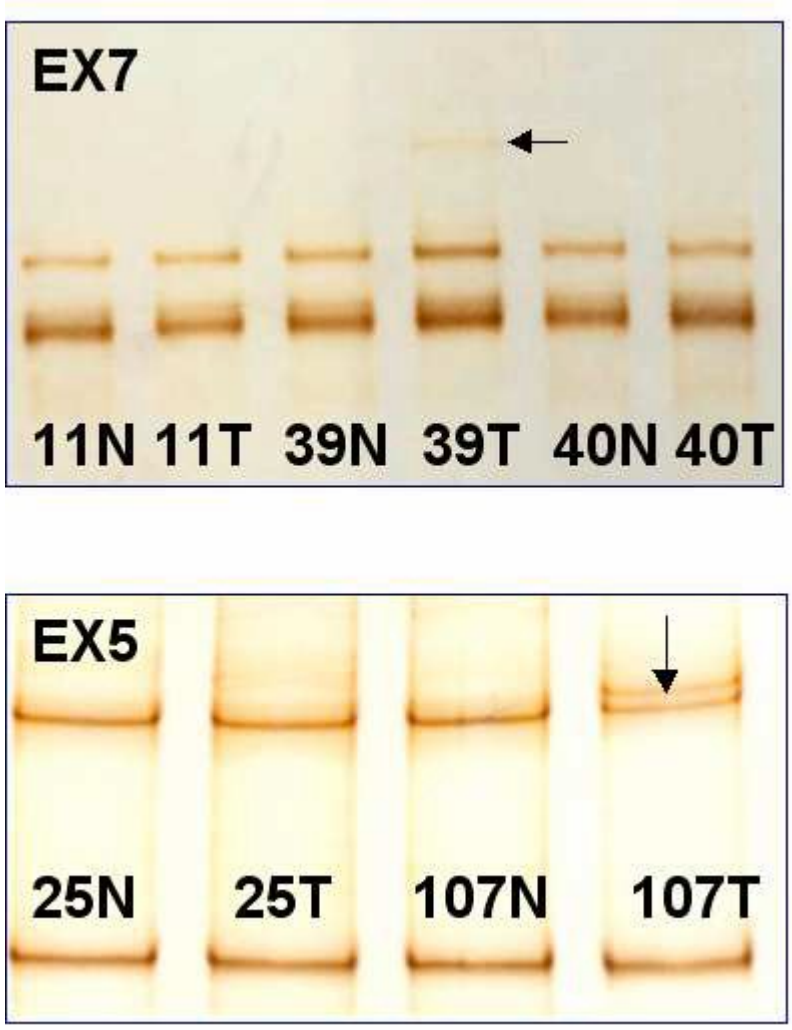
Odsetek wariantów polimorficznych w kodonie 692 w badanej grupie		
C-C	C-T	T-T
14% (12/84)	60% (50/84)	26% (22/84)

Tab. 5: Odsetek poszczególnych wariantów allelicznych w kodonie 692, w genie *CDH1.*

W jednym przypadku (nr 46), w raku jelitowym, wykryto utratę heterozygotyczności w guzie, w przypadku polimorfizmu w intronie 4 (EX4+10). Pacjentka lat 65 zmarła po 18 miesiącach. W momencie rozpoznania, średnica guza wynosiła 3 centymetry, w 14% okolicznych węzłów chłonnych wykryto komórki nowotworowe.

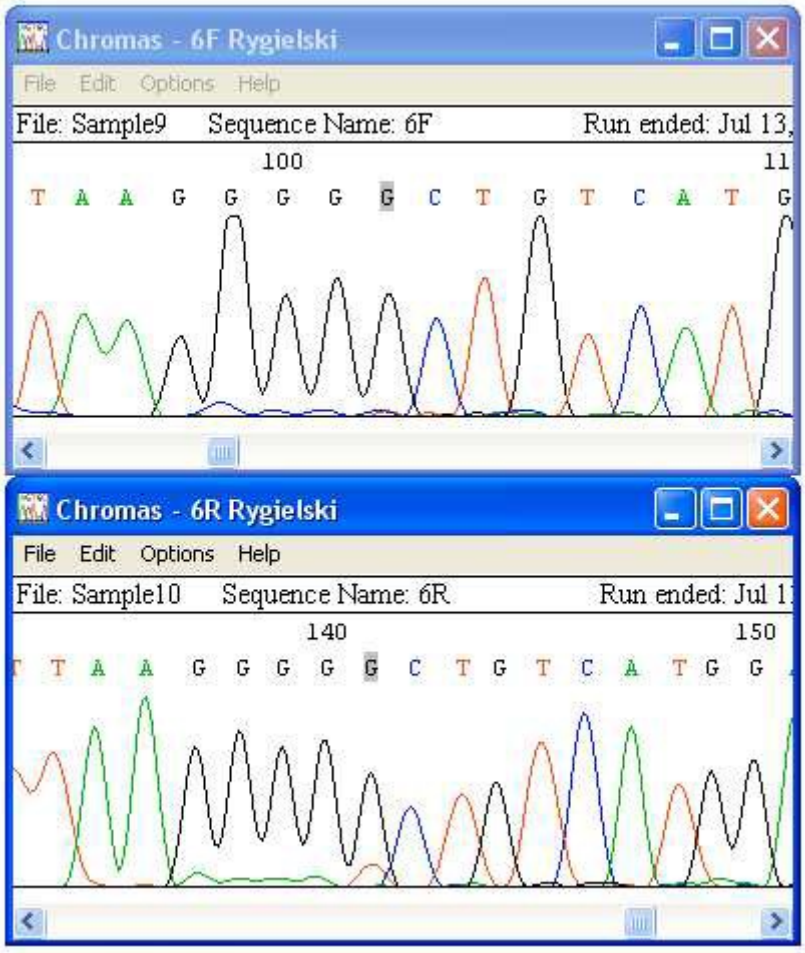
5.3. Analiza mutacji w genie CDH1 w zbiorze sporadycznych raków żołądka

W badanym za pomocą metody SSCP oraz sekwencjonowania materiale, jako mutacje opisano zmiany występujące wyłącznie w tkance nowotworowej. 15,5% (13/84) przypadków wszystkich analizowanych w tym projekcie raków żołądka wykazywało zmiany wstępnie zakwalifikowane jako mutacje na podstawie analizy SSCP, gdzie dodatkowy prążek występował jedynie w tkance guza (T).



Rys. 19: Przykładowe zdjęcie losowo wybranych żeli MDE, gdzie dzięki technice SSCP wykazano obecność dodatkowych prążków, odpowiadających amplikonowi 7 i 5 genu *CDH1*. Zmiany mają charakter mutacji: EX 7-(1116) ACT->ATT: Thr->Ile, EX5 (654) GAG->GAT: Glu->Asp. Dodatkowe prążki dotyczyły wyłącznie tkanki nowotworowej (T).

Następnie, dodatkowe prążki poddawano sekwencjonowaniu. Poniżej przedstawiono przykładowy wynik sekwencjonowania dodatkowego prążka w tkance nowotworowej:




```
Query: 42  atcacggtaaccgatcagaatgacaacaagcccgaattcacccaggaggtctttaagggg 101
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 872 atcacggtaaccgatcagaatgacaacaagcccgaattcacccaggaggtctttaagggg 931


Query: 102 gctgtcatggaaggtgctcttccagg 127
            |||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 932 tctgtcatggaaggtgctcttccagg 957
```

Rys 20: Wynik sekwencjonowania dodatkowego prążka obecnego w tkance nowotworowej przypadku nr 115 dla eksonu 6 genu *CDH1* na nici wiodącej (F) i dla potwierdzenia prawidłowości oznaczenia na nici opóźnionej (R) w formacie *„Reverse Compliment"*. W prawidłowym genie *CDH1* w miejscu zaznaczonym powinna występować tymina (T). Obecność w tym miejscu guaniny (G) wskazuje na obecność mutacji.

Opis poszczególnych przypadków, oraz wyniki sekwencjonowania dodatkowych prążków przedstawiono w poniższych tabelach. Na czerwono zaznaczono przypadkowo

wykryte mutacje germinalne, które w analizie SSCP początkowo, ze względu na obecność dodatkowych prążków zarówno w tkance nowotworowej, jak i kontrolnej, uznano za polimorfizmy. Należy podkreślić, że u chorych, u których wykryto mutacje germinalne, nie były odnotowane jakiekolwiek zachorowania na raka żołądka wśród krewnych. Jedynie w przypadku nr 20, już w 2005 roku otrzymano dodatkowe informacje o wystąpieniu raków przewodu pokarmowego u ojca i brata chorej, nie dysponowano jednak bardziej dokładnymi danymi mówiącymi o lokalizacji nowotworu czy wieku zachorowania.

Nr przyp.	Płeć	Wiek	Wielkość guza [cm]	% węzłów z przerzutem	Klasyfikacja Lauren'a	Mutacja SSCP	Zmarł
8	M	64	10	59	Mieszany	INT 6	TAK
10	M	75	6,5	91	Rozlany	EX 8	TAK
20	K	70	9	50	Mieszany	EX 6 EX 12	TAK
26	M	64	8	19	Mieszany	INT 4	TAK
28	K	44	2	50	Rozlany	EX 10	TAK
33	K	54	12	100	Rozlany	EX 10	TAK
39	M	72	11	32	Rozlany	EX 4 EX 7	TAK
41	M	35	6	0	Rozlany	EX 14	NIE
47	K	62	11	10	Mieszany	EX 4	TAK
59	M	44	8	62	Mieszany	INT 6	TAK
71	M	71	10	80	Mieszany	INT 4 INT 5	TAK
107	M	68	7	67	Jelitowy*	INT 3 EX 5	TAK
115	M	30	8	50	Mieszany	EX 6	TAK

* Rak zakwalifikowany jako typ jelitowy wg Lauren'a, o niskim stopniu zróżnicowania. W utkaniu dominowały obszary lite.

Tab. 6: Dane kliniczne charakteryzujące poszczególne przypadki raków żołądka, wykazujące mutacje. Na czerwono zaznaczono mutacje germinalne (prążki na żelu MDE w tkance N i T, które po analizie metodą sekwencjonowania okazały się mutacjami).

Nr przyp.	Miejsce mutacji	Wynik Sekwencjonowania	Kodon	Typ mutacji	Efekt na poziomie aa/białka	Przeżycie
8	INT 6	(833+1) G -> A heterozygota	EX6+1	*Splice-site*	Zaburzenie *splicingu*	75 mies.
10	EX 8	(1078) ACA -> GCA: Thr->Ala heterozygota	360	Zmiany sensu (tranzycja) A->G	ob. polarny -> ob. niepolarny Brak ekspersji błonowej białka w badaniu metodą immunohistochemii, bardzo silna ekspresja cytoplazmatyczna	4,5 mies.
20	EX 12 EX 6	Bardzo zredukowana amplifikacja eksonu 12 *obydwa allele?* (808) TCT->ACT: Ser->Thr	571-645 270	Prawdo-podobnie delecja transwersja T->A	Fragment domeny odpowiedzialnej za przyłączanie kationów wapnia ob. polarny -> ob. polarny domena N-terminalna	4,5 mies..
26	INT 4	(532-14) C -> T heterozygota	EX5-14	Intronowy pseudo-ekson	Nieprawidłowy *splicing*. Bardzo słaba ekspresja błonowa białka w badaniu metodą immunohistochemii, częściowa ekspresja cytoplazmatyczna	16 mies.
28	EX 10	(1373) AAT ->ACT: Asn->Thr heterozygota	458	transwersja A->C	ob. polarny -> ob. polarny Domena transbłonowa, obok domeny wiążącej wapń. Słaba ekspresja błonowa białka w badaniu metodą immunohistochemii, częściowa ekspresja cytoplazmatyczna	7,5 mies.
33	EX 10	(1369) ACG -> TCG: Thr->Ser heterozygota	457	transwersja A->T	ob. polarny-> ob. polarny Domena transbłonowa, obok domeny wiążącej wapń. Bardzo słaba ekspresja błonowa białka w badaniu metodą immunohistochemii	1 tydz.

39	EX 4 EX 7	(465) GAC -> GAG: Asp -> Glu heterozygota (992) ACT -> ATT: Thr->Ile heterozygota	135 331	Transwersja: C->G Tranzycja: C->T	kw. polarny-> kw. polarny domena N-terminalna ob. polarny-> ob. niepolarny kieszeń wiążąca kationy wapnia Brak ekspresji błonowej czy cytoplazmatycznej białka w guzie.	5,5 mies. 5,5 mies.
41	EX 14	(2252) AAC->ACC: Asn -> Thr heterozygota	751	Transwersja A->C	ob. polarny -> ob. polarny Pomimo prawidłowej ekspresji błonowej, obecna wysoka ekspresja cytoplazmatyczna E-kadheryny.	ŻYJE
47	EX 4	(523) CTG->GTG: Leu ->Val heterozygota	155	Transwersja C->G	ob. niepolarny-> ob. niepolarny	21 mies.
59	INT 6	(833+43) G -> T heterozygota	EX6+43	Intronowy pseudo-ekson	Nieprawidłowy *splicing*. Pomimo prawidłowej ekspresji błonowej, obecna wysoka ekspresja cytoplazmatyczna E-kadheryny.	61 mies.
71	INT 4 INT 5	(532-8) G -> C heterozygota (687+15) G ->T heterozygota	EX5-8 EX5+15	Intronowy pseudo-ekson *BRAK?*	Nieprawidłowy *splicing* Najprawdopodobniej nie wpływa na *splicing*.	4,5 mies.
107	INT 3 EX 5	(388-3) delT heterozygota (654) GAG ->GAT: Glu->Asp heterozygota	EX4-3 del T 218	Obok miejsca *Splice -site* Transwersja G ->T	Upośledzony *splicing* (89%) ob. polarny->ob. polarny	7,5 mies.
115	EX 6	(808) TCT ->GCT: Ser->Ala heterozygota	230	Transwersja T ->G	ob. polarny->ob. niepolarny	15 mies.

Tab. 7: Wyniki sekwencjonowania „dodatkowych" prążków otrzymanych metodą SSCP, obecnych wyłącznie w tkance nowotworowej. Na czerwono zaznaczono przypadkowo wykryte mutacje germinalne.

Teoretyczne określenie wpływu poszczególnych mutacji intronowych na *splicing* wykonano na podstawie analizy zmiany parametru Ri zarówno dla sekwencji wzorcowej, jak i sekwencji wykazującej mutację. Wyniki i ich interpretację przedstawiono w poniższej tabeli:

Nr przyp.	mutacja	Ri początkowe („wild type")	Ri końcowe (mutacja)	ΔRi	Siła wiązania [%] *	Upośledzenie *splicingu*
8	EX6+1 **(Donor)** (833+1) G ->A	5,9	-6,9	12,8	-	TAK (całkowite)
26	EX5-14 (532-14) C ->T	8,7	9,1	0,4	134,9	INTRONOWY PSEUDOEKSON
59	EX6+43 (833+43) G ->T	2,5	3,4	0,9	184,9	INTRONOWY PSEUDOEKSON
71	**germinalna** EX5-8 (532-8) G -> C	14,8	16,8	1,9	381,3	INTRONOWY PSEUDOEKSON
71 (2)	EX5+15 (684+15) G ->T	7,2	7,2	0	100	NIE
107	EX4-3 (512-3) delT	14,4	14,3	0,2	89,3	TAK (zmniejszony)

* siła wiązania – wskazuje zmiany energii wiązania (końcowa/początkowa, wyrażona w procentach)

Tab. 8: Wyniki analizy mutacji intronowych, predykcyjna wartość ΔRi, oraz interpretacja wpływu mutacji na *splicing*

Po przeprowadzeniu sekwencjonowania odsetek przypadków wykazujących mutację w *genie E-kadheryny* nie zmienił się i wynosił 15,5% (13/84), należy jednak podkreślić, że 4/12 przypadków (33%), wykazywało obecność dwóch mutacji w genie *CDH1*.

Warto zaznaczyć, iż czułość metody SSCP dla analizowanych przez nas fragmentów wynosi 95-99%. Dla pewności przesekwencjonowano więc dodatkowo wszystkie amplikony, które analizowano uprzednio metodą SSCP, we wszystkich przypadkach wykazujących zaburzenia ekspresji białkowej. Nie wykryto jednak jakichkolwiek dodatkowych zaburzeń na poziomie nukleotydowym w obrębie analizowanych fragmentów.

Typ histologiczny raka a mutacje CDH1.

Uzyskane w ten sposób dane pozwoliły określić procentowy odsetek udziału mutacji w poszczególnych typach histologicznych raka żołądka w naszym archiwum. Wszystkie wykryte mutacje dotyczyły raków typu rozlanego, mieszanego, bądź nisko zróżnicowanego raka typu jelitowego (1 przypadek). Wyniki te zebrano poniżej:

Jelitowy (niskozróżnicowany)	Mieszany	Rozlany
3,3% (1/30)	22% (6/27)	18% (5/27)

Tab. 9: Odsetek mutacji w poszczególnych typach histologicznych raka wg klasyfikacji Lauren'a

Infekcja EBV a mutacje CDH1

W 40% raków wykazujących obecność wirusa EBV (2/5) wykazano obecność mutacji *CDH1*. Raki te pochodziły od mężczyzn. Jeden z nich był zlokalizowany w trzonie (przypadek nr 59), drugi w obrębie odźwiernika (przypadek nr 41). Przypadek 41 wykazywał mutację w eksonie 14 i pochodził od młodego, 35-cioletniego mężczyzny. Pacjent ten pomimo dużego guza (6 cm) i niskozróżnicowanego, rozlanego raka żołądka z naciekiem na dwunastnicę, żyje nadal. Jako jedyny wśród raków EBV-pozytywnych z naszego archiwum, rak ten był zlokalizowany w odźwierniku.

Dwa raki wykazujące mutację przy równoczesnym zakażeniu wirusem EBV wyróżniają się na tle pozostałych raków: są to raki, które pojawiły się u pacjentów stosunkowo młodych, odpowiednio: (35 i 44 lata), gdy pozostałe raki EBV(+) dotyczyły osób po 60-tym roku życia: (66, 63, 65 lat).

Chorzy z rakami EBV(+) wykazującymi mutację *CDH1* żyli znacznie dłużej: (1894 dni i żyje nadal, oraz 1834 dni), gdy chorzy bez mutacji w tym genie żyli krócej: (821, 366, 106 dni). U chorych EBV(+) mut(-) nowotwory wykazywały nieco wyższy stopień zaawansowania klinicznego, który wynosił odpowiednio: VI, IIIB, IIIB , gdy w rakach EBV(+) mut(+): II i IIIa. Kolejna różnica dotyczyła odsetka przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych:

EBV(+) mut(+): 0% i 62% oraz EBV(+) mut(-): 70-96% i lokalizacji - EBV(+) mut(+): odźwiernik i trzon, EBV(+) mut(-): trzon, trzon i wpust. Występowała również niewielka różnica w rozmiarach guzów: EBV(+) mut(+): 6-8 cm oraz EBV(+) mut(-): 8-10 cm (średnia w badanej grupie sporadycznych raków żołądka to 7,8 cm).

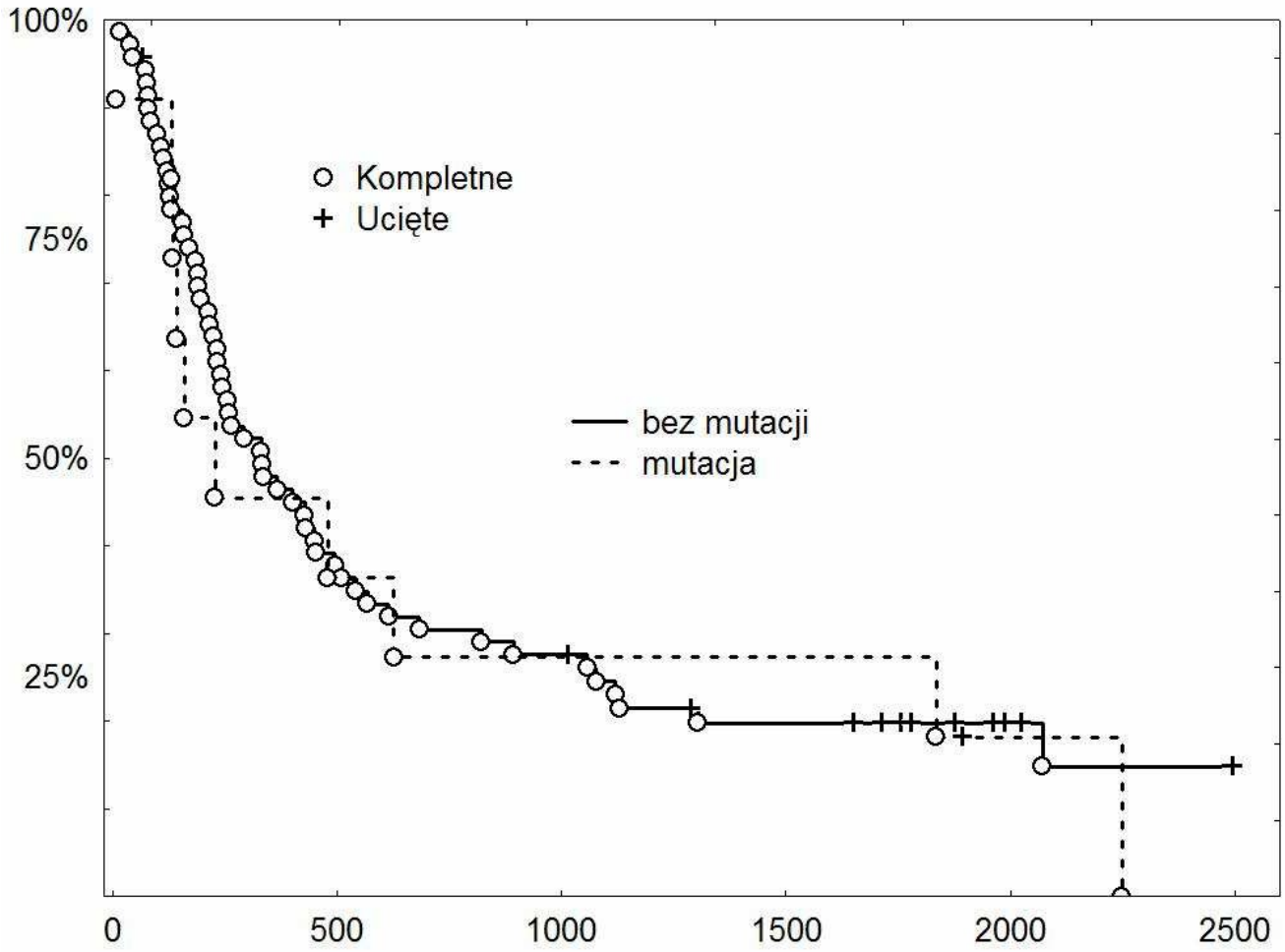
Należy dodać, iż pomiędzy rakami EBV(+) z mutacjami *CDH1* a rakami EBV-pozytywnymi bez mutacji, nie wykazano różnic w typie histologicznym raka (raki mieszane i rozlane), stopniu zróżnicowania (wszystkie raki G3), natomiast wg klasyfikacji Goseki do raków w grupie EBV(+) mut(+) należały raki Goseki III i I, a do grupy EBV(+) mut(-): dwa raki Goseki II i jeden IV.

Mutacje w CDH1 a przeżycie

Pośród osób wykazujących mutację, tylko jedna osoba nadal żyje, wykazując ponad pięcioletnie przeżycie. Jest to chory z rozlanym rakiem żołądka, wykrytym w wieku 35-ciu lat. Pomimo dużych rozmiarów guza (6 cm) nie doszło do inwazji węzłów okołożołądkowych. Chory zakończył pomyślnie leczenie chemioterapią i obecnie jest uznawany za całkowicie wyleczonego.

Analizując zależność przeżycia od obecności mutacji, posłużono się testem Kaplana-Meier'a. Wynik tej analizy świadczy o braku zależności pomiędzy skumulowanym prawdopodobieństwem przeżycia, a występowaniem mutacji, co pozostaje w zgodzie z poprzednimi obserwacjami dokonanymi na tej grupie chorych [159].

Wyniki te po uwzględnieniu dodatkowych danych odnośnie mutacji i przeżywalności przedstawiono poniżej:



Wykr. 1: Skumulowana proporcja przeżywających Kaplana-Meier'a. Dane zgrupowano w zależności od występowania, bądź nie, zjawiska mutacji w obrębie genu *CDH1*.

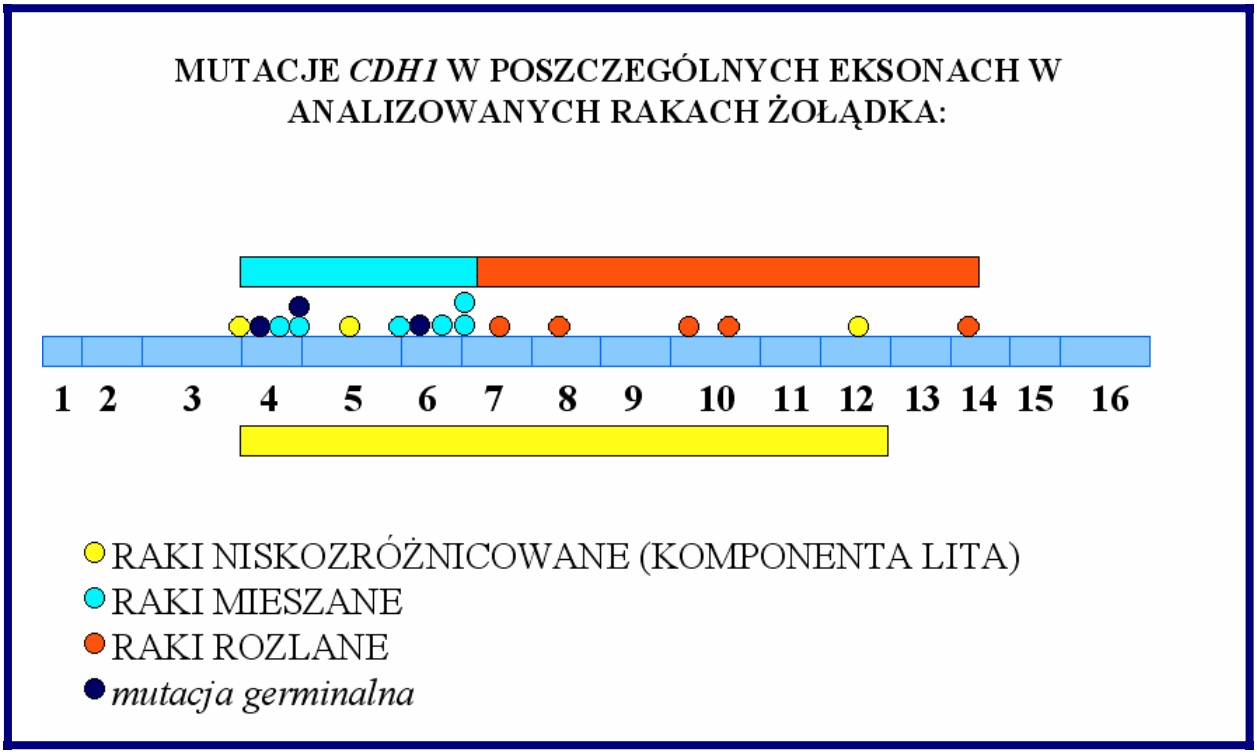
Rozmieszczenie mutacji sporadycznych w obrębie genu CDH1

Bardzo ciekawym wydaje się być rozmieszczenie mutacji sporadycznych w obrębie genu *CDH1*. Mutacje w rakach nisko zróżnicowanych wykazują *tendencję* do równomiernego rozproszenia i są rozmieszczone na obszarze pomiędzy intronem 3 a eksonem 12 genu *CDH1*.

Pojawiła się bardzo interesująca zależność rozmieszczenia mutacji od typu histologicznego raka żołądka dla grupy raków mieszanych i rozlanych. W analizowanym zbiorze raków żołądka mutacje sporadyczne w rakach rozlanych kumulują się w obrębie przedziału ekson 4 – początek intronu 6-go, gdy tymczasem mutacje sporadyczne w rakach mieszanych pojawiają się w obszarze ekson 7-ekson 14-sty. Mutacje sporadyczne *CDH1* w

guzach wykazujących komponentę litą wydają się być rozmieszczone wzdłuż genu bez jakichkolwiek preferencji lokalizacyjnych.

Wyniki przedstawiono na poniższym rysunku:



Rys. 21: Rozmieszczenie mutacji w obrębie genu *CDH1* w zależności od typu histologicznego raka żołądka. Dodatkowo, na wykresie zaznaczono na żółto raki charakteryzujące się komponentą litą: jeden rak niskozróżnicowany, jelitowy oraz jeden przypadek niskozróżnicowanego raka mieszanego. Oba te raki cechowały rozległe obszary lite.

Przedstawiona na schemacie *tendencja* nie była do tej pory opisywana, jednak wyniki te nie pozostają w sprzeczności z poprzednimi doniesieniami.

Cechy wspólne mutacji germinalnych

Wykrycie w grupie raków uznawanych za sporadyczne trzech przypadków mutacji germinalnych było dużą niespodzianką. Przypadki te miały kilka bardzo interesujących cech wspólnych, które w poniższej tabeli zaakcentowano na niebiesko.

Dane porównawcze przedstawiono poniżej. Poszczególne dane zamieszczone w nawiasie dotyczą odpowiednio przypadków: 20, 39, 71 - pierwszy przypadek dotyczył kobiety. Pozostałe dwa to mężczyźni:

Cechy	Średnia	Komentarz
Wiek	71 lat	Wiek bardzo zbliżony (71,72,70 lat), średnia wieku w całej badanej grupie znacznie niższa: 62,7 lat
Długość przeżycia	141 dni	bardzo krótkie przeżycie (133, 159, 131 dni), średnia w całej badanej grupie znacznie wyższa: 685 dni
Lauren	-	cechą wspólną jest komponenta rozlana (mieszany, rozlany, mieszany)
Goseki	III	Wszystkie trzy raki należą do grupy Goseki III
T N M	- - -	(4, 4, 3) (3, 2, 3) (0, 1, 1) Wysoki stopień zaawansowania klinicznego, IV
Stopień zróżnicowania	3	Wszystkie raki wykazywały niski stopień zróżnicowania
Procent zajętych węzłów okołożołądkowych	54%	(50, 32, 80%) średni odsetek zajętych okolicznych węzłów chłonnych w całej badanej grupie wynosi ok. 53%
Wielkość guza	10 cm	Duże guzy (9, 11, 10 cm). Średnia wielkość guza w całej badanej grupie znacznie niższa: 7,8 cm
Wygląd makroskopowy	-	(wypukły, wypukły, płaski)
Część żołądka	-	(odźwiernik, cały, wpust)
Naciek dwunastnicy	-	Wszystkie trzy raki wykazywały naciek dwunastnicy, dla porównania w całej badanej grupie raków naciek dwunastnicy dotyczył 1/3 przypadków

Obecność drugiej mutacji w genie	-	dotyczyło wszystkich trzech przypadków
Fenotyp MSI	MSS	dotyczyło wszystkich trzech przypadków
Fenotyp LOH	LOH-S	dotyczyło wszystkich trzech przypadków
Obecność DNA EBV	-	(brak, brak, nie badany)
Metylacja promotora	TAK	dotyczyło wszystkich trzech przypadków, średni odsetek metylacji w całej badanej grupie wynosi ok. 55%
Chemioterapia	-	(NIE, NIE, EAP)

Tab. 10: Porównanie przypadków z mutacjami germinalnymi. Cechy wspólne guzów z mutacją germinalną *CDH1* zaznaczono na niebiesko.

Cechy wspólne sporadycznych mutacji CDH1 w intronie 6, zaburzających splicing

Dwa raki mieszane (przypadki 8 i 59) z mutacją w obrębie intronu 6-go (obie mutacje zaburzające *splicing*) wykazywały bardzo interesującą cechę wspólną: stosunkowo długie przeżycie, wynoszące odpowiednio 75 i 61 miesięcy. Po dokładniejszej analizie zauważalne stały się również inne wspólne cechy, które upodabniają do siebie te dwa guzy.

Dane porównawcze przedstawiono w poniższej tabeli. Poszczególne dane zamieszczone w nawiasie dotyczą odpowiednio przypadków: 8 i 59. Oba przypadki dotyczą mężczyzn:

Cechy	Średnia	Komentarz
Wiek	54±10 lat	Wiek różny (64 i 44 lata), średnia wieku w całej badanej grupie: 62,7 lat
Długość przeżycia	2042 dni	bardzo długie przeżycie (2249 i 1834 dni), średnia w całej badanej grupie znacznie niższa: 685 dni
Lauren	mieszany	cechą wspólną są zarówno komponenta jelitowa, jak rozlana
Goseki	I	obydwa raki należą do grupy Goseki I

T N M	- 2 0	(4, 2) (2, 2) (0, 0) (*Stage* IV i IIIa)
Stopień zróżnicowania	3	obydwa raki wykazywały niski stopień zróżnicowania
Procent zajętych węzłów okołożołądkowych	60%	(59, 61%) średni odsetek zajętych okolicznych węzłów chłonnych w całej badanej grupie jest nieco niższy i wynosi ok. 53%
Wielkość guza	9 cm	Duże guzy (10 i 8 cm). Średnia wielkość guza w całej badanej grupie niższa: 7,8 cm
Wygląd makroskopowy	wypukły	obydwa raki były wypukłymi guzami z owrzodzeniem wokół zmiany, naciek nie rozprzestrzeniał się do innych części żołądka, był ograniczony wokół guza.
Część żołądka	trzon	obydwa raki były guzami zlokalizowanymi w obrębie trzonu
Naciek dwunastnicy	NIE	Obydwa raki nie wykazywały nacieku dwunastnicy, w badanej przez nas grupie naciek dwunastnicy dotyczył 1/3 przypadków
Obecność drugiej mutacji w genie	NIE	brak drugiej mutacji w obydwóch przypadkach
Fenotyp MSI	MSI-high	Fenotyp MSI-high w całej badanej grupie występował w ok. 15% przypadków
Fenotyp LOH	-	(LOH-low, LOH-high)
Obecność DNA EBV	-	(NIE, TAK)
Metylacja promotora	TAK	średni odsetek metylacji w całej badanej grupie wynosi ok. 55%
Chemioterapia	NIE	w obydwóch przypadkach nie wprowadzono chemioterapii

Tab. 11: Porównanie przypadków z mutacjami w intronie 6. Cechy wspólne guzów z mutacją zaburzającą *splicing*, zlokalizowaną w intronie 6 zaznaczono na niebiesko.

5.4. Analiza metylacji promotora CDH1

W badanych przez nas przypadkach raków żołądka hipermetylacja promotora genu *CDH1* została wykazana w 54,8% (46/84) wszystkich analizowanych przypadków. W żadnej z analizowanych tkanek nie stwierdzono metylacji promotora w obrębie obydwóch alleli.

5.4.1. Metylacja promotora CDH1 a typ histologiczny raka

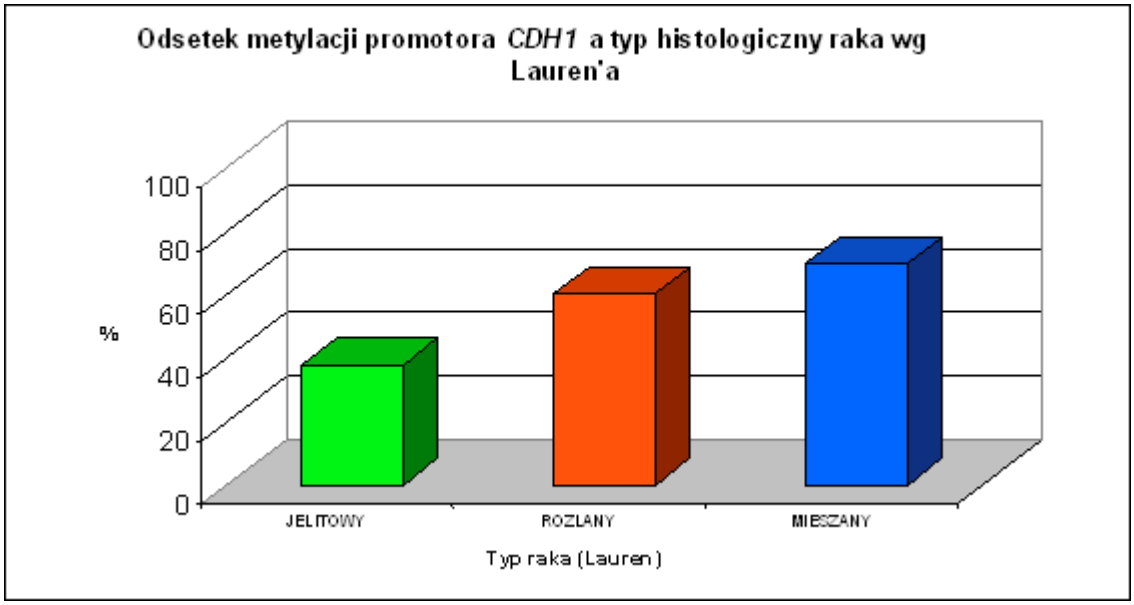
Klasyfikacja Lauren'a

Dokładna analiza zależności zjawiska hipermetylacji od typu histologicznego raka wg Lauren'a [158], przyniosła dodatkowe informacje. Okazało się, że 38% (12/32) raków żołądka typu jelitowego wykazuje hipermetylację promotora *CDH1*, natomiast zjawisko to dotyczyło aż 70% (19/27) raków mieszanych i 60% (15/25) raków typu rozlanego. Analizując wszystkie raki wykazujące komponentę rozlaną, czyli zarówno raki rozlane, jak i mieszane, 65% (34/52) wśród nich wykazywało hipermetylację w zakresie jednego allela. Wyniki zebrano w poniższej tabeli:

TYP HISTOLOGICZNY RAKA	METYLACJA PROMOTORA *CDH1*	BRAK METYLACJI PROMOTORA *CDH1*
ROZLANY	60%	40%
MIESZANY	70%	30%
JELITOWY	38%	62%

Tab. 12.: Odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* w różnych typach histologicznych raka żołądka (Lauren).

Powyższe wyniki przedstawiono na wykresie:



Wykr. 2: Odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* w zależności od typu histologicznego raka wg klasyfikacji Lauren'a.

Należy podkreślić, że powyższe wyniki nie mają charakteru istotnej statystycznie zależności, a p=0,3 (χ2 NW)

Klasyfikacja Goseki

Interesującą informacją wydaje się być istotna statystycznie zależność pomiędzy typem raka wg klasyfikacji Goseki [160] a metylacją promotora *CDH1*, gdzie p=0,01(χ2). Największy odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* wykazywały raki Goseki III (83%), a najniższy odsetek metylacji odnotowano w grupie IV (36%).

Wyniki zebrano w poniższej tabeli:

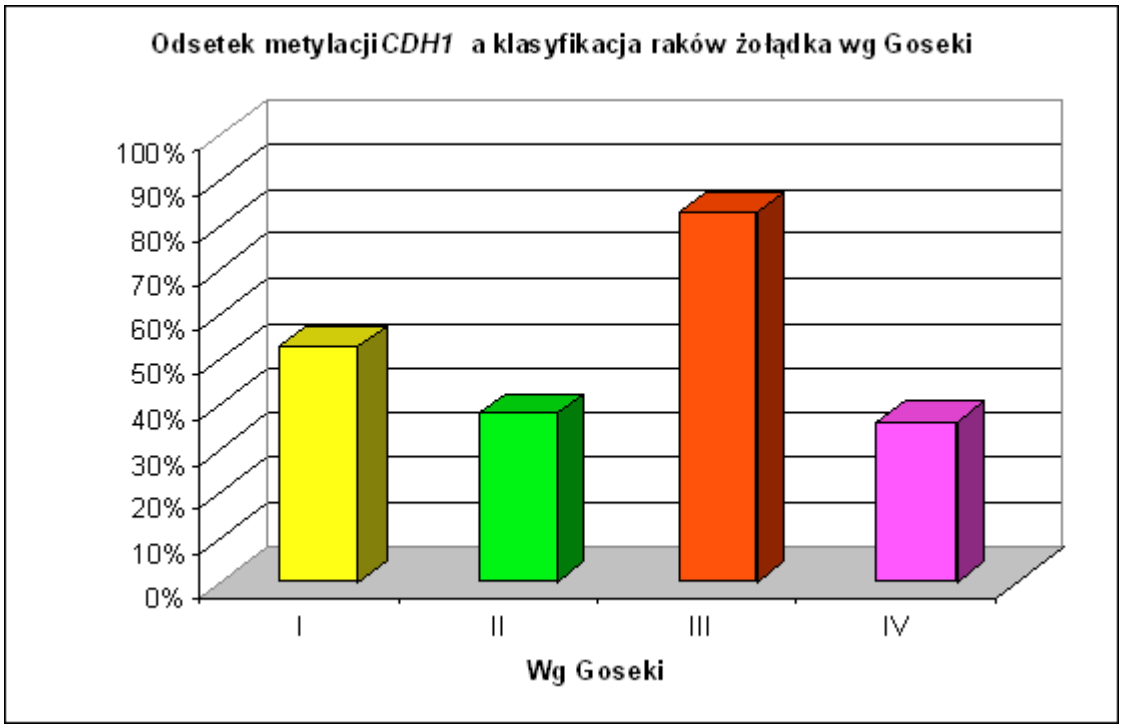
TYP wg GOSEKI	I	II	III	IV
ODSETEK METYLACJI	53%	38%	83%	36%

Tab. 13.: Odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* w różnych typach histologicznych raka żołądka (Goseki).

Analizując w ten sposób dane i porównując wyniki metylacji promotora *CDH1* w grupach raków Goseki I-IV, do „przeciętnego" odsetka metylacji (55%) w sporadycznych rakach żołądka, wyodrębniają się wyraźnie 3 grupy raków żołądka:

1. Grupa „neutralna" o przeciętnym odsetku metylacji promotora *CDH1* (53%): są to raki Goseki I.
2. Raki żołądka o niższym odsetku metylacji promotora od przeciętnej: są to raki Goseki stopnia II i IV (średnio 37%).
3. Raki żołądka o wyższym odsetku metylacji promotora (83%) od przeciętnej: są to raki Goseki III.

Zależność tego typu nie została do tej pory opisana. Wyniki te przedstawiono w formie graficznej na poniższym wykresie:



Wykr. 3: Odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* w zależności od typu histologicznego raka wg klasyfikacji Goseki.

5.4.2. Metylacja promotora CDH1 a wielkość guza

Zaobserwowano interesujący, wyraźny *trend* zależności wielkości guza od metylacji promotora *CDH1*. W teście U Mann-Whitney'a p=0,1, jednak otrzymany wynik jest na granicy istotności statystycznej, gdyż analizowano nie wyłącznie średnie, ale brano pod uwagę mediany.

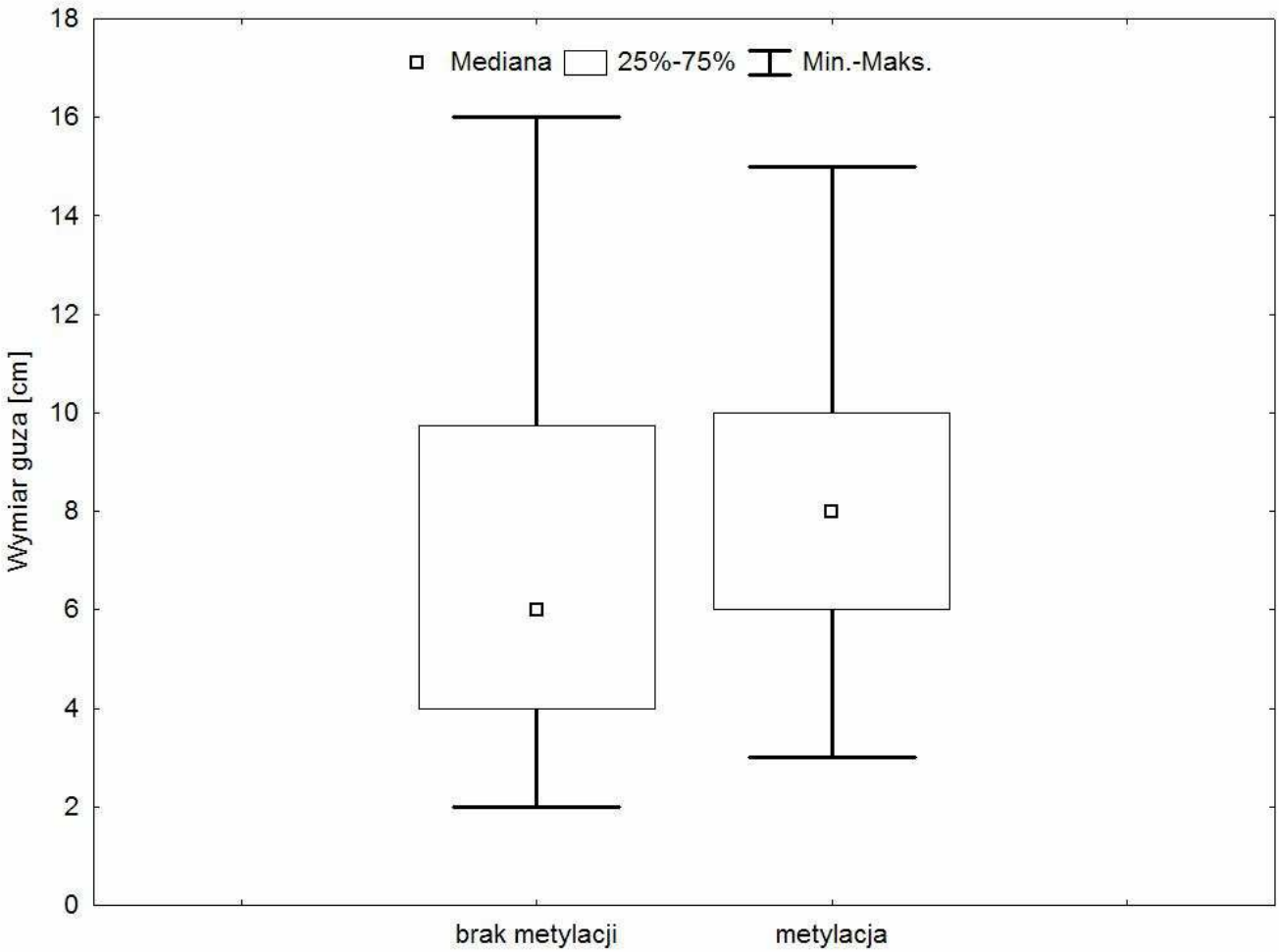
Obserwowana tendencja do osiągania przez guzy ze zmetylowanym promotorem *CDH1* większych rozmiarów (średnio 8,1cm), niż jest to w guzach nie wykazujących metylacji (średnio 7,2cm), jest bardzo ciekawa.

Mimo iż uzyskany wynik jest na granicy istotności statystycznej, dzięki analizie mediany *trend* ten zarysowuje się bardzo wyraźnie.

Wynik przedstawiono w tabeli i na wykresie:

	ŚREDNIA WIELKOŚĆ GUZA (cm)
METYLACJA PROMOTORA *CDH1*	8,1±3,6
BRAK METYLACJI PROMOTORA *CDH1*	7,2±2,6

Tab. 14.: Zależność wielkości guza od hipermetylacji w obrębie promotora *E-kadheryny*.



Wykr. 4: Zależność wielkości guza od metylacji w obrębie promotora *E-kadheryny*. Analiza przy użyciu mediany.

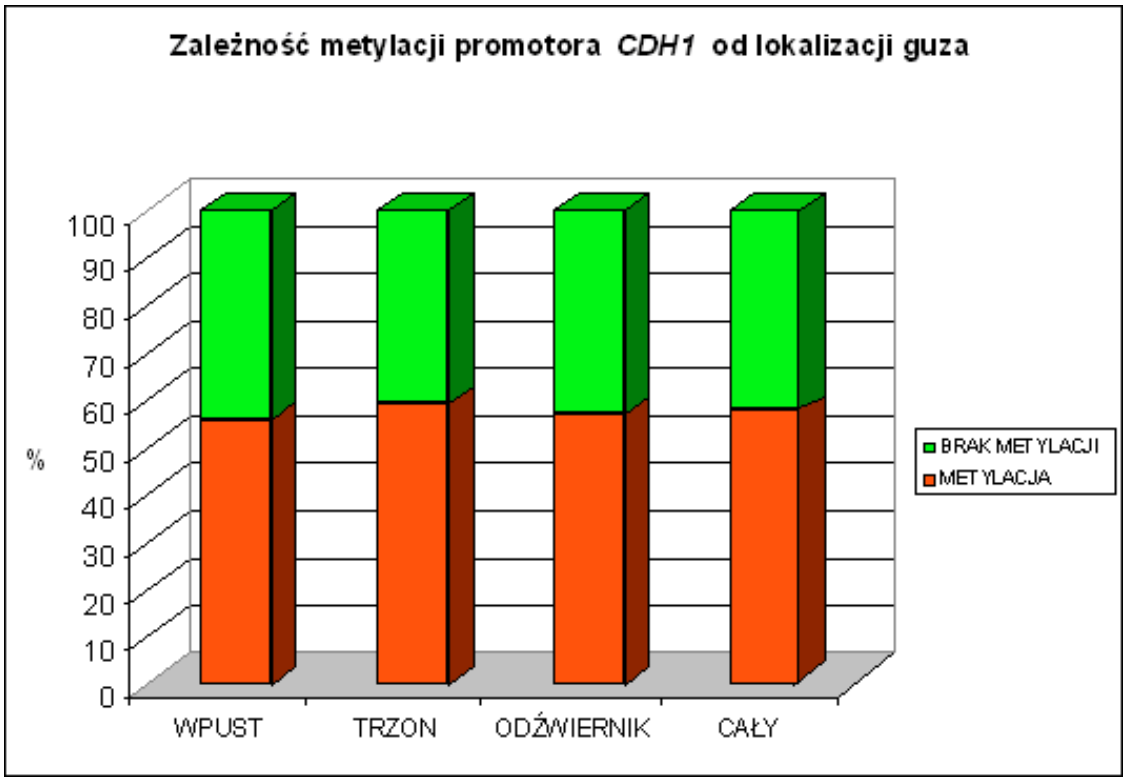
5.4.3. Metylacja promotora CDH1 a lokalizacja guza

Przeanalizowano zależność obecności metylacji promotora *CDH1* od lokalizacji guza. Analiza statystyczna nie wykazała istotnego statystycznie związku. Wyniki przedstawiono w poniższej tabeli:

	WPUST	TRZON	ODŹWIERNIK	CAŁY ŻOŁĄDEK
BRAK METYLACJI	44%	41%	43%	42%
HIPERMETYLACJA	56%	59%	57%	58%

Tab. 15: Odsetek metylacji oraz jej braku w obrębie promotora *E-kadheryny* w różnych częściach żołądka w rakach z naszego zbioru archiwalnego.

Raki okołowpustowe wykazywały 56% hipermetylacji w obrębie promotora genu *E-kadheryny*, w guzach bardziej odległych od wpustu, zlokalizowanych w obrębie trzonu, odsetek metylacji był nieco wyższy i wynosił 59%, natomiast w przypadku odźwiernika był on zaledwie o 1% wyższy niż w przypadku guzów zlokalizowanych okołowpustowo i wynosił 57%. Powyższe wyniki przedstawiono na wykresie nr 5:

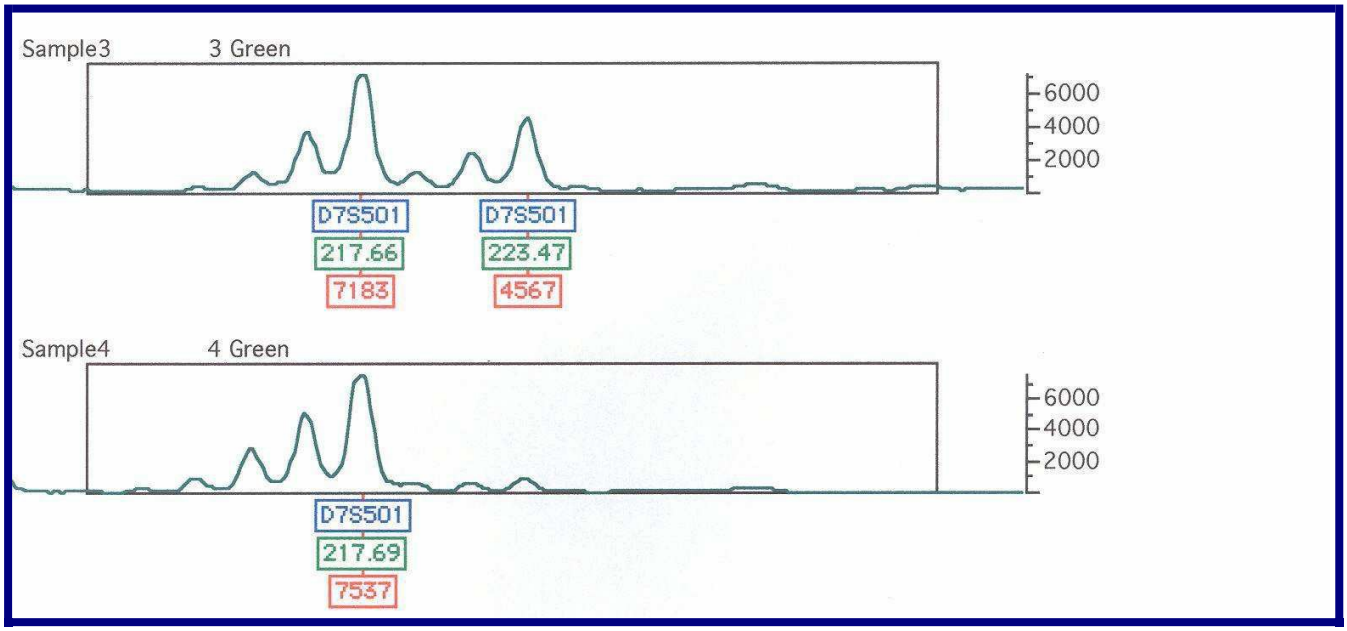


Wykr. 5: Odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* w zależności od lokalizacji nowotworu w obrębie żołądka.

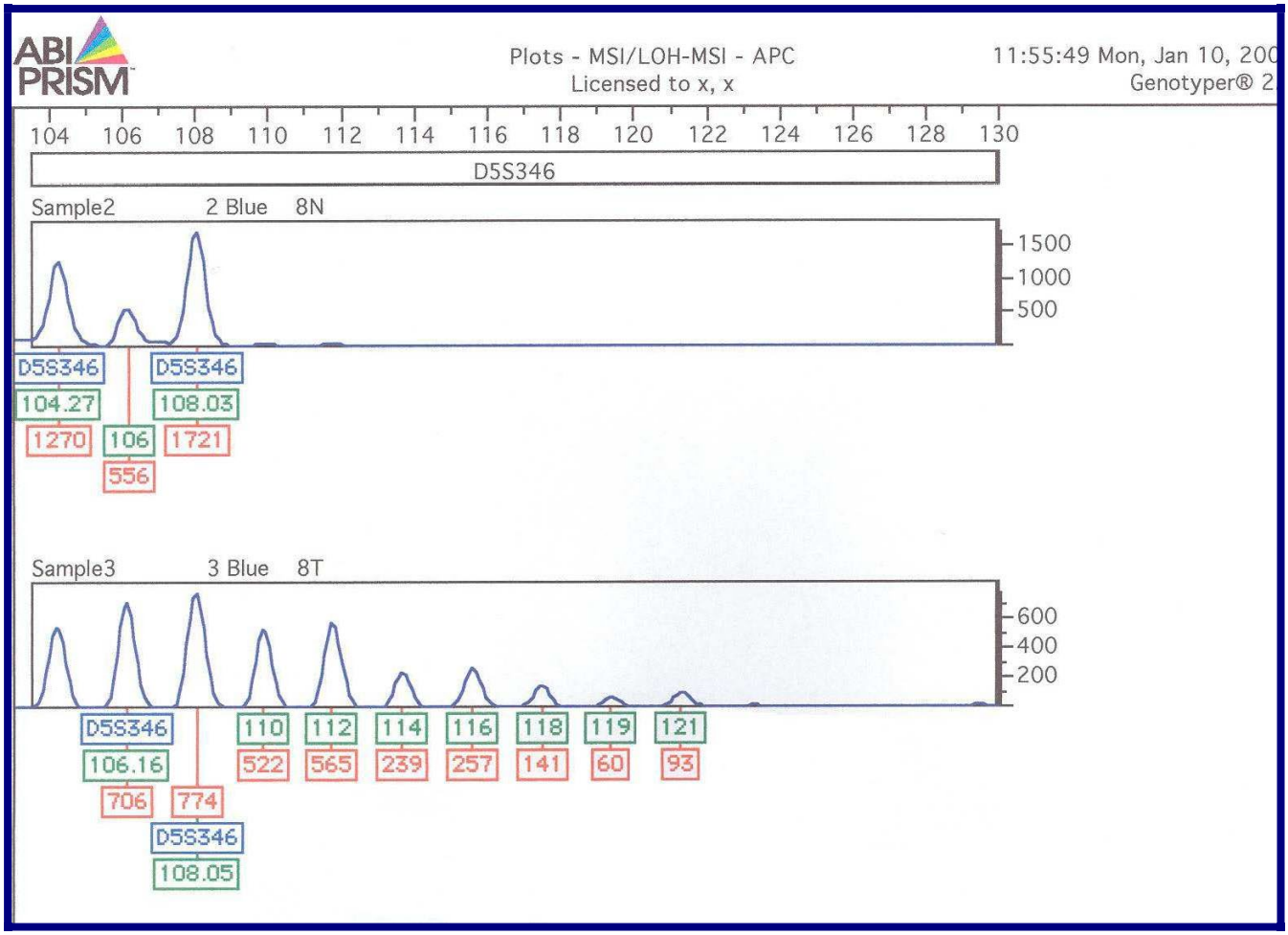
5.4.4. Metylacja promotora CDH1 a fenotyp MSI iLOH

Wyniki metylacji promotora *CDH1* porównano z uzyskanymi wcześniej w Zakładzie Patomorfologii CMUJ wynikami analizy niestabilności mikrosatelitarnego DNA oraz utraty heterozygotyczności w obrębie 12 markerów mikrosatelitarnych w badanej grupie raków żołądka (porównano 81 przypadków). Dokładna analiza zjawiska MSI oraz LOH była przedmiotem pracy doktorskiej dr n. med. Jacka Czopka [161].

Przykładowy wynik analizy MSI/LOH w raku żołądka przedstawiono na rys. nr 23 (MSI) oraz 22 (LOH):



Rys. 22: Przykładowy wynik analizy MSI/LOH, analizowany fragment odpowiada markerowi mikrosatelitarnemu D7S501 (MET). Próbka 4 odpowiada tkance nowotworowej raka żołądka, próbka 3 to nienowotworowa tkanka kontrolna (heterozygota). W fenotypie guza (homozygota) widoczne jest zjawisko utraty heterozygotyczności.

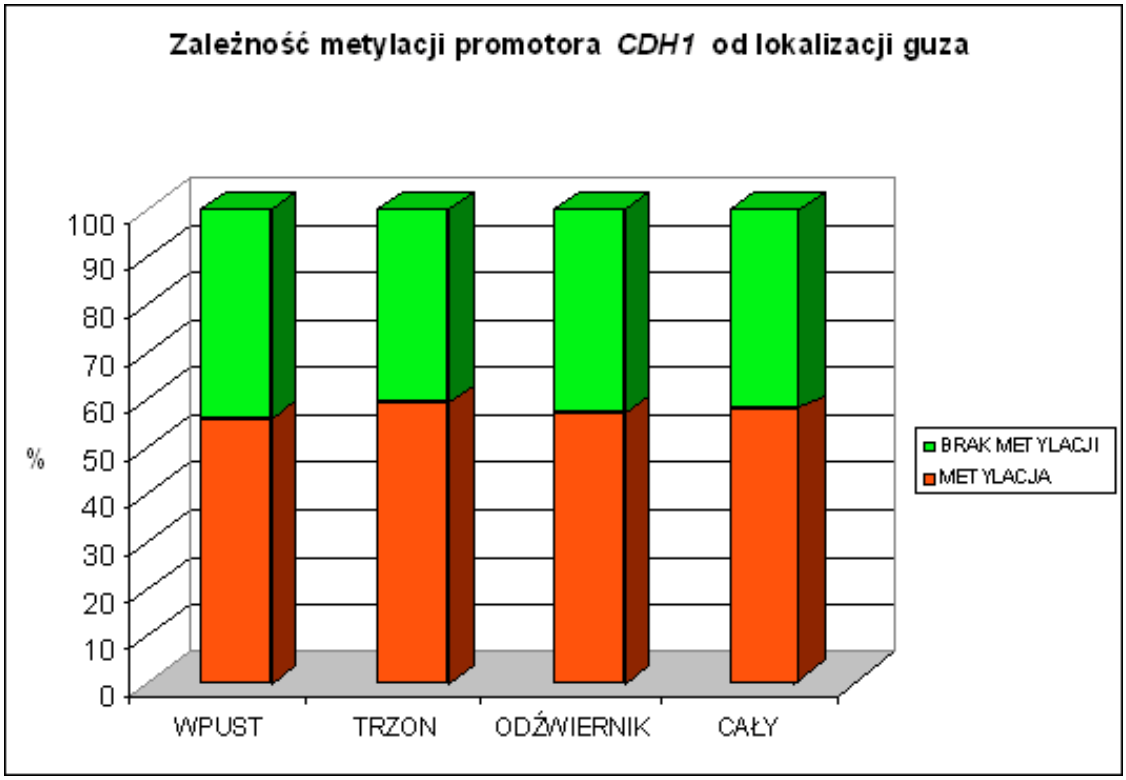


Rys. 23.: Przykładowy wynik analizy MSI/LOH, analizowany fragment odpowiada markerowi mikrosatelitarnemu D5S346 (APC). Próbka 3 odpowiada tkance nowotworowej raka żołądka, próbka 2 to nie nowotworowa tkanka kontrolna. W fenotypie guza widoczne są dodatkowe piki, świadczące o niestabilności mikrosatelitarnego DNA w tkance nowotworowej.

Wykazano zależność pomiędzy fenotypem MSI typu high a metylacją promotora *E-kadheryny*. W teście $\chi 2$ NW p wynosiło 0,00001

Hipermetylację promotora *CDH1* wykazano w 100% przypadków charakteryzujących się fenotypem niestabilności mikrosatelit wysokiego stopnia MSI-high (15/15), natomiast w przypadku raków żołądka o fenotypie MSI-low oraz rakach stabilnych mikrosatelitarnie (MSS) odsetek ten wynosił odpowiednio: 71,0% (5/7) i 41% (24/59).

Wyniki przedstawiono poniżej:

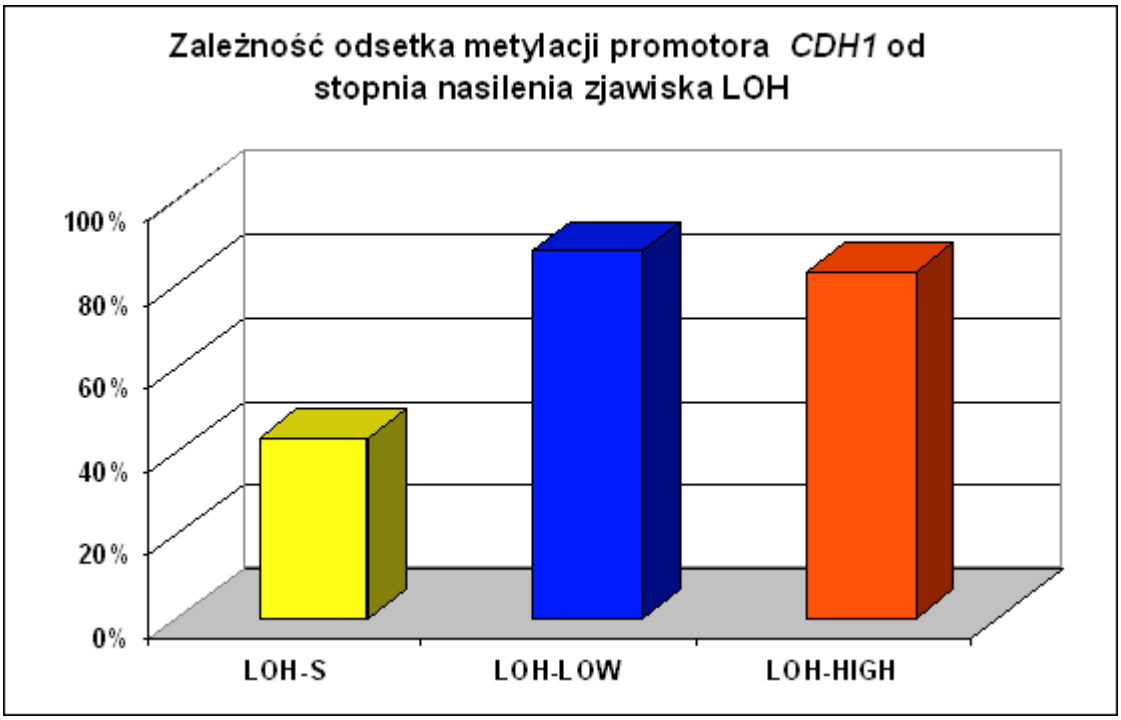


Wykr. 6: Zależność odsetka metylacji promotora *CDH1* od stopnia niestabilności mikrosatelitarnego DNA.

Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy fenotypem LOH a metylacją promotora *E-kadheryny*. W teście $\chi 2$ NW p=0,0008, w teście $\chi 2$ Pearson'a p=0,0016.

Hipermetylację promotora *CDH1* wykazano w 83% przypadków charakteryzujących się fenotypem LOH wysokiego stopnia - LOH-high (5/6), oraz 88% LOH niskiego stopnia - LOH-low (15/17), natomiast w przypadku raków żołądka stabilnych od względem LOH (LOH-S) odsetek ten wynosił zaledwie 43% (25/58).

Zależność przedstawiono na poniższym wykresie:



Wykr. 7: Zależność odsetka metylacji promotora *CDH1* od stopnia nasilenia zjawiska utraty heterozygotyczności w guzie.

Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy fenotypem MSI a wynikami barwienia metodą immunohistochemii w kierunku MLH2 (w teście $\chi 2$ p=0,01).

Nie wykazano zależności pomiędzy fenotypem MSI a ekspresją MLH1 badaną metodami immunohistochemicznymi.

5.4.5. Metylacja promotora CDH1 a zakażenie wirusem EBV

Zjawisko hipermetylacji w obrębie promotora *CDH1* porównano z uzyskanymi wcześniej wynikami hybrydyzacji *In situ* w kierunku wirusa EBV, wykonanej dla części przypadków raka żołądka, których analiza jest przedmiotem niniejszego opracowania. Wyniki zostały udostępnione dzięki uprzejmości autorów: mgr Anny Sińczak-Kuta oraz dr n. med. Jacka Czopka (Katedra Patomorfologii CMUJ) [33].

We wszystkich (100%) przypadkach guzów, gdzie wykazano obecność wirusa EBV, obserwowano zjawisko hipermetylacji promotora *CDH1* w zakresie jednego allela (5/5).

W przypadku grupy raków EBV(-) metylację promotora *CDH1* wykazano w 58% przypadków.

Wykazana zależność pomiędzy metylacją promotora *CDH1* a infekcją wirusem EBV dotyczyła bardzo małej grupy (pięciu) przypadków, a wynik ten nie jest istotny statystycznie. Jednostronny test Fisher'a, bardziej restrykcyjny pod względem analizy prawdopodobieństwa od testu $\chi 2$, określa p=0,0999.

5.4.6. Metylacja promotora CDH1 a płeć oraz wiek

Nie wykazano różnic w występowania zjawiska hipermetylacji promotora *CDH1* w zależności od płci. Zarówno u kobiet jak i u mężczyzn odsetek przypadków wykazujących metylację wynosił 55%.

Nie wykazano również jakichkolwiek istotnych statystycznie zależności metylacji promotora *CDH1* od wieku, lokalizacji, stopnia inwazji do okolicznych węzłów chłonnych, czy głębokości nacieku.

5.4.7. Metylacja promotora CDH1 a mutacje i polimorfizmy tego genu

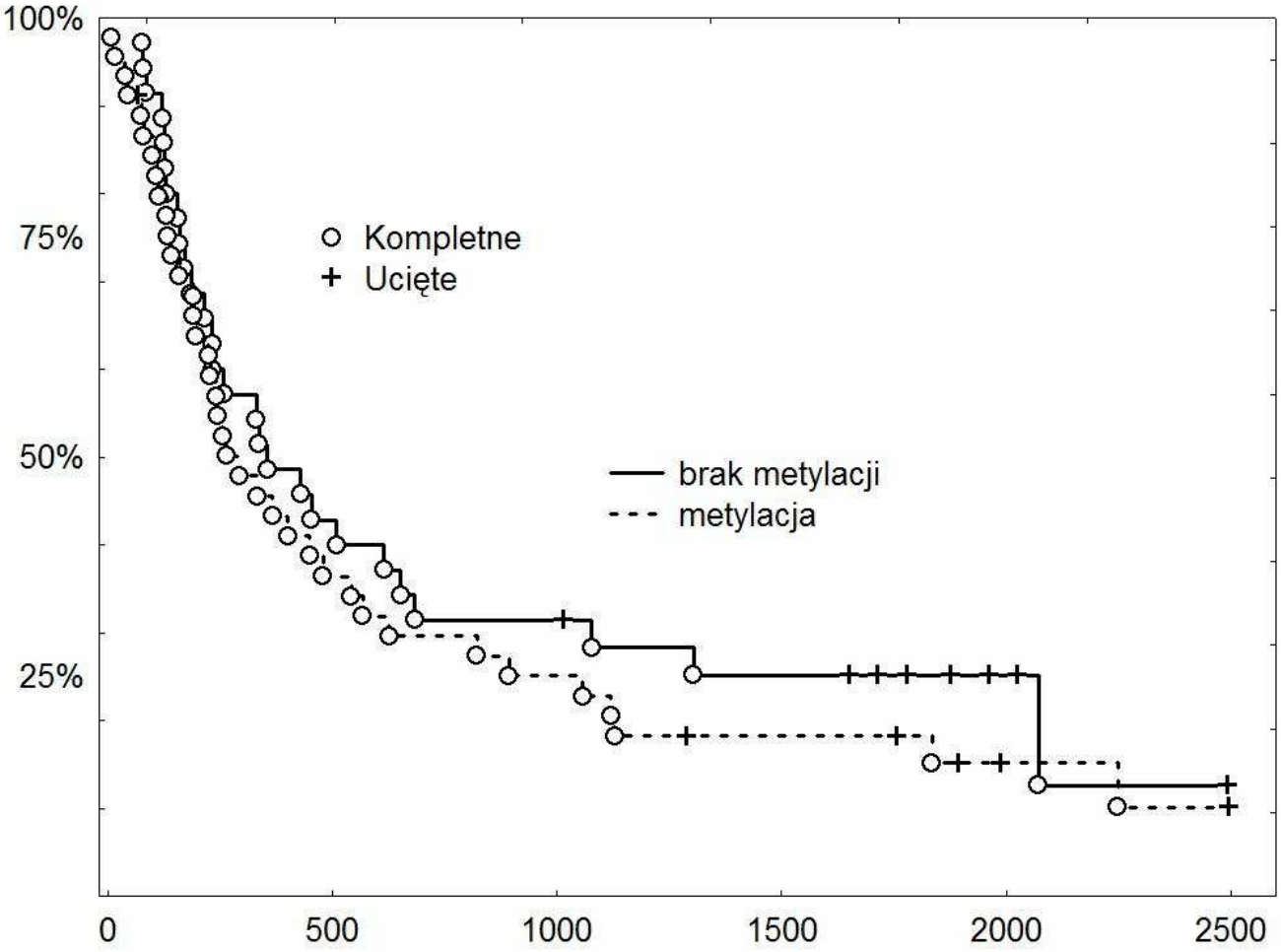
Wszystkie raki (100%) z mutacją w obrębie genu *kodującego E-kadherynę* wykazywały hipermetylację promotora *CDH1.*

Nie wykazano jakichkolwiek zależności pomiędzy występowaniem zjawiska hipermetylacji promotora *CDH1* a obecnością polimorfizmów w obrębie tego genu.

5.4.7. Metylacja promotora CDH1 a prawdopodobieństwo przeżycia

Wykonano symulację prawdopodobieństwa przeżycia Kaplana-Meier'a dla grup pacjentów wykazujących, oraz nie wykazujących hipermetylacji promotora *CDH1*. Analiza ta wykazała *tendencję* do dłuższego przeżycia w grupie pacjentów nie wykazujących hipermetylacji w obrębie promotora *E-kadheryny*. *Tendencja* ta nie jest jednak podparta istotnymi wynikami statystycznymi. Przyczyną braku istotności jest stosunkowo mała grupa pacjentów, oraz fakt, iż część chorych nadal żyje.

Pomimo początkowego braku różnicy zarówno pomiędzy grupą pacjentów wykazujących hipermetylację w obrębie promotora *CDH1*, a grupą pacjentów bez metylacji, po 200-setnym dniu zaobserwowano, zjawisko rozdzielenia się krzywych dla tych grup. Zaobserwowano tendencję do wyższego prawdopodobieństwa przeżycia w grupie pacjentów nie wykazujących hipermetylacji w obrębie promotora *E-kadheryny*, co przedstawiono poniżej:



Wykr. 8: Skumulowana proporcja przeżywających Kaplana-Meier'a. Dane zgrupowano w zależności od występowania, bądź nie, zjawiska hipermetylacji w obrębie promotora *CDH1*.

Wykres ten przynosi bardzo ciekawe informacje dotyczące prawdopodobieństwa przeżycia w obrębie poszczególnych grup. Na wykresie widać wyraźnie, że część osób w grupie bez metylacji w obrębie promotora *CDH1* umiera później (od daty rozpoznania), niż

ma to miejsce w grupie wykazującej hipermetylację. Analiza prawdopodobieństwa przeżycia Kaplana-Meyer'a wyraźnie pokazuje tę różnicę w okolicy 2000-cznego dnia przeżycia dla obydwóch grup. Ok. 25% więcej chorych bez metylacji w obrębie promotora *E-kadheryny* dożyło dnia 2000 (5,5 roku). Różnica ta zanika w odstępie 2500 dni (prawie 7 lat) od rozpoznania klinicznego, tak długie przeżycie wykazały porównywalne odsetki chorych z obydwóch analizowanych grup. Warto jednak zwrócić uwagę, że część chorych (3/7), którzy przeżyli powyżej 5-ciu i pół roku, to osoby, u których nie doszło do lokalnej inwazji raka do węzłów okołożołądkowych.

5.5. Podsumowanie wyników

1. Polimorfizmy genu *CDH1* występowały z częstością zgodną z poprzednimi doniesieniami. Najpowszechniejszy polimorfizm dotyczył eksonu 13. Wykazano obecność nowego, nie opisywanego dotychczas polimorfizmu w eksonie 14 *E-kadheryny* (R732R), który może mieć charakter lokalny. Obserwacja ta zachęca nas do wykonania w przyszłości szerszych badań populacyjnych.

2. Mutacje genu *CDH1* wykryto w 15,5% sporadycznych raków żołądka (w 24% raków posiadających w całości lub częściowo rozlany typ wzrostu). Wykryte mutacje to głównie mutacje zmiany sensu oraz mutacje zaburzające prawidłowy *splicing*.

3. Wykazano istotną statystycznie zależność hipermetylacji promotora *CDH1* od typu histologicznego raka żołądka w klasyfikacji wg Goseki. Raki, gdzie metylacja promotora *E-kadheryny* występuje najczęściej (87%) to raki grupy III, które nie wykazują ani obfitości śluzu w komórkach nowotworowych, ani obecności dobrze zróżnicowanych cewek.

4. *Tendencja* do osiągania przez guzy wykazujące hipermetylację promotora *CDH1* nieco większych rozmiarów zarysowuje się wyraźnie. Wynik ten był na granicy istotności statystycznej.

5. Wykazano istotną statystycznie zależność hipermetylacji promotora *CDH1* od fenotypu MSI i LOH. Podobnie, zjawisko hipermetylacji promotora *E-kadheryny* jest bardzo ściśle powiązane z obecnością wirusa Epstein-Barr w tkance.

6. Wykonana symulacja prawdopodobieństwa przeżycia metodą Kaplana-Meier'a wykazała *tendencję* do dłuższego przeżycia w grupie pacjentów nie wykazujących

hipermetylacji w stosunku do grupy ze zmetylowanym promotorem. Brak istotności statystycznej wynika z faktu, iż część chorych nadal żyje i podlega obserwacji.

6. Dyskusja

Badana od kilku lat w Zakładzie Patomorfologii CMUJ grupa sporadycznych raków żołądka była już przedmiotem dwóch prac doktorskich (dr n. med. Jacka Czopka i dr n. med. Magdaleny Białas), jednak wykonywane dodatkowe analizy molekularne przynoszą coraz nowe, interesujące informacje, które w porównaniu do poprzednich wyników rzucają nowe światło na molekularne mechanizmy rozwoju raka żołądka.

Archiwalny zbiór sporadycznych raków żołądka został zgromadzony w Zakładzie Patomorfologii CMUJ dzięki współpracy z I-szą Kliniką Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologii CMUJ w Krakowie. Placówka ta specjalizuje się w najtrudniejszych przypadkach raków żołądka, do której kierowani są wstępnie przeselekcjonowani pacjenci z całego obszaru południowej Polski. Są to chorzy, u których choroba nowotworowa jest bądź bardzo zaawansowana, lub skala trudności zabiegu operacyjnego jest bardzo wysoka. Selekcją tą można wytłumaczyć statystycznie większy odsetek rozlanych i mieszanych raków żołądka w naszym zbiorze, gdyż zabiegi operacyjne u chorych z rakami żołądka typu jelitowego (37%) częściej są wykonywane w mniej wyspecjalizowanych ośrodkach medycznych na terenie Małopolski.

Wydaje się, że niższa niż przytaczana w literaturze średnia wieku zachorowania na raka żołądka w badanej przez nas grupie (62,7±10,7 lat), może być efektem opisywanej powyżej preselekcji.

Polimorfizmy CDH1 w sporadycznych rakach żołądka

Na podstawie sekwencjonowania wykazano polimorfizmy genu *CDH1* w 77% przypadków raków żołądka. Należy jednak zaznaczyć, iż w każdym pozytywnym przypadku został wykryty co najmniej jeden polimorfizm tego genu. Poza jednym R732R, wszystkie polimorfizmy były dotychczas wielokrotnie opisywane, wykazując zgodne z dotychczasowymi doniesieniami częstości populacyjne [106].

Interesującym jest fakt wykrycia nie opisywanego dotychczas polimorfizmu typu *silent* w eksonie 14 genu *CDH1 (2194 CGG->AGG: R732R),* występującego w 2/84 analizowanych próbek. Zmiana ta, obecna zarówno w tkance kontrolnej, jak i nowotworowej, została zakwalifikowana jako polimorfizm ze względu na jej częstość występowania w badanej grupie u osób nie spokrewnionych (2,4%) oraz efekt typu *silent*. Należy zaznaczyć, że przypadki raków wykazujących zmianę R732R w eksonie 14, która najprawdopodobniej jest nowym polimorfizmem, nie wykazują większych podobieństw w obrazach fenotypowych. Ważną informacją jest również fakt, iż pacjent wykazujący ten polimorfizm, przy równoczesnej mutacji zaburzającej *splicing* żył nieco ponad 5 lat, co pośrednio mogłoby świadczyć o braku negatywnych konsekwencji tej zmiany w eksonie 14 *CDH1*. Polimorfizm ten może mieć charakter lokalny, gdyż do chwili obecnej nie pojawiły się doniesienia o tego typu wariancie allelicznym. Jednak ostateczna i „oficjalna" klasyfikacja R732R, jako polimorfizmu, będzie wymagać dodatkowych badań populacyjnych. Wykrycie nowego polimorfizmu w genie *CDH1* jest interesujące, gdyż do tej pory opisano zaledwie 17 polimorfizmów tego genu, w tym dwa dotyczące eksonu 14-go.

Mutacje w genie CDH1 w sporadycznych rakach żołądka

Analizując częstość występowania mutacji w genie *CDH1* w sporadycznych rakach żołądka w naszym archiwum, stwierdzono obecność mutacji *E-kadheryny* w 15,5% (13/84) przypadków, w obrębie których aż 4 raki wykazywały obecność jednocześnie dwóch mutacji. Wyniki te nie są sprzeczne z poprzednimi doniesieniami, które wspominają o bardzo szerokim zakresie odsetka mutacji w sporadycznych rakach żołądka: 0-56% [88, 93, 136]. Otrzymane przez nas wyniki potwierdzają dotychczasowe obserwacje, że w *genie kodującym E-kadherynę*, mutacje charakterystyczne dla rodzin HDGC związane z powstaniem nie funkcjonalnego kikuta białkowego, w sporadycznych rakach żołądka nie występują [111].

Biorąc pod uwagę ocenę histologiczną raków według klasyfikacji Lauren'a, mutacje *CDH1* wykryto w 24% raków żołądka posiadających w całości lub częściowo rozlany typ wzrostu oraz w 3% (1/31) raków typu jelitowego – był to jednak rak nisko zróżnicowany, tworzący rozległe obszary lite. Pomimo, iż typowych raków jelitowych nie wiąże się z

obecnością mutacji w genie E-kadheryny, wykazano obecność mutacji w wysokozróżnicowanych rakach typu jelitowego, jednak nie były to zmiany zaburzające prawidłowe działanie białka [88]. Przyjmuje się, że wpływające negatywnie na produkt białkowy mutacje *CDH1* w rakach jelitowych są bardzo rzadkie i dotyczą najczęściej raków niskozróżnicowanych [54, 112].

Ponadto, wykryto obecność aż trzech mutacji germinalnych (25% przypadków wykazujących mutacje) oraz 5 mutacji (42% przypadków wykazujących mutację) zaburzających prawidłowe wycinanie intronów.

Chorzy z rakami, u których wykryto obecność dwóch mutacji w genie *CDH1* wykazywali stosunkowo krótkie przeżycia: 4,5 i 5 miesięcy dla współwystępujących mutacji germinalnej i sporadycznej, i 7,5 miesiąca w przypadku dwóch sporadycznych mutacji występujących w jednym guzie.

W przypadku mutacji germinalnych zwrócono uwagę na ich wspólną cechę: krótkie przeżycie (4,5 – 5 miesięcy), co sugeruje związek wyłączania drugiego allela (każdy z guzów wykazuje mutację w innym miejscu genu *CDH1* jak i metylację regionu promotorowego) z szybkim rozwojem bardzo agresywnego guza. Te trzy raki wykazujące mutację germinalną charakteryzują się wieloma cechami wspólnymi, które zostały przedstawione w tabeli nr 10. Paradoksalnie, dwa tych guzów to raki mieszane, a wiec wykazujące komponentę jelitową – tymczasem przyjmuje się, iż efektem mutacji zaburzających prawidłowe działanie E-kadheryny są najczęściej raki rozlane.

Warto rozważyć również potencjalny efekt mutacji zmiany sensu. W przypadkach nr 8 *(T360A)*, nr 33 *(T457S)*, miejsca w których zachodzi zmiana nie są wysoce konserwatywne ewolucyjnie, natomiast zmiana *(G135E)* w przypadku 39 jest zmianą dopuszczalną ewolucyjnie i występuje w mysiej *P-kadherynie*. Pozostałe mutacje dotyczą miejsc bardzo wysoce konserwatywnych ewolucyjnie. Przykładem tego jest zmiana *(S270T*).

Wymienione w tej pracy mutacje oraz związane z nimi pozycje aminokwasowe, nie były tej pory opisywane. Jedyne doniesienie, które wiązało się z analogiczną numeracją zmienianego kodonu 270, dotyczyło nieco innej zmiany: *S270A,* która jest wiązana z współwystępowaniem w rodzinie raków żołądka i prostaty [118].

Zaburzenia w prawidłowym wycinaniu intronów

Interesującym wydaje się być obraz przeżycia chorych z zaburzeniami *splicingu*, szczególnie z mutacją w miejscu *splice-site*, całkowicie upośledzającą wycięcie intronu (przypadek nr 8), w porównaniu do innych chorych z mutacjami w genie *CDH1*, w szczególności tych wykazujących obecność mutacji germinalnych (tabela nr 7).

Duże delecje

Nie wykazano zmian dotyczących dużych zaburzeń chromosomowych, oraz kilkunukleotydowych insercji lub delecji, co może tłumaczyć uzyskany przez nas nieco niższy odsetek mutacji, niż na przykład w Portugalii, gdzie głównymi zaburzeniami w rakach sporadycznych są kilkunukleotydowe delecje.

W analizowanej przez nas grupie raków żołądka prawdopodobnie została wykryta jedna duża delecja w obrębie amplikonu 12, którą wykryto pośrednio. Prawie niewidoczny na żelu MDE prążek, po reamplifikacji został określony jako ekson 12 wraz z przylegającymi fragmentami w obrębie sekwencji intronowych. Jego sekwencja odpowiadała „typowi dzikiemu" tego fragmentu genu. Należy zaznaczyć, że pozostałe eksony *CDH1* w przypadku tej tkanki amplifikowały się znakomicie. Dysponując jedynie tymi danymi, nie jesteśmy w stanie stwierdzić, czy delecja dotyczyła jednego chromosomu, czy obydwóch alleli. Należy jednak brać pod uwagę, iż uwidoczniony bardzo słaby prążek, mógł być produktem amplifikacji komórek prawidłowych, które mogą być obecne w obszarze guza, bądź mógł dotyczyć zmiany heterozygotycznej. Jednak ze względu na niezwykle słabą intensywność prążka należy raczej brać pod uwagę tę pierwszą możliwość.

Mutacje w intronie 6, zaburzające splicing:

Kolejną ciekawą i poniekąd zaskakującą obserwacją wydaje się być stosunkowo długie przeżycie pacjentów wykazujących w guzie mutację w intronie 6. Dwa raki mieszane (przypadki 8 i 59) z mutacją w obrębie intronu 6-go (obie mutacje zaburzające *splicing*) wykazywały się bardzo interesującą cechą wspólną: stosunkowo długim przeżyciem, wynoszącym odpowiednio 75 i 61 miesięcy (6 i 5 lat), gdy tymczasem długość życia w

przypadku mutacji zlokalizowanych w innych obszarach genu *CDH1* wynosiła 1 tydzień - 21 miesięcy (poza przypadkiem nr 41, gdzie nie występowała inwazja do okolicznych węzłów chłonnych, a pacjent żyje po zabiegu ponad 5 lat). Zależność ta jest o tyle zagadkowa, iż chorzy ci charakteryzowali się znacznymi rozmiarami guza (10 i 8 cm), wokół którego występowało owrzodzenie oraz podobnym, wysokim odsetkiem przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych (59 i 62%). W obydwóch przypadkach, nie wprowadzono leczenia chemioterapią. Jedną z kolejnych cech wspólnych obydwóch guzów był ich fenotyp MSI- high. Porównanie tych dwóch przypadków można znaleźć w tabeli nr 11. Być może długość przeżycia może być związana z początkowym zastąpieniem funkcji upośledzonego genu przez alternatywny, drugi allel, a zjawisko metylacji promotora mogło być zdarzeniem wtórnym, bądź dotyczyć i tak już upośledzonego allela. Upośledzenie działania E-kadheryny może współistnieć z zaburzeniami w innych, dotychczas niezbadanych genach, mogących odgrywać ważną rolę w procesie karcynogenezy w nowotworach przewodu pokarmowego.

Jednak podobieństwo fenotypowe obydwóch guzów jest wręcz zaskakujące. Obserwacje te wydają się być enigmatyczne i wymagają dalszych wyjaśnień.

Zakażenie wirusem EBV a mutacje w CDH1

Dwa (2/5) przypadki EBV-pozytywne wykazywały obecność mutacji *CDH1*. Wynik ten jest o tyle ciekawy, że do tej pory nie odnotowano takiego zjawiska [162]. Powszechnie przyjmuje się, że EBVaGC (raki żołądka powiązane z infekcją EBV) są przeważającymi u mężczyzn, niskozróżnicowanymi rakami żołądka, które najczęściej rozwijają się w jego proksymalnej części. Są to nowotwory często klasyfikowane jako raki jelitowe, gdzie struktury tubularne są słabo zróżnicowane, bądź są to nisko zróżnicowane raki z rozległymi obszarami litymi. Raki te różnią się pod względem molekularnym jak i morfologicznym od raków EBV-ujemnych [163].

Obecność wirusa EBV w tkance raka żołądka, gdzie równolegle wykazanoby mutację w *CDH1* nie była opisywana. Wręcz do tej pory wykluczano możliwość występowania mutacji w tym genie w rakach EBVaGC. Odnalezienie więc mutacji w genie *CDH1*, która współistniała z obecnością wirusa EBV w tkance nowotworowej, było dla autorki tej pracy

informacją „mocno kłopotliwą". Jednak wielokrotne sprawdzenie poprawności analiz wyeliminowało jakąkolwiek możliwość pomyłki, co więcej: dane uzyskane z analizy ekspresji białkowej E-kadheryny metodą IHC przyniosły dodatkową informację, która mogła potwierdzić zaburzenia na poziomie białka: jedynie te dwa (wykazujące mutację *CDH1*) przypadki raków EBV-pozytywnych charakteryzowały się zaburzeniami ekspresji: przy prawidłowej ekspresji błonowej obserwowano nieprawidłową ekspresję cytoplazmatyczną białka, o analogicznym nasileniu jak w obrębie błony komórkowej. Tak więc, pojawia się pytanie – jeśli faktycznie w tych dwóch rakach żołądka obserwowane są mutacje *E-kadheryny*, o tak poważnych konsekwencjach, jak obecność połowy puli produktu białkowego w obrębie cytoplazmy, to czy rzeczywiście mamy do czynienia z przypadkami raków EBVaGC? I czy jest możliwe, wbrew swego rodzaju dogmatowi, jednoczesne współistnienie zależnego od obecności wirusa EBV procesu rozwoju raka żołądka wraz z karcynogenezą spowodowaną zaburzeniami na poziomie adhezji międzykomórkowej? Być może odpowiedź na to pytanie przynosi porównanie raków EBV-pozytywnych mut(+) i mut(-). W porównaniu tych przypadków widać wyraźnie, iż raki EBV(+) mut(+) różnią się od raków EBV(+) mut(-): raki wykazujące mutację to raki młodsze (35 i 44 lata *vs* 63-66 lat), żyjące znacznie dłużej, nieco mniejsze, o niższym stopniu zaawansowania klinicznego. Są to też raki o mniejszym odsetku przerzutów do węzłów okołożołądkowych. Ciekawa jest też lokalizacja guza: w przypadku nr 41 rak był zlokalizowany w odźwierniku. Jest to bardzo interesujące, gdyż do tej pory opisywano raki EBV-pozytywne, jako zlokalizowane wyłącznie w okolicy wpustowej, bądź trzonu żołądka [162].

Wykazane różnice w obrębie przypadków EBV(+)mut(+) i EBV(+)mut(-), choć należy zaznaczyć że ze względu na bardzo małą liczbę analizowanych raków mogą być one efektem losowym, mogą tłumaczyć równoczesne występowanie w tkance mutacji *E-kadheryny*, oraz DNA wirusa. Być może u pacjentów EBV(+)mut(+) mutacja *CDH1* zaszła na znacznie wcześniejszym etapie, natomiast infekcja wirusem była zdarzeniem późniejszym w czasie, nie mającym wpływu na karcynogenezę. Ponieważ wszystkie przypadki EBV(+) wykazywały hipermetylację promotora *CDH1*, nie jesteśmy w stanie stwierdzić, czy w

dwóch przypadkach wykazujących mutację nie zaszło wcześniej zjawisko metylacji, spowodowane innymi czynnikami.

Gdyby hipoteza ta okazała się prawdziwa, do grupy EBVaGC zaliczono by wtedy jedynie przypadki z raków bez mutacji. Argumentem „za" może być odsetek EBVaGC, który w sporadycznych rakach żołądka szacuje się na nie wyższy niż 10% [163]. Tymczasem w badanych przez nas rakach 12,5% wykazuje obecność DNA wirusa – jeżeli jednak uwzględni się jedynie raki EBV(+)mut(-), odsetek ten wyniesie 7,3%. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań.

Przedstawione przez dr n. med. M. Białas porównanie ekspresji E-kadheryny metodą IHC z otrzymanymi przez nas wynikami mutacji wykazały istotną statystycznie relację (p=0,04) [159]. Jednak nie we wszystkich przypadkach odnotowano zaburzenia ekspresji białka związane z występowaniem mutacji w genie *CDH1*, chociaż należy wspomnieć o fakcie przesekwencjonowania „dla pewności" wszystkich fragmentów kodujących gen *CDH1* w przypadkach, gdzie ekspresja białka wykazywała jakiekolwiek nieprawidłowości. Jednak to „nadprogramowe" sekwencjonowanie nie przyniosło informacji o dodatkowych mutacjach.

Po przeprowadzeniu analizy wyników otrzymanych dzięki metodzie IHC, okazało się, że część przypadków wykazujących mutację w *CDH1* wykazywało prawidłową ekspresję białka. Mogło się to wiązać z typem użytego w reakcji IHC przeciwciała, które przyłączało się jedynie do fragmentu prawidłowego białka. Jednak część przypadków nie wykazujących mutacji, wykazywała zaburzenia ekspresji białkowej E-kadheryny.

Jak już wspomniano, mutacje *CDH1*, jak i hipermetylacja promotora tego genu, mogą wpływać na obniżenie ekspresji E-kadheryny, a zatrzymanie białka w cytoplazmie może świadczyć o zaburzeniach na poziomie produkcji czy transportu proteiny.

Jednak nowe światło na uzyskane przez nas rozbieżności rzuca opisana w ubiegłym roku przez Concolino i wsp. możliwość alternatywnego mechanizmu supresji E-kadheryny wpływającego na obniżenie regulacji tego białka. Należy jednak podkreślić, że mechanizm ten nie został jeszcze poznany [164].

Hipermetylacja promotora CDH1 w sporadycznych rakach żołądka

W przypadku przedstawianych w tej pracy wyników, 54,8% (46/84) wszystkich analizowanych przypadków raków żołądka wykazywało hipermetylację w obrębie promotora *CDH1*. Wynik ten jest zgodny z szacunkami Grabiano i Guilforda, którzy przypisują to zjawisko 40-80% sporadycznych raków żołądka [39]. Uzyskane przez nas wyniki są bardzo podobne do wyników opisywanych przez inne grupy badawcze: odsetek metylacji w rakach żołądka podawany przez Tamura i wsp. wynosił 51% [167]. Machado podaje nieco niższy odsetek: 47,8% [136], a w badaniach Carvalho et al., gdzie do określania odsetka metylacji promotora genu *E-kadheryny* użyto analogicznej metody MSP oraz *primerów* o takich samych sekwencjach, jak te przedstawione w niniejszej pracy, odsetek hipermetylacji promotora *CDH1* wśród wszystkich analizowanych przypadków sporadycznych raków żołądka wynosił 51% [165]. Warto jednak wspomnieć, iż niektórzy badacze podają znacznie wyższy odsetek metylacji. W badaniach nad zmianami molekularnymi na różnych etapach karcynogenezy w raku żołądka, Mingchao i jego zespół wykazali redukcję lub całkowity brak ekspresji E-kadheryny, oraz związaną z tym zjawiskiem metylację promotora *CDH1* (częściową lub pełną), we wszystkich analizowanych przypadkach tkanek żołądka, co obserwowano już na etapie metaplazji [166].

Dokładna analiza zależności zjawiska hipermetylacji od histologicznego typu raka, przyniosła nowe informacje. Okazało się, że w przypadku raków typu rozlanego wartości te są zbliżone do publikowanych wcześniej wyników. 60% metylacji w przypadku rozlanych raków żołądka, to wynik zbliżony, do danych przedstawionych przez grupę portugalskich badaczy (51-56%) [135, 136, 165]. W rakach mieszanych z naszej kolekcji, odsetek ten był jeszcze wyższy i wynosił 70%. Analizując wszystkie raki wykazujące komponentę rozlaną, czyli zarówno raki rozlane, jak i mieszane, można stwierdzić iż 65% wśród nich wykazywało hipermetylację promotora *CDH1*.

Odnotowany w naszych badaniach najniższy odsetek metylacji dotyczył raków typu jelitowego i wynosił 38%. Wynik ten nieco odbiega od wyników prezentowanych przez Machado, jednak odsetek metylacji w obrębie promotora *CDH1* w grupie raków typu jelitowego jest niższy niż w rozlanych rakach żołądka. Machado podaje, że w obrębie raków

żołądka typu jelitowego występuje niższy odsetek metylowanych przypadków: 28,6 [136]. Różnica ta może wynikać z nieco innego sposobu klasyfikacji raków żołądka, przyjętego przez portugalskich badaczy oraz nadreprezentacji wysoko zaawansowanych klinicznie raków typu rozlanego i mieszanego w badanej przez nas grupie. Uzyskany przez nas wynik potwierdza dotychczasowe doniesienia, gdzie wykazywano niższy odsetek hipermetylacji promotora *CDH1* w sporadycznych rakach żołądka typu jelitowego, w porównaniu do raków typu rozlanego [136, 167].

Tamura szacuje, że najwyższy odsetek metylacji w obrębie promotora *CDH1* występuje w niskozróżnicowanych rakach żołądka (84%) [167].

W prezentowanych przez nas wynikach wykazano istotną statystycznie zależność hipermetylacji promotora od stopnia klasyfikacji wg Goseki, gdzie p=0,01. Najwyższy odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* wykazywały raki Goseki III (83%), a najniższy odsetek metylacji odnotowano w grupach II (38%) i IV (36%). Analizując w ten sposób dane i porównując wyniki metylacji promotora *CDH1* w grupach raków Goseki I-IV, do „przeciętnego" odsetka metylacji (54,8%) w sporadycznych rakach żołądka, wyodrębniliśmy 3 wyraźnie zarysowujące się grupy raków żołądka: 1. Grupa „neutralna" o przeciętnym odsetku metylacji promotora *CDH1* (53%): są to raki Goseki I, Grupa druga – są to raki żołądka o niższym odsetku metylacji promotora (37%) od przeciętnej: Goseki II i IV, oraz grupa trzecia - raki żołądka o najwyższym odsetku metylacji promotora (83%) - Goseki III. Zależność tego typu nie została do tej pory opisana, jednak nie pozostaje w sprzeczności z doniesieniami sugerującymi, iż hipermetylacja promotora *CDH1* jest postrzegana jako kluczowy etap w procesie karcynogenezy w nisko zróżnicowanych, rozlanych rakach żołądka [39].

W żadnej z analizowanych tkanek nie stwierdzono hipermetylacji promotora w obrębie obydwóch alleli. Należy jednak podkreślić, że obecność produktu amplifikowanego przy użyciu *primerów* dla niezmetylowanej sekwencji promotora *CDH1*, może wynikać zarówno z obecności niezmetylowanego allela, jak i kontaminacji tkanką, która nie była zmetylowana – jednak ta druga możliwość jest bardzo mało prawdopodobna.

Hipermetylacja promotora a mutacje CDH1

Porównanie hipermetylacji promotora z mutacjami w obrębie genu *CDH1* wykazało, że 100% zmetylowanych przypadków raków żołądka wykazuje mutacje. Wyniki te są wyższe od osiągniętych przez portugalskich badaczy (67%), najprawdopodobniej ze względu na znacznie niższy procent mutacji obserwowany w badanej przez nas grupie raków [136].

Hipermetylacja promotora CDH1 a lokalizacja guza

Zwrócono uwagę na doniesienie dotyczące gruczolakoraków przełyku, gdzie aż 84% guzów wykazywało hipermetylację promotora *CDH1*, gdy u osób zdrowych w obrębie prawidłowej śluzówki przełyku nie wykazano ani jednego przypadku metylacji w obrębie tego promotora *E-kadheryny* [145]. To doniesienie zachęciło nas do porównania wyników, pod względem lokalizacji guza i odpowiedzi na pytanie, czy w naszym zbiorze archiwalnym, wśród guzów znajdujących się w okolicy wpustu, można będzie zaobserwować jakiekolwiek różnice w odsetku metylacji w porównaniu do guzów zlokalizowanych w innych częściach żołądka - tym bardziej, że metylacja promotora *CDH1* jest niekorzystnym markerem prognostycznym w gruczolakorakach przełyku [168]. Na podstawie uzyskanych przez nas danych, okazało się, że różnice są niewielkie, a proces hipermetylacji promotora *E-kadheryny*, nie wykazuje jakiejkolwiek „preferencji" lokalizacji: raki okołowpustowe wykazywały 56% metylacji w obrębie promotora genu *E-kadheryny*, gdy w pozostałych grupach, gdzie występował naciek (trzon, odźwiernik, cały obszar żołądka) wyniki te oscylowały wokół 58%. Odsetek hipermetylacji był nieco wyższy w bardziej odległych od wpustu guzach zlokalizowanych w obrębie trzonu i odźwiernika (tabela 15, wykres nr 5).

Wynik ten można wiązać z obecnością w większości przypadków bardzo dużego nacieku nowotworu, który często obejmował równocześnie kilka części żołądka, natomiast opis lokalizacji guza miał w tych przypadkach znaczenie orientacyjne i dotyczył części z której nowotwór się wywodził. Były to zazwyczaj raki bardzo zaawansowane, co dodatkowo utrudniało tę ocenę.

Zależność hipermetylacji promotora CDH1 od płci, wieku, głębokości nacieku i inwazji do okolicznych węzłów chłonnych

Brak istotnych statystycznie zależności metylacji promotora *CDH1* od płci, wieku, stopnia inwazji do okolicznych węzłów chłonnych, czy głębokości nacieku, koresponduje z wynikami przytaczanymi przez innych badaczy [162, 165].

Hipermetylacja promotora CDH1 a fenotyp MSI/LOH

Istnienie zależności pomiędzy fenotypem MSI-H (MSI-*high*) i MSI-L (MSI-*low*) a obecnością metylacji promotora *CDH1* w rakach żołądka sugeruje związek z równoczesną, niewybiórczą hipermetylacją promotorów wielu genów biorących udział w procesie onkogenezy, w tym *CDH1* i genów mutatorowych, a geny te najprawdopodobniej były metylowane grupowo. Świadczy o tym wykazana bardzo silna zależność pomiędzy fenotypem MSI-high a metylacją promotora *E-kadheryny* (w teście $\chi 2$ p=0,00001). Hipermetylację promotora *CDH1* wykazano w 100% przypadków charakteryzujących się fenotypem MSI-high, natomiast w przypadku raków żołądka o fenotypie MSI-low oraz rakach MSS odsetek ten wynosił odpowiednio: 71% i 40% (wykres nr 6).

Potwierdzeniem tych wyników są dane prezentowane przez Suzuki i wsp., które sugerują ścisły związek hipermetylacji regionu promotorowego *hMLH1* w raku żołądka z występowaniem fenotypu MSI. Warto zaznaczyć, że z ośmiu guzów wykazujących niestabilność mikrosatelit wysokiego stopnia aż pięć wykazywało hipermetylację promotora *hMLH1*, gdy tymczasem żaden z 43 przypadków MSI-low nie charakteryzował się hipermetylacją tego promotora [169].

Wykazano zależność pomiędzy fenotypem LOH a metylacją promotora *E-kadheryny*. W teście $\chi 2$ NW współczynnik p wynosił 0,0008. Metylację promotora *CDH1* wykazano w 83% przypadków charakteryzujących się fenotypem LOH-H, oraz 88% LOH-L, natomiast w przypadku raków żołądka LOH-S odsetek ten wynosił zaledwie 43% (wykres nr 7). Należy zwrócić uwagę na podobny odsetek metylacji w grupie MSS oraz LOH-S (odpowiednio 41% i 43%), grupy te się pokrywały jedynie częściowo.

Badania wykonane przez grupę portugalskich badaczy, wykazywały bardzo ścisły związek pomiędzy fenotypem MSI-H a grupową hipermetylacją genów*: hMLH1, CDH1, MGMT i COX2*, których promotory były metylowane z odpowiednią częstością: 37, 51, 61 i 29% [165]. Inna, koreańska grupa badawcza wykazała istotną statystycznie zależność pomiędzy fenotypem MSI-H a odsetkiem metylacji w obrębie promotora *CDH1*, którą oszacowano na 78%, przy p=0,01 [170]. Obserwowane różnice w naszych wynikach mogą wynikać z potraktowania przez koreańskich autorów raków MSI-L i MSI-H jako jednolitej grupy.

Porównanie uzyskanych przez nas wyników jest możliwe jedynie w tym przypadku, jednak uzyskane przez nas wyniki różnią się nieco od wyników uzyskanych dla populacji azjatyckiej: (100% *vs* 78%) dla MSI-H oraz dla MSS (40% *vs* 32%). Być może na różnice te może również wpływać różna liczebność grup (MSI-H: 15 *vs* 22, MSS: 59 *vs* 43).

Interesującym jest fakt, iż nie wykazano zależności pomiędzy metylacją promotora *CDH1* a odczynem immunohistochemicznym w kierunku ekspresji białka MLH1, gdy tymczasem obserwuje się zależność w odniesieniu do ekspresji białka MSH2, gdzie jednostronny test Fishera daje p=0,04. Wydaje się, że interesującym uzupełnieniem tych wyników mogłaby być ocena immunochistochemiczna ekspresji białka MSH6 w rakach żołądka z naszego zbioru.

Przytoczone powyżej wyniki zależności fenotypu MSI i hipermetylacji promotora *CDH1*, sugerują, że podobnie jak *CDH1*, geny mutatorowe w rakach żołądka bardzo często stają się „ofiarami" metylacji, a wyłączenie ich za pomocą tego epigenetycznego mechanizmu może kierować komórkę nowotworową na szlak niestabilności mikrosatelitarnej. Należy nadmienić, iż raki żołądka charakteryzujące się niestabilnością mikrosatelit (w przeciwieństwie do tego typu raków jelita grubego) są grupą rokującą gorzej, niż raki stabilne mikrosatelitarnie. Warto dodać, że w swojej pracy doktorskiej, dr n. med. Jacek Czopek wykazał, że fenotyp MSI-low w rakach żołądka rokuje najbardziej niekorzystnie [161].

Hipermetylacja promotora CDH1 a rozmiar guza

Obserwowana *tendencja* do osiągania przez guzy ze zmetylowanym promotorem *CDH1* większych rozmiarów (średnio 8,1 cm), niż jest to obserwowane w guzach nie wykazujących metylacji (średnio 7,2 cm), jest bardzo interesująca. Uzyskany wynik jest na granicy istotności statystycznej, jednak dzięki analizie mediany *trend* ten zarysowuje się bardzo wyraźnie. Do tej pory nie zostało opublikowane żadne doniesienie o tego typu zależności w rakach przewodu pokarmowego. Zostało jednak przedstawione doniesienie dotyczące endokrynnych guzów trzustki, gdzie guzy o wymiarach przekraczających 5 cm, charakteryzowały się znacznie wyższym odsetkiem metylacji w obrębie promotorów wielu genów, w tym *CDH1*, w porównaniu do guzów mniejszych [171].

Wydaje się, że obserwowane zjawisko może być związane z faktem, iż w grupie guzów wykazujących hipermetylację promotora *CDH1* przeważają guzy o utkaniu rozlanym i mieszanym, które wykazują tendencję do znacznie bardziej ekspansywnego wzrostu, niż dzieje się to w przypadku raków jelitowych.

Hipermetylacja promotora CDH1 a infekcja wirusem EBV

Wykazana zależność pomiędzy metylacją promotora *CDH1*, a infekcją wirusem EBV dotyczyła bardzo małej grupy (pięciu) przypadków, a wynik ten nie jest istotny statystycznie. Jednostronny test Fishera, bardziej restrykcyjny pod względem analizy prawdopodobieństwa od testów $\chi 2$, określa p=0,0999.

Zaobserwowana *tendencja* jest zgodna z obserwacjami koreańskich i japońskich badaczy. Grupa badawcza z Seulu wykazała metylację promotora *CDH1* w przypadku 71% EBV-pozytywnych przypadków raka żołądka, przy metylacji wykrywanej w 68% EBV-negatywnych przypadków. W porównaniu do tych danych, wykazany w naszych wynikach wyższy odsetek metylacji promotora *CDH1* w przypadku EBV-pozytywnych raków żołądka może wiązać się z niewielką analizowaną przez nas grupą raków wykazujących obecność wirusa, innymi metodami badawczymi, czy różnicami pomiędzy populacjami [35].

Znacznie korzystniej wypada porównanie naszych obserwacji do wyników japońskich, gdzie metylację promotora *CDH1* wykryto w 95% (u nas 100%) przypadków pozytywnych pod względem wirusa EBV kontra 55% (u nas 58%) przypadków EBV- ujemnych [162, 163]. Kolejnym więc etapem naszych badań, będzie konieczna w tym przypadku dodatkowa analiza metylacji promotora *CDH1* w większej ilości EBV- pozytywnych raków żołądka, w materiale zatopionym w parafinie.

Uzyskane przez nas wyniki mogą świadczyć o tym, że zarówno czynniki genetyczne, jak i epigenetyczne mogą bezpośrednio wpływać na proces karcynogenezy w komórkach żołądka zainfekowanych wirusem EBV.

Obecność fenotypu MSI-high w zaledwie 40% EBV-pozytywnych przypadków jest zgodna z poprzednimi doniesieniami. Jednak fakt, iż nie jest to zjawisko powszechne w rakach

EBV-pozytywnych może sugerować nieco inny, choć niewybiórczy proces metylacyjny, spowodowany działaniem wirusa. Choć mechanizm hypermetylacji grup genów poprzez wirus Epstein-Barr pozostaje nieznany, wiadomo że EBVaGC nie wykazują nadekspresji metylotransferaz DNA [163].

Uwidocznione w tej pracy wzajemne zależności metylacji promotora *E-kadheryny*, obecności w tkance nowotworowej wirusa EBV, oraz powiązanie tych zdarzeń z fenotypem MSI, mogą sugerować, że spowodowana infekcją EBV metylacja promotorów genów istotnych w procesie karcynogenezy, w obrębie komórek nabłonka w żołądku, może być procesem znacznie bardziej selektywnym niż „tradycyjna hipermetylacja" - dotyczącym określonych grup genów [35, 162].

Nasze badania mogą świadczyć o tym, iż wykazujące metylację w obrębie promotora *CDH1* raki żołądka, w których zachodzi grupowa, nie związana z działaniem wirusa EBV hipermetylacja promotorów, wykazują znacznie częstszy fenotyp MSI-high, co może być związane z równoczesną hipermetylacją promotorów genów mutatorowych.

Wydaje się, że w świetle przytaczanych przez nas wyników, ten epigenetyczny mechanizm wyłączania genu *CDH1*, w rakach EBV-pozytywnych nie ogranicza się do tych samych grup genów, jak to ma miejsce w przypadku „zwykłej" metylacji. Na tej podstawie ostrożnie można zwrócić uwagę na możliwość alternatywnego (choć nadal grupowego) i

nieprzypadkowego mechanizmu metylacji promotorów przez wirus EBV - mechanizmu, który, mimo iż wpływa na metylację promotora genu *CDH1*, nie zawsze dotyczy wyłączania genów mutatorowych. Potwierdzeniem wysuniętej tu hipotezy mogą być badania zespołu Fukayamy, gdzie w rakach EBV(+) wykazano hipermetylację promotora *E-kadheryny* w 100% (17/17), gdy hipermetylację genu *hMLH1* zaobserwowano jedynie w 11,8 % przypadków. W rakach EBV-negatywnych odsetki te wynosiły odpowiednio: 53,3 i 13,3% [163]. Dla porównania, uzyskane przez nas wyniki dla promotora *CDH1* w grupie raków EBV(+) dotyczą również 100% (5/5) hipermetylowanych przypadków.

Najnowsze doniesienia zespołu Fukayamy przynoszą dodatkowe, niezwykle istotne w świetle naszych wyników, informacje, które wydają się być mocnymi argumentami na poparcie wysuniętej przez autorkę niniejszej pracy hipotezy. Tokijscy badacze wykazali, że w EBVaGC promotory dwóch genów: *p16* i *p14*, są hipermetylowane z bardzo zbliżoną częstością, gdy tymczasem w rakach EBV(-), promotory te są metylowane całkowicie niezależnie od siebie, a metylacja dotyczy znacznie mniejszego odsetka przypadków. Co więcej, wyłącznie w EBVaGC pierwsze CpG promotora *p16* wykazuje metylację, gdy zjawisko to nigdy nie występuje w rakach żołądka EBV(-) [172]. Jednak hipoteza dotycząca związanego z zakażeniem wirusem EBV alternatywnego mechanizmu metylacji promotorów wymagać będzie dalszych badań.

Hipermetylacja promotora CDH1 a prawdopodobieństwo przeżycia

Bardzo interesujące informacje przyniosła analiza prawdopodobieństwa przeżycia metodą Kaplana-Meier'a. Wykazała ona *tendencję* do dłuższego przeżycia w grupie pacjentów nie wykazujących hipermetylacji w obrębie promotora *E-kadheryny*. *Tendencja* ta nie jest jednak podparta istotnymi statystycznie wynikami, a przyczyną braku istotności jest stosunkowo mała grupa pacjentów, oraz nie zamknięta historia choroby części chorych. Analiza ta przynosi bardzo ciekawe informacje dotyczące prawdopodobieństwa przeżycia w obrębie poszczególnych grup. Na wykresie nr 9 widać wyraźnie, że odsetek chorych w grupie bez hipermetylacji promotora *CDH1* umiera później od daty rozpoznania, niż ma to miejsce w grupie wykazującej hipermetylację.

Przytoczone przez nas wyniki nie pozostają w sprzeczności z poprzednimi doniesieniami. Graziano podaje że wśród pacjentów, u których usunięto rak żołądka, gdzie nowotwór przerzutował do okolicznych węzłów chłonnych, aż 67% pacjentów nie wykazujących hipermetylacji promotora *CDH1* przeżyło ponad 5 lat. W przypadku pacjentów z nieprawidłowo zmetylowanym promotorem ponad pięcioletnie przeżycie zaobserwowano jedynie u 35% chorych [39].

7. Wnioski

1. Mutacje *CDH1* w naszym zbiorze sporadycznych raków żołądka dotyczą 24% raków wykazujących w całości lub częściowo rozlany typ wzrostu. Być może, wykazana preferencja lokalizacji mutacji w zależności od typu histologicznego raka stanie się w przyszłości pomocna przy wykonywaniu przesiewowych badań *E-kadheryny* metodą SSCP.

2. Hipermetylacja promotora *CDH1* jest ściśle związana z typem raka żołądka wg klasyfikacji Goseki. Najczęściej metylację wykazują raki grupy trzeciej. Metylacja występuje najrzadziej w rakach, gdzie obecne są komórki sygnetowate.

3. Uzyskane przez nas wyniki hipermetylacji promotora *CDH1*, w odniesieniu do zjawiska niestabilności mikrosatelit pozwalają przypuszczać, iż geny mutatorowe, podobnie jak *E-kadheryna,* stają się często „ofiarami" niewybiórczej metylacji. Hipermetylacja promotorów może prowadzić komórkę żołądka na szlak karcynogenezy również poprzez zjawisko niestabilności mikrosatelit.

4. W sporadycznych rakach żołądka obecność zjawiska hipermetylacji promotora *CDH1* w tkance nowotworowej jest niekorzystnym zjawiskiem prognostycznym i wiąże się z większymi rozmiarami guza i krótszym przeżyciem u tych pacjentów.

8. Streszczenie

Wstęp

Rak żołądka jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych człowieka. Bezpośrednia przyczyna prowadząca do powstania raka żołądka nie jest znana. Wśród przyczyn wymienia się przede wszystkim: czynniki środowiskowe oraz zaburzenia genetyczne (w tym zaburzenia genów kodujących cząsteczki adhezyjne), czy epigenetyczne jak metylacja regionów promotorowych genów istotnych w procesie onkogenezy.

Wiele genów kodujących cząsteczki adhezyjne jest zaliczanych do supresorów nowotworu. Konsekwencją uszkodzenia tych genów są zaburzenia adhezji komórkowej związane z osłabieniem, bądź całkowitym zniszczeniem połączeń międzykomórkowych.

Jednym z istotnych czynników biorących udział w procesie adhezji międzykomórkowej jest E-kadheryna. Upośledzenie pracy tego białka wiązane jest z rozwojem rozlanych raków żołądka.

E-kadheryna to białko zależne od kationów wapnia, które wraz z kateninami odgrywa kluczową rolę w adhezji komórkowej w obrębie epitelium. Kodujący E-kadherynę gen *CDH1* znajduje się na 16 chromosomie i składa się z 16 eksonów, obejmujących ok. 100 kb genomowego DNA. E-kadheryna, poprzez domenę wewnątrzkomórkową związana jest z β– i α-kateniną, a więc pośrednio i z cytoszkieletem. Jest to połączenie niezbędne dla prawidłowej budowy tkanek, morfologii komórek, czy różnicowania komórkowego.

Przyjmuje się, że nie więcej niż 3% raków żołądka może mieć podłoże dziedziczne. Wśród nich, aż 25 - 40% jest spowodowane mutacjami germinalnymi *CDH1*. Mutacje germinalne w tym genie po raz pierwszy opisano na przykładach kilku rodzin maoryskich, w których w kolejnych pokoleniach występowały rozlane raki żołądka w młodym wieku. Podobnych rodzin na całym świecie zidentyfikowano do tej pory ponad 100. Członkom rodziny, którzy jeszcze nie chorowali, a charakteryzują się mutacjami blokującymi prawidłową pracę białka E-kadheryny, proponuje się profilaktyczną, całkowitą gastrektomię.

Wśród wielu mechanizmów molekularnych powodujących nieprawidłowości działania E-kadheryny, należy również wymienić inaktywację genu *CDH1* poprzez hipermetylację

jego promotora. Hipermetylacja promotora *CDH1* jest postrzegana jako kluczowy etap w procesie karcynogenezy w nisko zróżnicowanych, rozlanych rakach żołądka. Uważa się, że metylacja promotora genu *E-kadheryny* może być „drugim uderzeniem", które wyłącza drugi allel zgodnie z hipotezą Knudson'a.

Podobnie jak inne typy nowotworów złośliwych, rak żołądka jest postrzegany jako konsekwencja wielostopniowego procesu molekularnego, na skutek którego prawidłowa komórka przechodzi w komórkę nowotworową. Identyfikacja i pełne zrozumienie zmian zachodzących na wczesnych etapach karcynogenezy w raku żołądka może wydatnie przyczynić się do poznania podstaw patogenezy oraz do zwiększenia skuteczności leczenia tej choroby.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest analiza mutacji i polimorfizmów w genie *CDH1* oraz analiza obecności zjawiska hipermetylacji promotora tego genu, w archiwalnym zbiorze sporadycznych raków żołądka. Jest to kontynuacja poprzednich badań nad rakiem żołądka prowadzonych od kilku lat w naszym Zakładzie. Wierzymy, iż uzyskane dodatkowe dane, w kontekście poprzednich wyników zaprezentowanych przez dr n. med. Magdalenę Białas (Katedra Patomorfologii CMUJ) oraz dr n. med. Jacka Czopka (Katedra Patomorfologii CMUJ), posłużą do szerszego poznania mechanizmów karcynogenezy w raku żołądka.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano materiał chirurgiczny nadsyłany do Katedry Patomorfologii CMUJ w latach 1996-2000.

Do badań wykorzystywano tkankę zamrożoną i zatopioną w parafinie. Z każdego żołądka wyodrębniono próbki tkanki nowotworowej oraz niezmienionej błony śluzowej. Kolejnym etapem była rutynowa ekstrakcja DNA, które następnie posłużyło jako matryca w reakcji PCR. Produkty tej reakcji zostały uwidocznione za pomocą srebrzenia, przy użyciu techniki SSCP. Otrzymane na żelu MDE dodatkowe prążki były następnie reamplifikowane i poddane sekwencjonowaniu.

Analiza hipermetylacji regionu promotorowego *CDH1* została przeprowadzona za pomocą techniki MSP.

Wyniki

Około 77% przypadków wszystkich analizowanych w tym projekcie raków żołądka wykazywało zmiany zakwalifikowane jako polimorfizmy. Występująca z częstością 2,4% zmiana R732R, obecna zarówno w tkance kontrolnej, jak i nowotworowej, została wstępnie zakwalifikowana jako nowy polimorfizm.

Odsetek przypadków wykazujących mutację w *genie E-kadheryny* wyniósł 15,5% (13/84). Wszystkie mutacje zostały szczegółowo przeanalizowane. Wśród mutacji *CDH1* wykryto przypadkowo 3 mutacje germinalne – raki te miały wiele cech wspólnych, podobnie było w przypadku dwóch mutacji w amplikonie 6 *CDH1*.

Wykazano tendencję do lokalizacji mutacji w zależności od typu histologicznego raka żołądka: mutacje sporadyczne w rakach rozlanych kumulowały się w obrębie przedziału ekson 4 – intron 6, natomiast w rakach mieszanych pojawiały się one w obszarze ekson 7-ekson 14.

Hipermetylacja promotora *CDH1* została wykazana w 54,8% (46/84) wszystkich analizowanych przypadków. W żadnej z analizowanych tkanek nie stwierdzono hipermetylacji promotora w obrębie obydwóch alleli.

Wykazano zależność pomiędzy typem raka wg klasyfikacji Goseki a metylacją promotora *CDH1*. Największy odsetek metylacji promotora *E-kadheryny* wykazywały raki Goseki III (83%), najniższy odsetek odnotowano w grupie IV (36%).

Zaobserwowano interesujący, wyraźny *trend* zależności wielkości guza od metylacji promotora *CDH1*. *Tendencja* do osiągania przez guzy ze zmetylowanym promotorem większych rozmiarów (średnio 8,1 cm), niż guzy nie wykazujące metylacji (średnio 7,2 cm), wymagać będzie w przyszłości dalszych badań.

Hipermetylację promotora *CDH1* wykazano w 100% przypadków charakteryzujących się fenotypem MSI-high, natomiast w rakach MSI-low oraz rakach MSS, odsetek ten wynosił odpowiednio: 71 i 41% .

We wszystkich przypadkach guzów, gdzie wykazano obecność wirusa EBV, obserwowano zjawisko hipermetylacji promotora *CDH1*. W przypadku grupy raków EBV(-) metylację promotora *CDH1* wykazano w 58% przypadków.

Nie wykazano zależności metylacji promotora *CDH1* od wieku, lokalizacji guza, stopnia inwazji do okolicznych węzłów chłonnych, czy głębokości nacieku.

Wykonano symulację prawdopodobieństwa przeżycia Kaplana-Meier'a dla grup pacjentów wykazujących, oraz nie wykazujących hipermetylacji promotora *CDH1*. Analiza wykazała *tendencję* do dłuższego przeżycia grupy pacjentów nie wykazujących hipermetylacji promotora *E-kadheryny*.

9. Summary

Introduction

The gastric cancer remains one of the most common human cancers world-wide. The main cause of gastric cancer still remains unclear, however environmental and genetic factors are mentioned.

A small percentage of gastric cancer (up to 3%) is reported as a result of inherited gastric cancer syndromes. In HDGC two main mechanisms of E-cadherin down-regulation have been described: gene silencing through promoter methylation and mutations in the *E-cadherin gene*.

The calcium-dependent cell adhesion molecule E-cadherin is encoded by tumor suppressor gene (*CDH1*) located on chromosome 16q22.1.

The protein plays a crucial role in cell-cell adhesion, maintaining cell polarity and the normal architecture of epithelium. Moreover, E-cadherin plays role, in cell signalling, metastasis formation, organogenesis and cell differentiation. E-cadherin trough β–, γ- and α– catenins complex with cytoskeleton to form very tight adherens junctions.

In normal tissues in embryogenesis, during cell differentiation and development process, the CpG methylation is present. The abnormal activity of methyltransferases has been found in various human neoplasms. This results in aberrant CpG islands methylation and transcriptional silencing of many human tumour suppressor genes

The aim of this work

The aim of the study was to detect and describe all polymorphisms and mutations in our collection of sporadic gastric cancers.

Materials and methods

The tumour and normal samples were obtained from 84 patients, and collected in Department of Pathomorphology (CMUJ). DNA was extracted from frozen and paraffin embedded tissue.

The search for polymorphisms and mutations in the *CDH1* gene was performed using Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). A combination of previously published oligonucleotides was used in PCR reaction to amplify all exons (including *splice-sites*) of *E-cadherin*. After re-amplification all samples with new bands or bandshifts were sequenced in forward and reverse orientations of the appropriate exons.

The methylation status of the promoter of the *CDH1* gene was determined by methylation specific PCR (MSP). We used the bissulfite treatment of DNA, which converts unmethylated citosines to uracil and subsequent PCR using primers designed for either methylated or unmethylated DNA.

Results

77% of all cases showed *CDH1* polymorphisms. In addition to previously reported polymorphisms we found a novel change R732R. We detected *CDH1* mutations in 15,5% (13/84) cases. By accident 3 germline changes in *E-cadherin* were found.

We described *tendency* to accumulation of *CDH1* sporadic mutations along the gene. In diffused gastric cancers mutations spread along exon 4–intron 6, in mixed type gastric carcinomas mutations were widely spread along exons 7-14.

We detected *CDH1* promoter hypermethylation in 54,8% (46/84) of gastric cancers.
We also compared *CDH1* promoter methylation and histological type. In Lauren's classification 38% of intestinal gastric cancers, 70% of mixed type and 60% of diffused gastric cancers *CDH1* promoters were hypermethylated. The difference was no significant.
In Goseki's classification we observed significance between Goseki's type and hypermethylation, where p=0,01(χ2). The highest percentage of methylation we found in Goseki III group (signet ring cells) (83%), and the lowest in group IV (36%).

We compared *CDH1* promoter hypermethylation *vs.* tumor size. We found a *tendency* where "methylated" tumors were bigger (8,1 cm) than "unmethylated" (7,2 cm).

100% of hypermethylated cases revealed MSI-high phenotype. In MSI-low and MSS gastric cancers this percentage was lower than in MSI-high group, respectively: 71 and 41%.

We detected *CDH1* promoter hypermethylation in all EBV-positive gastric cancers, where methylation in EBV-negative group occurred in 58% of cases.

Analyses revealed no significant statistical differences between *CDH1* promoter hypermethylation and patients' age, tumour localization, metastatic invasion or depth of infiltration. Survival analysis using the Kaplan-Meier method showed longer survival in the group of "unmetylated" cancers.

10. Bibliografia:

1. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56 (1):1-9

2. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1999 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. *Centrum Onkologii w Warszawie* 2002; 1-107

3. Pawlęga J (red). Podręcznik Onkologii Klinicznej; *WPL*, 2001; 1-498

4. Ramos-De la Medina A, Salgado-Nesme N, Torres-Villalobos G, Medina-Franco H. Clinicopathologic characteristics of gastric cancer in a young patient population. *J Gastrointest Surg* 2004; 8(3):240-244

5. Layke JC, Lopez PP. Gastric cancer: diagnosis and treatment options. *Am Fam Physician* 2004; 69(5):1133-1140

6. Tsugane S, Sasazuki S, Kobayashi M, Sasaki S. Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer* 2004; 90(1):128-134

7. Cohen AJ, Roe FJC. Evaluation of the Aetiological Role of Dietary Salt Exposure in Gastric and Other Cancers in Humans. *Food Chem Toxicology* 1997; 35(2):271-293

8. Palli D, Russo A, Ottini L, Masala G, Saieva C, Amorosi A, Cama A, D'Amico C, Falchetti M, Palmirotta R, Decarli A, Constantini RM, Fraumeni JF. Red Meat, Family History, and Increased risk of Gastric Cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; 61(14):5415-5419

9. Roukos DH, Paraskevaidis E, Agnantis NJ, Kappas AM. Fruits and vegetables: do they protect from gastric cancer? *Gastroenterology* 2003;124(7):2006-2007

10. Pollack M, Leeuwenburgh C. Molecular mechanisms of oxidative stress in aging: free radicals, aging, antioxidants and disease *(part 10). Elsevier Science* 1999; 881-923

11. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, Tumino R, Panico S, Berglund G, Siman H, Nyren O, Agren A, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Quiros JR, Allen N, Bingham S, Day N, Miller A, Nagel G, Boeing H, Overvad K, Tjonneland A, Bueno-De-Mesquita HB, Boshuizen HC, Peeters P, Numans M, Clavel-Chapelon F, Helen I, Agapitos E, Lund E, Fahey M, Saracci R, Kaaks R, Riboli E. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2003; 107(4):629-634

12. Tamura G. Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2002; 17(1):323-329

13. TakanoY, Kato Y, Saegusa M, Mori S, Shiota M, Masuda M, Mikami T, Okayasu I. The role of the Epstein- Barr virus in the oncogenesis of EBV (+) gastric carcinomas. *Virch Arch* 1999; 434(1):17-22

14. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Patol* 1992; 140(4): 769-774

15. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *BMJ* 2000; 53(5):225-261

16. Scheiman JM, Cutler A. Helicobacter pylori and Gastric Cancer. *Am J Med* 1999; 106 (2):222-226

17. Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E. Helicobacter pylori infection and carcinogenesis of the stomach. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385(2):69-74

18. Yamaguchi N, Kakizoe K. Synergistic interaction between *Helicobacter pylori* gastritis and diet in gastric cancer. *Oncology* 2001; 2(2):88-94

19. Frenck RW, Clemens J. Helicobacter in the developing world. *Microbes Infect* 2003; 5(8):705-713

20. Ueda M, Kikuchi S, Kasugai T, Shunichi T, Miyake C. Helicobacter pylori risk associated with childhood home environment. *Cancer Sci* 2003; 94(10):914-918

21. Parsonet J, Friedman GD, Vandersteen DP. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 325(16):1127-1131

22. Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Takeda H. Long-term *Helicobacter pylori* infection-from gastritis to gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 1:(1) 9-15

23. Vermeer IT, Gerrits MM, Moonen EJ, Engels LG, Dallinga JW, Kleinjans JC, van Maanen JM, Kuipers EJ, Kusters JG. Helicobacter pylori does not mediate the formation of carcinogenic N-nitrosamines. *Helicobacter* 2002; 7(3):163-169

24. Blaser M, Perez-Perez G, Kleanthous H. Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55:(10)2111-2116

25. Hunag J, Zheng G, Sumanc K, Irvine E, Hunt R. Meta-Analysis of the Relationship Between cagA Seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003; 125:(6)1636-1644
26. Yamada H, Aihara T, Okabe S. Mechanism for *Helicobacter pylori* stimulation of interleukin-8 production in a gastric epithelial cell line (MKN 28): roles of mitogen-activated protein kinase and interleukin-1. *Biochem Pharmacol* 2001; 61(12):1595-1604
27 . Yeo M, Park HK, Lee KM, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Hahm KB. Blockage of HSP 90 modulates *Helicobacter pylori*-induced IL-8 productions through the inactivation of transcriptional factors of AP-1 and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(3):816-824
28. Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002; 123(2):542-553
29. Chan AO, Lam SK, Wong BC, Kwong YL, Rashid A. Gene methylation in non-neoplastic mucosa of gastric cancer: age or *Helicobacter pylori* related*?* 2003; *Am J Pathol* 163(1):370-373
30. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis. A multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology. *Cancer Res* 1992; 52(24):6735-6740
31. Blok P, Craanen M, Offerhaus G, Tytgat. Gastric carcinoma: clinical, pathogenic and molecular aspects. *QJM*1997; 90(12):735-749
32. Baumforth KR, Young L, Flavell K, Constantindinou C, Murray PG. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol* 1999; 52(6):307-322
33. Czopek J, Stojak M, Sińczak A, PopielaT, Kulig J, Rudzki Z, Stachura J. EBV-positive gastric carcinomas in *Poland. Pol J Pathol* 2003; 54(2):121-126
34. Hsu JL, Glaser SL. Epstein–Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34(1):27-53
35. Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, Ro JY. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160(3):787-794
36. Popiela T, Kulig J, Kołodziejczyk P. Erfahrung mit der multimodalen Behandlung von Patienten mit Magenkarzinom in Polen. *Zentralbl Chir* 2001; 126(10): 763-768
37. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306(5701):1568-1571
38. Bevan S, Houlston R. Genetic Predisposition to gastric cancer. *QJM* 1999; 92(1): 5-10
39. Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Ann Oncol* 2003; 14(12):1705-1713
40. Buard J, Jeffreys AJ. Big, bad minisatellites. *Nat Genet* 1997; 15(4):347-328
41. Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 1993; 2(8):1123-1128
42. Atkin NB. Microsatellite instability. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 92(3-4):177-181
43. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Cur Op Gen Dev* 1999; 9(1):89-96
44. Stachura J, Popiela T, Czopek J, Zazula M, Rudzki Z, Okoń K, Kulig J, Białas M, Kołodziejczyk P, Sińczak A, Papla B. Microsatellite instability and gastrointestinal carcinoma: the never-ending story (w przygotowaniu do druku)
45. Czopek J, Białas M, Rudzki Z, Zazula M, Zembala M, Popiela T, Kulig J, Kołodziejczyk P, Stachura J. The relationship between gastric cancer cells circulating in the blood and microsatellite instability positive gastric carcinomas. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(2):128-136
46. Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 2001; 20(3):329-335
47. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(2):157-162
48. Korf B. Genetyka człowieka. *PWN* 2004; 1-366
49. Hsieh L, Huang Y. Loss of heterozygosity of APC/MCC gene in differentiated and undifferentiated gastric carcinomas in Taiwan. *Cancer Lett* 1995; 96(2):169-174

50. Matozaki T, Sakamoto C, Matsuda K, Suzuki T, Konda Y, Nakano O, Wada K, Uchida T, Nishisaki H, Nagao M. Missense mutations and a deletion of the p53 gene in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182(1):215-223
51. Iwamatsu H, Nishikura K, Watanabe H, Ajioka Y, Hashidate H, Kashimura H, Asakura H. Heterogenity of p53 nutational status in the superficial spreading type of early gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2001; 4(1):21-26
52. Haupt S, Haupt Y. Improving Cancer Therapy Through p53 Management. *Cell Cycle* 2004; 3(7):912-916
53. Tong JHM, To KF, Lay J, Lee TL, Lo KW, Leung WK, Tang NL, Chan FK, Sung JJ, Chung SC. Somatic Beta-catenin mutation in gastric carcinoma – an infrequent event that is not specific for microsatellite instability. *Cancer Lett* 2001; 163(1):125-130
54. Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular Characterization of Undifferenciated-Type Gastric Carcinoma. *Lab Invest* 2001; 81(4):593-598
55. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000; 87(8):992-1005
56. El-Rifai W, Powell SM. Molecular Biology of Gastric Cancer. *Sem Rad Onc* 2002; 12(2):128-140
57. Hamilton SR, Aaltonen LA. WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System; *IARC PRESS* 2000; 221-230.
58. Stachura J, Domagała W. Patologia – znaczy słowo o chorobie t. I. *PAU* 2004; 1-450
59. Arber N, Shapira I, Ratan J, Stern B, Hibshoosh H, Moshkowitz M, Gammon M, Fabian I, Halpern Z. Activation of c-K-ras mutations in Human Gastrointestinal Tumors. *Gastroenterology* 2000; 118(6):1045-1050
60. Van Aken EH, Papeleu P, De Potter P, Bruyneel E, Philippe J, Seregard S, Kvanta A, De Laey JJ, Mareel MM. Structure and function of the N-cadherin/catenin complex in retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(3):595-602
61. Herrenknecht K, Ozawa M, Eckerskorn C, Lottspeich F, Lenter M, Kemler R. The uvomorulin-anchorage protein alpha-catenin is a vinculin homologue. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88(20):9156-9160
62. Nagafuchi A, Takeichi M, Tsukita S. The 102 kD cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 1991; 65(5):849-857
63. Oda T, Kanai Y, Shimoyama Y, Nagafuchi A, Tsukita S, Hirohashi S. Cloning of the human alpha-catenin cDNA and its aberrant mRNA in a human cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193(3):897-904
64. Furukawa Y, Nakatsuru S, Nagafuchi A, Tsukita S, Muto T, Nakamura Y, Horii A. Structure, expression and chromosome assignment of the human catenin (cadherin-associated protein) alpha 1 gene (CTNNA1). *Cytogenet Cell Genet* 1994; 65(1-2):74-78
65. Abutaily AS, Collins JE, Roche WR. Cadherins, catenins and APC in pleural malignant mesothelioma. *J Pathol* 2003; 201(3):355-362
66. Torbenson M, Kannangai R, Abraham S, Sahin F, Choti M, Wang J. Concurrent evaluation of p53, beta-catenin, and alpha-fetoprotein expression in human hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(3):377-382
67. Hirano S, Kimoto N, Shimoyama Y, Hirohashi S, Takeichi M. Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell* 1992; 70(2):293-301
68. Pokutta S, Weis WI. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Moll Cell* 2000; 5(3):533-543
69. Kraus C, Liehr T, Hulsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 1994; 23(1):272-274
70. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 1991; 254(5036):1359-1361
71. Nollet F, Berx G, Molemans F, van Roy F. Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics* 1996; 32(3):413-424
72. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275(5307):1787-1790

73. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997; 275(5307):1784-1787
74. Utsunomiya T, Doki Y, Takemoto H, Shiozaki H, Yano M, Inoue M, Yasuda T, Fujiwara Y, Monden M. Clinical significance of disordered beta-catenin expression pattern in human gastric cancers. *Gastric Cancer* 2000; 3(4):193-201
75. Kim JC, Koo KH, Kim HC, Kim JS, Kang GH. Geno- and pheno-typic characterization in ten patients with double-primary gastric and colorectal adenocarcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19(6):561-568
76. Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(19):10330-10334
77. Van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; 111(2): 41-250
78. Rodova M, Islam MR, Maser RL, Calvet JP. The polycystic kidney disease-1 promoter is a target of the beta-catenin/T-cell factor pathway. *J Biol Chem* 2002; 277(33):29577-29583
79. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(8):4262-4266
80. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275(5307):1790-1792
81. Legoix P, Bluteau O, Bayer J, Perret C, Balabaud C, Belghiti J, Franco D, Thomas G, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene* 1999; 18(27):4044-4046
82. Sagae S, Kobayashi K, Nishioka Y, Sugimura M, Ishioka S, Nagata M, Terasawa K, Tokino T, Kudo R. Mutational analysis of beta-catenin gene in Japanese ovarian carcinomas: frequent mutations in endometrioid carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(5):510-515
83. Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* 1999; 59(2): 269-273
84. Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51(8):2185-2192
85. Berx G, Staes K, van Hengel J, Molemans F, Bussemakers MJ, van Bokhoven A, van Roy F. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 1995; 26(2):281-289
86. Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 2003; 422(6929):317-322
87. Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(3):855-859
88. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54(14):3845-3852
89. Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T, Hirohashi S. E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(5):1858-1862
90. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet* 1994; 7(1):98-102
91. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995; 14(24):6107-6115
92. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55(22):5195-5199
93. Tamura G, Sato K, Akiyama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular Characterization of Undifferenciated-Type Gastric Carcinoma. *Lab Invest* 2001; 81(4):593-598

94. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392(6672):190-193
95. Stone J, Bevan S, Cunningham D, Hill A, Rahman N, Peto J, Marossy A, Houlston RS. Low frequency of germline E-cadherin mutations in familial and nonfamilial gastric cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(11-12):1935-1937
96. Guilford P. E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 1999; 5(4):172-177
97. Laidler P, Gil D, Pituch-Noworolska A, Ciolczyk D, Ksiazek D, Przybylo M, Litynska A. Expression of beta1-integrins and N-cadherin in bladder cancer and melanoma cell lines. *Acta Biochim Pol* 2000; 47(4):1159- 1170
98. Ilyas M, Tomlinson IP, Hanby A, Talbot IC, Bodmer WF. Allele loss, replication errors and loss of expression of E-cadherin in colorectal cancers. *Gut* 1997; 40(5):654-659
99. Oliveira C, de Bruin J, Nabais S, Ligtenberg M, Moutinho C, Nagengast FM, Seruca R, van Krieken H, Carneiro F. Intragenic deletion of CDH1 as the inactivating mechanism of the wild-type allele in an HDGC tumour. *Oncogene* 2004; 23(12):2236-2240
100. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2):76-83
101. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A. The transition factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2):84-89
102. Jamal S, Schneider RJ. UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin Invest* 2002; 110(4):443-452
103. Kawasaki Y, Sato R, Akiyama T. Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nature Cell Biol* 2003; 5(3):211-215
104. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 2001; 292(5522):1722-1725
105. Mansouri A, Goodfellow P N, Kemler R. Molecular cloning and chromosomal localization of the human cell adhesion molecule uvomorulin (UVO). *Cytogenet Cell Genet* 1987; 46(1): 655
106. Becker KF, Reich U, Schott C, Hoefler H. Single nucleotide polymorphisms in the human E-cadherin gene. *Hum Genet* 1995; 96(6):739-740
107. Pecina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 2003; 3(1):1-7
108. Sokoloff B. Predisposition to cancer in the Bonaparte family. *Am J Sur* 1938; 40(1):673-678
109. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Weisner GL, Powell SM, Lewis RF, Huntsman D, Pharoah PD, Jankowski J, Mac Leod P, Vpgelsang H, Keller G, Park K, Richards FM, Macher E, Gayther S, Oliveira C, Grehan N, Wight D, Seruca R, Roviello F, Ponder BA, Jackson C. Familial Gastric Cancer: overview and gudelines for menagement. *J Med Genet* 1999; 36(12):873-870
110. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, Rajput Aweisner GL, Lindor N, Bugart LJ, Torro TT, Lee D, Leimacher JM, Shaw DW, Rindlay MP, Reeve AE. E-cadherin Germline Mutations Define as Inherited Cancer Syndrome Dominated by Diffuse Gastric Cancer. *Hum Mutat* 1999; 14(3):249-255
111. Berx G, Becker K, Hoefler H, Van Roy F. Mutations of the CDH1 Gene. *Hum Mutat* 1998; 12(5):226-237
112. Oliveira C, Suriano G, Ferreira P, Canedo P, Kaurah P, Mateus R, Ferreira AM, Ferreira AC, Oliveira CJ, Figueiredo C, Carneiro F, Keller G, Huntsman D, Machado JC, Seruca R. Genetic Screening for Familial Gastric Cancer. *Hereditary Cancer Clin Pract* 2004; 2(2):51-64
113. Lewis FR, Mellinger JD, Hayashi A, Lorelli D, Monaghan KG, Carneiro F, Huntsman DG, Jackson CE, Caldas C. Prophylactic total gastrectomy for familial gastric cancer. *Surgery* 2001; 130(4):612-619
114. Fitzgerald RC, Caldas C. Clinical implications of E-cadherin associated hereditary diffuse gastric cancer. *Gut* 2004; 53(6):775-778
115. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, Maung R, Seruca R, Jackson CE, Caldas C. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *New Engl J Med* 2001; 344(25):1904-1909
116. Dunbier A, Guilford P. Hereditary diffuse gastric cancer. *Adv Cancer Res* 2001; 83(1):55-65

117. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. International Gastric Cancer Linkage Consortium; Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001; 121(6):1348-1353
118. Ikonen T, Matikainen M, Mononen N, Hyytinen ER, Helin HJ, Tommola S, Tammela TL, Pukkala E, Schleutker J, Kallioniemi OP, Koivisto PA. Association of E-cadherin germ-line alterations with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11):3465-3471
119. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392(6674):402-405
120. Gayther SA, Gorringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K, MacLeod P, Powell SM, Jackson CE, Ponder BA, Caldas C. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 1998; 58(18):4086-4089
121. Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, Cole TR, Evans DG, Jankowski JA, McKeown C, Sanders DS, Maher ER. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet 1999;* 8(4):607-610
122. Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, Huntsman D, Suriano G, Machado JC, Kiviluoto T, Aaltonen L, Jackson CE, Seruca R, Caldas C. Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat* 2002; 19(5):510-517
123. Yoon KA, Ku JL, Yang HK, Kim WH, Park SY, Park JG. Germline mutations of E-cadherin gene in Korean familial gastric cancer patients; *J Hum Genet* 1999; 44(3):177-180
124. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, Rajput A, Wiesner GL, Lindor NM, Burgart LJ, Toro TT, Lee D, Limacher JM, Shaw DW, Findlay MP, Reeve AE. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat 1999;* 14(3):249-255
125. Park JG, Yang HK, Kim WH. Report of the first meeting of the International Collaborative Group of Heredietary Gastric Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(21):1781-1782
126. 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(1):181-187
127. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YS, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, MacGillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D. 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(7):508-517
128. Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lubbert M, Zhou JH, Benedict WF, Jones PA. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(19):1465-1472
129. Latham KE. X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo. *Trends Genet* 1996 12(4):134-138
130. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 1994; 7(4):536-540
131. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61(8):3225-3229
132. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001; 20(24):3156-3165
133. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000; 26(1):16-17
134. Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61(7):2847-2851
135. Machado JC, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. E-cadherin mutations in gastric carcinoma. *J Pathol* 2000; 191(4):466-467

136. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 2001; 20(12):1525-1528
137. Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF. Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut* 2001; 48(3):367-371
138. Wheeler JM, Warren BF, Mortensen NJ, Kim HC, Biddolph SC, Elia G, Beck NE, Williams GT, Shepherd NA, Bateman AC, Bodmer WF. An insight into the genetic pathway of adenocarcinoma of the small intestine. *Gut* 2002; 50(2):218-223
139. Oue N, Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, Yoshida K, Matsusaki K, Yasui W. DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: association with histological type and CpG island methylator phenotype. *Cancer Sci* 2003; 94(10):901-905
140. Graziano F, Arduini F, Ruzzo A, Bearzi I, Humar B, More H, Silva R, Muretto P, Guilford P, Testa E, Mari D, Magnani M, Cascinu S. Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(8):2784-2789
141. Kanai Y, Ushijima S, Hui AM, Ochiai A, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 71(3):355-359
142. Saito Y, Takazawa H, Uzawa K, Tanzawa H, Sato K. Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5′ CpG island. *Int J Oncol* 1998; 12(2):293-298
143. Azarschab P, Porschen R, Gregor M, Blin N, Holzmann K. Epigenetic control of the E-cadherin gene (CDH1) by CpG methylation in colectomy samples of patients with ulcerative colitis. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35(2):121-126
144. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55(22):5195-5199
145. Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, Fogt F, Forastiere AA, Herman JG, Wu TT. Frequent Hypermethylation of the 5′ CpG island of E-cadherin in esophegal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7(1):2765-2769
146. Dhillon VS, Young AR, Husain SA, Aslam M. Promoter hypermethylation of MGMT, CDH1, RAR-beta and SYK tumour suppressor genes in granulosa cell tumours (GCTs) of ovarian origin. *Br J Cancer* 2004; 90(4):874-881
147. Horikawa Y, Sugano K, Shigyo M, Yamamoto H, Nakazono M, Fujimoto H, Kanai Y, Hirohashi S, Kakizoe T, Habuchi T, Kato T. Hypermethylation of an E-cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J Urol* 2003; 169(4):1541-1545
148. Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 2003; 163(4):1371-1378
149. Azarschab P, Stembalska A, Loncar MB, Pfister M, Sasiadek MM, Blin N. Epigenetic control of E-cadherin (CDH1) by CpG methylation in metastasising laryngeal cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2):501-503
150. House MG, Guo M, Efron DT, Lillemoe KD, Cameron JL, Syphard JE, Hooker CM, Abraham SC, Montgomery EA, Herman JG, Brock MV. Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. *J Gastrointest Surg* 2003; 7(8):1004-1014
151. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64(6):1975-1986
152. Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 2002; 296(5571):1308-1313
153. Ahrens T, Pertz O, Haussinger D, Fauser C, Schulthess T, Engel J. Analysis of heterophilic and homophilic interactions of cadherins using the c-Jun/c-Fos dimerization domains. *J Biol Chem* 2002; 277(22):19455-19460
154. Overduin M, Harvey TS, Bagby S, Tong KI, Yau P, Takeichi M, Ikura M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 1995; 267(5196):386-389
155. Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109(1):121-124

156. Rogan PK, Faux BM, Schneider TD. Information analysis of human splice site mutations. *Hum Mutat* 1998; 12(3):153-171
157. Moczko JA. Analiza czasów przeżycia w badaniach medycznych. *Neuroskop* 2003; 5(1):121-125
158. 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(1):31-49
159. Białas M. Stan zróżnicowania i typ naciekania raka żołądka w powiązaniu z mutacjami genu *E-kadheryny* w sporadycznych rakach żołądka (praca doktorska). *Uniwersytet Jagielloński w Krakowie* 2005; 1-107
160. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut* 1992; 33(5):606-612
161. Czopek JP. Niestabilność mikrosatelitarnego DNA w sporadycznych rakach żołądka (praca doktorska). *Uniwersytet Jagielloński w Krakowie* 2004; 1-87
162. Sudo M, Chong JM, Sakuma K, Ushiku T, Uozaki H, Nagai H, Funata N, Matsumoto Y, Fukayama M. Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 109(2):194-199
163. Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Ukozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Taniguchi H, Aburatani H, Fukayama M. Global and Non-random CpG island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci* 2003; *94*(1):76-80
164. Concolino P, Papa V, Mozzetti S, Ferlini C, Pacelli F, Martinelli E, Ricci R, Filippetti F, Scambia G, Doglietto GB. The unsolved enigma of CDH1 down-regulation in hereditary diffuse gastric cancer. *J Surg Res* 2004; 121(1):50-55
165. Carvalho B, Pinto M, Cirnes L, Oliveira C, Machado JC, Suriano G, Hamelin R, Carneiro F, Seruca R. Concurrent hypermethylation of gene promoters is associated with a MSI-H phenotype and diploidy in gastric carcinomas. *Eur J Cancer* 2003; 39(9):1222-1227
166. Mingchao, Devereux TR, Stockton P, Sun K, Sills RC, Clayton N, Portier M, Flake G. Loss of E-cadherin expression in gastric intestinal metaplasia and later stage p53 altered expression in gastric carcinogenesis. *Exp Toxicol Pathol* 2001; 53(4):237-246
167. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(7):569-573
168. Brock MV, Gou M, Akiyama Y, Muller A, Wu TT, Montgomery E, Deasel M, Germonpre P, Rubinson L, Heitmiller RF, Yang SC, Forastiere AA, Baylin SB, Herman JG. Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(8):2912-2919
169. Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Hinoda Y, Imai K. Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *Int J Cancer* 1999; 83(3):309-313
170. Kim H, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim H. Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2003; 200(1):23-31
171. House MG, Herman JG, Guo MZ, Hooker CM, Schulick RD, Lillemoe KD, Cameron JL, Hruban RH, Maitra A, Yeo CJ. Aberrant hypermethylation of tumor suppressor genes in pancreatic endocrine neoplasms. *Ann Surg* 2003; 238(3):423-431
172. Sakuma K, Chong JM, Sudo M, Ushiku T, Inoue Y, Shibahara J, Uozaki H, Nagai H, Fukayama M. High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 112(2):273-278