GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Gazi

1926

TRANSLOKASYON İLİŞKİLİ DİFFÜZ İNFİLTRATİF MİDE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN TANIMLANMASI

Aynur IŞIK

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EKİM 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aynur IŞIK
16/10/2023

TRANSLOKASYON İLİŞKİLİ DİFFÜZ İNFİLTRATİF MİDE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER, İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN TANIMLANMASI

(Doktora Tezi)

Aynur IŞIK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2023

ÖZET

Mide kanseri her yıl bir milyon bireyi etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Teşhis edildiğinde bile genellikle ileri evrede ve metastatik olan hastalığın tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Günümüzde mide kanserinin moleküler alt yapısını oluşturan genetik değişikliklerin belirlenmesi tanı ve tedaviyi yönlendirmek için giderek önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasının birincil amacı, mide kanserlerinde daha önce tanımlanmış *CLDN18* geninin beşinci ekzonu ile *ARHGAP26* geninin on ikinci ekzonu arasında gerçekleşen interkromozomal gen füzyonunun geniş bir Türk hasta kohortunda, yerinde revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (*in situ* RT-PCR) yöntemiyle araştırılması ve sonuçların olgulara ait klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılmasıdır. Tezin ikincil amacı ise hedef genlerden *CLDN18*'in sadece mide epitelinde sentezlenen CLDN18.2 varyantının mide kanserindeki ifadesinin immünhistokimyasal yöntemle araştırılmasıdır. Çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda primer mide karsinomu tanısı almış 263 vakaya ait tümör örneklerinden doku mikrodizin blokları hazırlanarak elde edilen boyasız kesitler kullanılmıştır. Olguların 27 tanesinde *CLDN18-ARHGAP26* gen füzyonu tespit edilmiştir. Translokasyonlu olguların kadın erkek dağılımları benzerdir olup sağkalımlar arasında anlamlı fark mevcut değildir. Tümör derecesi değerlendirildiğinde vakaların %92,5'nin ileri evre tümör derecesine sahip olduğu belirlenmiştir. Olguların %77,2'sinde lenf nodlarına metastaz mevcuttur. Gen füzyonu pozitifliği ve tümör morfolojisi arasındaki ilişki incelendiğinde vakaların %25,9'unun morfolojik olarak sınıflandırılamayan nadir histomorfoloji sergileyen tümörler içinde yer aldığı belirlenmiştir. Füzyon pozitifliği ile yaş, cinsiyet, sağkalım arasında istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir. CLDN18.2 tüm vakaların %7,8'inde pozitiftir, CLDN18.2 ekspresyonu cinsiyet, TNM evresi, histolojik alt tip ve genel sağkalımla ilişkili değildir. Bu çalışma kapsamında mide tümörlerinde mevcut olan gen füzyonlarının tespiti için *in situ* RT-PCR yöntemi yaklaşımı geliştirilmiş olup bu yöntemin optimizasyonu ve farklı yöntemlerle validayonu gerekmektedir. Ayrıca mide kanserlerinde potansiyel bir biyobelirteç olan CLDN18.2 ekspresyonu geniş Türk hasta kohortunda çalışılmıştır.

Bilim Kodu	:	20326
Anahtar Kelimeler	:	Moleküler biyoloji, moleküler patoloji
Sayfa Adedi	:	76
Danışman	:	Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN
İkinci Danışman	:	Prof. Dr. Aytekin AKYOL

IDENTIFICATION OF MOLECULAR, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND CLINICOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TRANSLOCATION-ASSOCIATED DIFFUSE INFILTRATIVE GASTRIC CANCER

(Ph.D. Thesis)

Aynur IŞIK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

October 2023

ABSTRACT

Gastric cancer is a global health problem affecting one million individuals each year. The treatment options of the disease, which is usually advanced and metastatic even when diagnosed, are quite limited. Today, the identification of genetic alterations that form the molecular substructure of gastric cancer is gaining importance to guide diagnosis and treatment. The primary aim of this thesis is to investigate the interchromosomal gene fusion between the fifth exon of the *CLDN18* gene and the twelfth exon of the *ARHGAP26* gene in a large Turkish patient cohort by *in situ* reverse transcriptase polymerase chain reaction (*in situ* RT-PCR) method and to compare the results with the clinicopathological data of the cases. The secondary aim of the thesis is to examine the expression of the CLDN18.2 variant of the target gene CLDN18, which is synthesized only in the gastric epithelium, in gastric cancer by immunohistochemical method. In the study, unstained sections obtained by preparing tissue microarray blocks from tumor samples of 263 cases diagnosed as primary gastric carcinoma in Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology were used. *CLDN18-ARHGAP26* gene fusion was detected in 27 of all cases. The distribution of cases with translocation in male and female is similar, and there is no significant difference in survival. When the tumor grade was evaluated, it was determined that 92.5% of the cases had advanced tumor grade. Metastasis to lymph nodes occurred in 77.2% of the cases. When the relationship between gene fusion positivity and tumor morphology was examined, 25.9% of the cases were in the group called morphologically unclassifiable rare tumors. No statistical significance was found between fusion positivity and age, gender and survival. CLDN18.2 was positive in 7.8% of all cases, CLDN18.2 expression was not associated with gender, TNM stage, histological subtype and overall survival. Within the scope of this study, an in situ RT-PCR method approach was developed for the detection of gene fusions present in gastric tumors, and optimization of this method and validation with different methods are required. Additionally, the expression of CLDN18.2, a potential biomarker in gastric cancers, was studied in a large Turkish patient cohort.

Science Code : 20326
Key Words : Molecular biology, molecular pathology
Page Number : 76
Supervisor : Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN
Co-Supervisor : Prof. Dr. Aytekin AKYOL

TEŞEKKÜR

Doktora sürecinde değerli bilgilerini benden esirgemeyen ve tez çalışmamı gerçekleştirmem için gerekli imkanları sağlayan sayın danışmanlarım Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN ve Prof. Dr. Aytekin AKYOL'a,

Tez çalışmamın her aşamasına katkı sağlayan tez izleme komitesinin değerli hocaları Prof. Dr. Şule COŞKUN CEVHER ve Doç. Dr. M. Türker DUMAN'a,

Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimimde emeği geçen başta sayın hocam Prof. Dr. Yusuf KALENDER olmak üzere saygıdeğer hocalarım Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerine,

Ekip arkadaşlarım, Dr. Ayşenur GÖK ve Dr. Sarp UZUN'a,

Akademik eğitimimin ve hayatımın her aşamasında destek olan eşim Op. Dr. Mustafa IŞIK'a Sevgili çocuklarım Stj. Dr. Egemen Bora IŞIK ve Egehan Orçun IŞIK'a, Çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Mide Embriyolojisi ve Histolojisi 3

2.2. Mide Kanseri 4

2.2.1. Mide kanseri epidemiyolojisi 6

2.3. Mide Kanseri Risk Faktörleri 9

2.3.1. Yaş ve cinsiyet 9

2.3.2. Helicobacter pylori (H. pylori) Enfeksiyonu 9

2.3.3. *Epstein-Barr* virüsü (EBV) 10

2.4. Mide Kanseri ile İlişkili Genetik Faktörler 12

2.5. Mide Kanserinin Belirtileri 13

2.6. Mide Kanserindeki Tedavi Yaklaşımları 13

2.7. Diffüz Tip Mide Kanseri 14

2.7.1. Diffüz tip mide kanserinde hücre bağlantıları ile ilişkili genler 15

2.7.2. *CDH1* / E cadherin 17

2.7.3. *RHOA* 18

Sayfa

2.7.4. *CLAUDİN* 18 19

2.7.5. ARHGAP26 / GRAF 22

2.8. Füzyon Genleri 24

3. GEREÇ VE YÖNTEM 27

3.1. Mide Karsinomu Olgularının Seçilmesi 27

3.2. Doku Mikro Dizinlerinin Oluşturulması 27

3.3. Formalin ile Fikse edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) Doku Kesitinden DNA İzolasyonu 29

3.4. FFPE Doku Kesitlerinden RNA İzolasyonu 29

3.5. Komplementer DNA (c DNA) Sentezi 29

3.6. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Planlaması ve Dizayn Edilmesi 30

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR) 32

3.8. İn situ Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İn situ PCR) ve İn situ Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İn situ RT-PCR). 32

3.8.1. İn situ polimeraz zincir reaksiyonu (İn situ PCR) 33

3.8.2. İn situ revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (İn situ RT-PCR) 35

3.9. İmmünhistokimyasal Boyama 37

3.10. One Step Revers Kriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu 38

3.11. İstatistiksel Analizler 39

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 41

4.1. Olguların Klinik ve Patolojik Özellikleri 41

4.2. İn situ PCR Çalışması Sonuçları 44

4.3. İn situ RT-PCR Çalışması İle Elde Edilen Bulgular 47

4.4. FFPE Dokularda Revers Transkripsiyon RT-PCR Bulguları 48

4.5. İmmünhistokimyasal (İHK) Boyama Sonuçları 51

4.5.1. E-cadherin, CLDN18, ARHGAP26 ifadesinin immünhistokimyasal boyama ile değerlendirilmesi 51

Sayfa

4.5.2. CLDN18.2 geninin mide karsinomlarındaki ifadesinin immünhistokimyasal boyama ile değerlendirilmesi 52

5. TARTIŞMA 57

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 63

KAYNAKLAR 65

EKLER 73

EK-1. Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni 74

ÖZGEÇMİŞ 75

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Mide kanserinde kalıtsal yatkınlıkla ilişkili genler ve kanser sendromları 13

Çizelge 2.2. Mide kanserinde TNM sınıflaması ve evreleme..... 14

Çizelge 2.3. Diffüz Tip Mide kanserine özgü gen mutasyonları 16

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasalların listesi 27

Çizelge 3.2. cDna reaksiyonu için gerekli malzeme miktarları 30

Çizelge 3.3. cDNA sentezi için termal döngü programı 30

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan primerler..... 31

Çizelge 3.5.Polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli malzemeler ve miktarları 32

Çizelge 3.6. Polimeraz zincir reaksiyonu termal döngü programı..... 32

Çizelge 3.7. İn situ PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları 34

Çizelge 3.8. İn situ PCR termal döngü programı..... 35

Çizelge 3.9. Tek aşamalı in situ RT-PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları..... 36

Çizelge 3.10. Tek aşamalı in situ RT- PCR termal döngü programı 37

Çizelge 3.11. İmmünhistokimyasal boya için kullanılan antikorlar 38

Çizelge 3.12. One step RT-PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları 38

Çizelge 3.13. One step RT- PCR termal döngü programı 38

Çizelge 4.1. CLDN18.2 pozitif olgularının klinik ve patolojik özellikleri..... 55

Çizelge 4.2. CLDN18.2 immünhistokimyasal boya sonuçları ve hasta karakteristiği ... 56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. GLOBOCAN 2018 verileri yaşa göre standardize edilmiş cinsiyete ve bölgeye özgü mide kanseri oranları 7

Şekil 2.2. Dünya genelinde kadınlar arasında en çok ölüme neden olan on kanserin yüzde dağılımları 7

Şekil 2.3. Dünya genelinde erkekler arasında en çok ölüme neden olan on kanserin yüzde dağılımları 8

Şekil 2.4. Türkiye'de tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları 8

Şekil 2.5. Türkiye'de tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları 9

Şekil 2.6. *CLDN18.1* ve *CLDN18.2* proteinleri ve alternatif ekzonları 20

Şekil 2.7. Claudin 18 protein modeli 21

Şekil 3.1. CLDN18-ARHGAP26 genleri arasında füzyon sekans 31

Şekil 3.2. CLDN18-ARHGAP26 mRNA'sının transkribe edildiği gen bölgesi kırmızı altı çizili alan iki gen arasındaki füzyonu göstermektedir 31

Şekil 4.1. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu pozitif olguların sağkalım eğrisi..... 43

Şekil 4.2. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu negatif olguların sağkalım eğrisi 43

Şekil 4.3. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu negatif ve pozitif olguların sağkalım eğrisi..... 44

Şekil 4.4. CLDN18.2 negatif ve pozitif mide adenokarsinomlarının sağkalım eğrisi 53

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. A. Quik Mold Kalıp B. Boş parafin blok..... 28

Resim 3.2. TMA-M10, TMA-M11, TMA-M12,TMA-M13 doku mikrodizin blokları . 28

Resim 3.3. İn situ RT-PCR için kullanılan thermal cycler cihazı..... 34

Resim 4.1. *GAPDH* genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü..... 45

Resim 4.2. *CLDN18* genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü..... 46

Resim 4.3. TMA-M8 vaka numarası: A2,A: HE, B: GAPDH İn situ PCR görüntüsü... 46

Resim 4.4. TMA-M4 E4 A- HE ve B-Füzyona özgü primerler ile in situ RT-PCR görüntüsü 47

Resim 4.5. TMA M4 D5 A-B)Müsinöz karsinom HE C-D) in situ RT-PCR, Füzyon pozitif olgular 47

Resim 4.6. in situ PCR, Füzyon negatif olgular (A-B)..... 48

Resim 4.7. U6 genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü..... 48

Resim 4.8. Füzyona özgü primerler ile ile RT-PCR çalışması sonucu agaroz jel görüntüsü 49

Resim 4.9. One Step RT-PCR, *Beta-actin* genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü 49

Resim 4.10. Füzyona özgü primerler ile One step RT-PCR agaroz jel görüntüsü 50

Resim 4.11. TMA-M8 lokalizasyonundaki hastaya ait immunohistokimyasal boya görüntüsü 51

Resim 4.12. Mide adenokarsinomlarında CLDN18.2 ekspresyonu 54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
ul/ µL	mikrolitre
µm	mikrometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
ARHGAP26	Rho GTPaz aktive edici protein 26
BRCA2	Meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini
EBNA	EBV nükleer antijeni
EBV	Epstein-Barr virüs
EBVaGC	Epstein-Barr virüsü ile ilişkili mide karsinomu
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
Cdc42	Hücre bölünmesi kontrol proteini 42 homologu
CDH1	Cadherin 1 geni
CDKN2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2a
CIN	Kromozomal instabil
circRNA	Sirküler RNA
CLDN18	Claudin 18
CLDN-18.2	Claudin-18 izoform 2
CREB	Siklik AMP tepki elemanı bağlayıcı protein
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FAK	Fokal adezyon kinaz
FIGC	Ailesel intestinal mide kanseri
GAPPS	Midenin proksimal polipozis sendromu
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GS	Genomik stabil

Kısaltmalar	Açıklamalar
HDGK	Herediter diffüz gastrik kanser
H. pylori	Helicobacter pylori
LMP1	Latent membrane proteini 1
LMP2	Latent membran proteini 2
MLH1	MutL homolog 1
MMR	Hatalı eşleşme onarım
MSH2	MutS protein homolog 2
MSH6	MutS protein homolog 6
MSI	Mikrosatellit instabilite
NGS	Yeni nesil dizileme
PMS2	PMS1 homolog 2
Rac1	Ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1
RHOA	Ras homolog gen ailesi A üyesi
RNA	Ribonükleik asit
RNA-seq	RNA dizileme
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TNM	Tümör, lenf nodu ve metastaz evreleme sistemi
TP53	Tümor Protein 53
WES	Tüm ekzom dizileme

1. GİRİŞ

Kanser 200 milyon yıldır çok hücreli canlılarda görülen karmaşık ve korkutucu bir hastalıktır. 1 milyon yıl önceye dayanan kanıtlar modern insanın atalarının da kanserden muzdarip olduğunu göstermektedir (Hausman, 2019). Kanser hücredeki küçük değişikliklerle başlar. Oluşan kanser hücresinin istilacı bir popülasyona dönüşmesi çevresel faktörlerin, enfeksiyonlar ve inflamasyon gibi etmenlerin katkısıyla onlarca yıl alabilir (Terzic, Grivennikov, Karin, ve Karin, 2010). Normal hücreler neoplastik duruma; büyüme sinyallerinde kendi kendine yetebilirlik, büyümeyi önleyici sinyallere karşı duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünün önlenmesi, sınırsız replikasyon potansiyeli kazanma, anjiyogenez, bağışıklık sisteminden kaçabilme, doku istilası ve metastaz yapabilme özelliklerini kazanarak kademeli olarak dönüşür (Hanahan & Weinberg, 2011).

Mide kanseri, erkeklerde en sık görülen beşinci, kadınlar arasında en sık görülen yedinci kanserdir. Kanser ilişkili ölümlerde üçüncü sırayı alan önemli bir mortalite nedenidir (Bray et al., 2018). Mide karsinomlarının histopatolojik olarak en eski ve en sık kullanılan Lauren sınıflaması göre; intestinal ve diffüz tip karsinomlar olmak üzere iki temel alt gruba ayrılmaktadır (Lauren, 1965). 2015 yılında Kanser Genom Atlas projesi kapsamında moleküler düzeyde mide kanserleri incelenmiş ve Epstein-Bar virüs (EBV) ile ilişkili, mikrosatellit instabil (MSI), genomik stabil (GS), kromozomal instabil (CIN) olmak üzere dört alt gruba ayırılmıştır. GS mide kanserleri tüm mide kanserlerinin %20'sini oluşturmaktadır. Histolojik ve klinik olarak değerlendirildiğinde %73'ü diffüz tip mide kanseri özelliklerini göstermektedir. Bu grubun moleküler altyapısını %37 oranında *CDH1* gen mutasyonu, %15 Ras homolog gen ailesi A üyesi (*RHOA*) mutasyonu ve %15 CLAUDIN 18 (*CLDN18*) ve Rho GTPaz aktive edici protein 26 (*ARHGAP26*) genleri arasındaki gen füzyonu oluşturmaktadır (Cancer Genome Atlas Research, 2014).

Bu tez çalışmasının amacı ülkemizde günümüze kadar tanımlanmamış *CLDN18-ARHGAP26* gen füzyonu ile ilişkili mide kanserlerini özgün yöntemler ile belirlemek genetik, histopatolojik ve immünhistokimyasal profillerini gösteren belirteçleri bulmak ve grupta yer alan hastaların belirlenmesi için uygun olabilecek yeni yöntemlerin belirlenmesine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide Embriyolojisi ve Histolojisi

Mide, besinlerin geçici olarak depolanması, mekanik karıştırma, asit ve enzimler yoluyla parçalanması, bağışıklık ve metabolik homeostazın hormonal olarak düzenlenmesi gibi sayısız fonksiyona sahiptir. Mide gastrointestinal kanalda özofagusun proksimalinde deuodenumun distalinde yer alır. Endoderm tabakasından gelişen ilkel mide gebeliğin dördüncü haftasında ön bağırsak kaudalinin füziform genişlemesi ile oluşmaya başlar. Ventral mezanter ve dorsal mezanter mideye ön ve arkadan bağlanarak mideyi periton boşluğunda askıya alır. Mide duvarının dorsal kısmı ventral kısımdan daha hızlı büyüdüğü için büyük ve küçük kurvaturlar oluşur mide ‘’J’’ şeklini alır. Yaklaşık yedinci ve sekizinci haftalarda foregut geliştikçe; mide kraniokaudal eksen boyunca saat yönünde 90 derece döner, böylece ventral mezanter midenin sağında dorsal mezanter midenin solunda yer alır. Ventral mezenter içinde mideye komşu organlardan karaciğer dorsal mezenterden dalak ve pankreas gelişir (Holger Till, 2017).

Mide kardiya, funduz, korpuz, antrum ve pilor olmak üzere beş anotomik bölgeye ayrılabilir. Mide, en dışta seroza tabakası ile sarılmıştır. Serozanın altında, mide içeriğini hareket ettirmeyi ve karıştırmayı sağlayan üç katmanlı bir kas tabakası olan muskularis propria bulunur. Muskularis'in altında destekleyici bir submukoza tabakası ve en içte mukoza bulunur. Mide mukozası glandüler yapıda kolumnar epitel ile döşenmiştir. Midenin proksimalinde, asit salgılayan parietal hücreler, pepsinojen üreten ‘’chief’’ hücreleri ve mukus salgılayan mukus hücrelerini içeren fundik bezler bulunur. Midenin distal bölgesi çoğunluğu mukus hücreleri ve gastrin salgılayan G hücreleri gibi endokrin hücreleri içeren pilorik bezlerden oluşmuştur. Mukoza epiteli ve içerdiği bezler, midenin çevre ile doğrudan temas halinde olduğu yüzeyini temsil eder. Yüzey epitel hücreleri savunma, absorbsiyon ve sindirim görevlerini yerine getirmek için sürekli olarak bölünür ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşır. Bu süreçte homeostazın korunabilmesi için hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gereklidir (McCracken & Wells, 2017).

2.2. Mide Kanseri

Mide kanseri olguların %90'nında glandüler epitelde başlar ve mide kanseri terimi neredeyse tamamen adenokarsinomları ifade eder. Geriye kalan %10'luk kısmı lenfoma, nöroendokrin tümörler ve midenin bazı nadir tümörlerdir (Liliac et al., 2021). Mide karsinomlarının sınıflaması karmaşıktır ve histopatolojik sınıflandırılması için Borrmann, Ming, Carniero, Goseki, Lauren ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflaması önerilmiştir (Dicken et al., 2005).

Mide kanserleri Lauren sınıflamasına göre intestinal ve diffüz tip mide karsinomları olarak iki temel alt gruba ayrılmaktadır (Lauren, 1965). Bu sınıflamaya göre olguların yaklaşık %50'si intestinal tip, %30'u diffüz tip ve %15-20'si sınıflandırılamayan ''indeterminate'' olarak kabul edilir. İntestinal tip mide karsinomları glandüler yapı oluşturan, iyi difarensiye ve genişleyen büyüme paternine sahip, prekanseröz lezyonlardan gelişir (Lauren, 1965).

Diffüz tip mide karsinomlarında tümör hücreleri adezyondan yoksundur, genellikle taşlı yüzük hücreleri içerir. Stroma boyunca yayılan invazif büyüme paternine sahip kötü difarensiye tümörlerdir. Diffüz tipte belirgin prekanseröz lezyonlar yoktur, tümör hücreleri lenf notlarına ve peritona çok hızlı metastaz yapma eğilimi gösterir. İki grubun morfolojilerinde olduğu gibi epidemiyolojileri, patolojileri ve genetik profilleri de birbirinden farklılık gösterir (Dicken et al., 2005; Iyer, Moslim, Farma, & Denlinger, 2020; Lauren, 1965).

DSÖ mide karsinomlarını morfolojik ve mikroskobik özelliklerine göre; papiller, tübüler, müsinöz, zayıf kohezif/taşlı yüzük hücreli karsinom olmak üzere dört alt grubu içeren histopatolojik sınıflandırmayı önermiştir. Bununla birlikte en çok kullanılan Lauren ve DSÖ sınıflandırma sistemlerinin prognostik önemi tartışmalıdır ve tedaviyi yönlendirmek için yetersizdir (Rustgi, Ching, & Kastrinos, 2021).

Mide kanserlerinin moleküler sınıflandırılması için farklı çalışma gruplarının araştırmaları bulunmaktadır. Bunlardan en dikkat çekeni 2014 yılında yayımlanan Kanser Genomu Atlası Araştırma Projesi (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA)'dir. Bu araştırma 295 primer mide karsinomundan oluşan geniş bir kohortta güncel analitik tekniklerin kullanıldığı, kapsamlı analizlere dayanan yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir. *Epstein-Barr* virüsü pozitif

tümörler (%9), mikrosatellit instabil tümörler (MSİ, %22), genomik stabil tümörler (GS, %20) ve kromozomal instabil tümörler (CIN, %50) olmak üzere dört alt grubu içerir. TCGA sınıflandırma sistemi, olası tedavi hedeflerinin belirlenmesi için de önemlidir (Cancer Genome Atlas Research, 2014). TCGA sınıflandırmasında öncelikle EBV pozitif mide karsinomları ve MSİ tümörler belirlenmiştir. Geriye kalan tümörler anöploidi durumlarına göre genomik stabil ve kromozomal instabil olmak üzere iki gruba daha ayrılmıştır.

Mikrosatellitler 1-6 nükleotitin ardışık olarak 10 ila 60 kez tekrar etmesi ile oluşan DNA dizileridir. Bu DNA motifleri, genomun kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri boyunca rastgele dağılmıştır. Popülasyon arasında oldukça polimorfiktir ancak bireylerde stabildir (Ratti, Lampis, Hahne, Passalacqua, & Valeri, 2018). Mikrosatellitler DNA sentezi sırasında polimerazın kayması nedeniyle mutasyonların birikmesine yatkın bölgelerdir. DNA hatalı eşleşme onarım (MMR) sistemi, DNA sentezinin doğruluğunu kontrol etmekten ve düzeltmekle sorumludur. MMR sistemi proteinleri DNA sentezi esnasında veya kimyasal ve fiziksel etkiler sonucunda oluşan yanlış eşleşmiş bazları, DNA eklentileri veya baz delesyonlarının oluşturduğu küçük halka yapılarını algılayabilen ve tamir eden heterodimerler olarak etkileşime giren bir grup proteindir. Ökaryotlarda MMR sistemde yer alan ana proteinler *MLH1, MSH2, MSH3, MSH6* ve *PMS2*'dir. Hatanın tespitinden *MSH2/MSH6* veya *MSH2/MSH3* protein kompleksleri sorumludur. Sonrasında *MLH1* ve *PMS2'*nin komplekse dahil olmasıyla tamamlanan sistem hatalı baz veya parçanın tamirine olanak tanır (Reyes, Schmidt, Kolodner, & Hombauer, 2015). Bu genlerdeki mutasyonlar herediter, sporadik veya epigenetik değişiklikler nedeniyle gerçekleşebilir. MMR gen proteinlerinin inaktivasyonuna, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin işlevini etkileyebilecek mutasyonların birikmesine ve hataların düzeltilmesindeki yetersizliklerden kaynaklanan genomik kararsızlığa neden olabilir (Styk et al., 2023). MMR sisteminin işlev kaybı, mikrosatellit kararsızlık (MSİ) olarak bilinen moleküler bir fenotip oluşturur (Vilar & Gruber, 2010). MSİ tümörlere sahip hastaların standart kemoterapilerle tedavi edilmeleri olumsuz hasta yanıtı ile sonuçlanmaktadır. Bu hastalar tek başına cerrahi ile tedavi edildiğinde sağ kalımın daha iyi olduğu, perioperatif kemoterapi sonrası cerrahi uygulamalarda ise sağ kalımın daha düşük olduğu görülmüştür (Joshi & Badgwell, 2021).

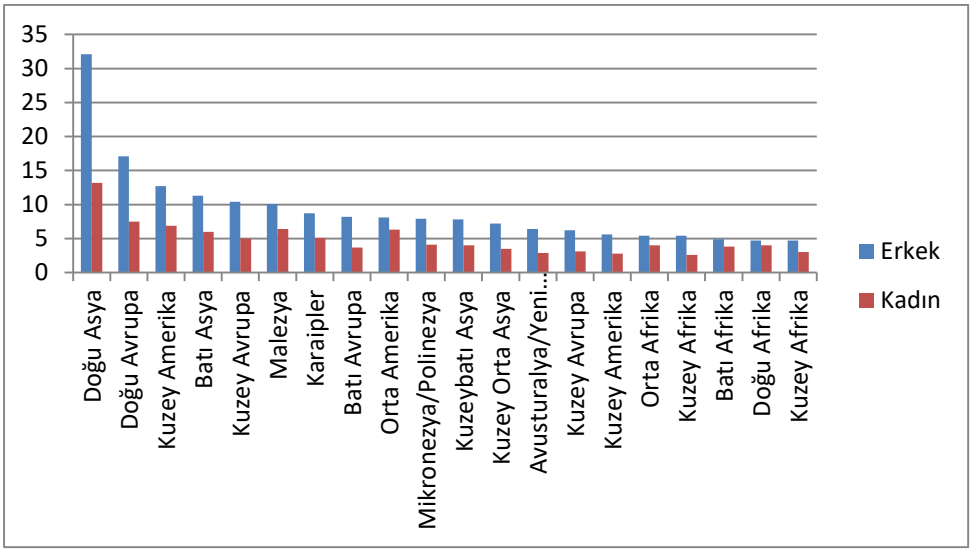
Genom kararlılığı, genetik materyali nesilden nesile veya bir somatik hücreden diğerine düzgün bir şekilde aktarılması için her organizmanın sahip olduğu bir özelliktir. Genetik materyalin (DNA veya RNA) hatasız bir şekilde çoğaltılması ve replikasyon hatalarının veya

hasarlı DNA/RNA'nın onarılması da bu sürece dahildir. Genomik kararsızlık (instabilite) genellikle nokta mutasyonları, insersiyon/delesyon ve genetik yeniden düzenlemeler nedeniyle yüksek mutasyon sıklığına sahip bir genomun ortaya çıkması anlamına gelir (Kovalchuk & Kovalchuk, 2021). Genomik kararsızlık, DNA hasarının tespiti ve onarımında rol oynayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilir. Örneğin, *TP53* ve *BRCA2* mide kanserinde sıklıkla mutasyona uğrayan iki sürücü (driver) gendir. *P53*'teki mutasyonları hücrelerin DNA hasarını tespit etmesini engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur. Benzer şekilde *BRCA2*, DNA çift iplik kırıklarının onarımında rol oynar (Chia & Tan, 2016).

Kromozomal instabilite uzun zamandır habis tümörlerin ayırt edici bir özelliği olarak kabul edilmektedir. DNA kopya sayısında değişikliğe (anöploidi) yol açan kromozom kaybı veya kazanımı ile DNA'da meydana gelen değişikliklerden kaynaklanabilir. İnstabilite bazen bir kromozomun sadece bir kısmını içerebilir, bu bölgede yer alan onkogenler, tümör baskılayıcı genler veya DNA onarımında ve hücre döngüsü kontrol noktalarında yer alan genler gibi önemli gen ailelerinin işlev kaybına veya kazanımına yol açabilir. Translokasyon, amplifikasyon, delesyon veya allel kaybı (heterozigotluk kaybı) da instabilitenin nedenleri arasında yer alır. Kromozomal anormallikler mide kanserinde çok yaygındır. Hastalığın erken veya geç evrelerinde ortaya çıkabilir. Bu değişiklikler histolojik tiple ilişkilendirilmiştir, örneğin intestinal tip mide kanseri 8q, 17q ve 20q'daki kopya sayısı artışlarıyla ilişkiliyken, diffüz mide kanseri 12q ve 13q'daki kopya sayısı artışlarıyla ilişkilidir (McLean & El-Omar, 2014).

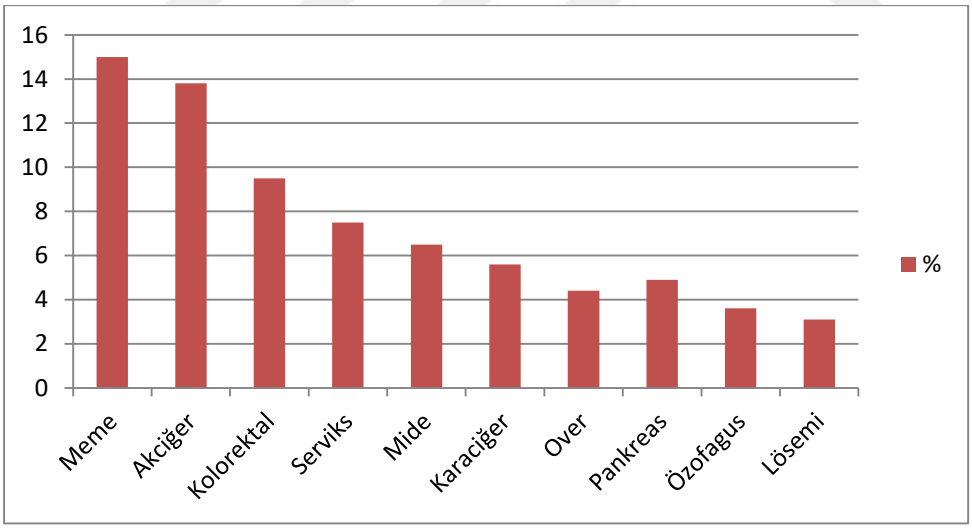
2.2.1. Mide kanseri epidemiyolojisi

Mide kanseri GLOBOCAN 2018 yılı verilerine göre erkeklerde en yaygın görülen beşinci kadınlarda en yaygın görülen yedinci kanserdir. Kanser vakalarının bir milyonu (%5,7) mide kanseridir (Thrift ve El-Serag, 2020). İnsidans Doğu Asya'da özellikle Güney Kore, Moğolistan, Japonya ve Çin'de belirgin şekilde yüksektir. Tüm vakaların %60'ından fazlası Doğu Asya'da ortaya çıkar. Bu bölgedeki 100 000 erkekten 32,1'sinde, 100 000 kadından ise 13,2'sinde mide kanseri görülür. Kuzey Amerika'da, Afrika'nın çoğu bölgesinde oranlar düşük seyreder. Afrika bölgesinde 100 000 erkekten sadece 5 tanesi, 100 000 kadından 3-4 tanesi mide kanseri olmaktadır (Bray et al., 2018). Mide kanseri tanısı alan bireylerin sadece %31'inin 5 yıl veya daha fazla hayatta kalması beklenmektedir (Slavin et al., 2019).

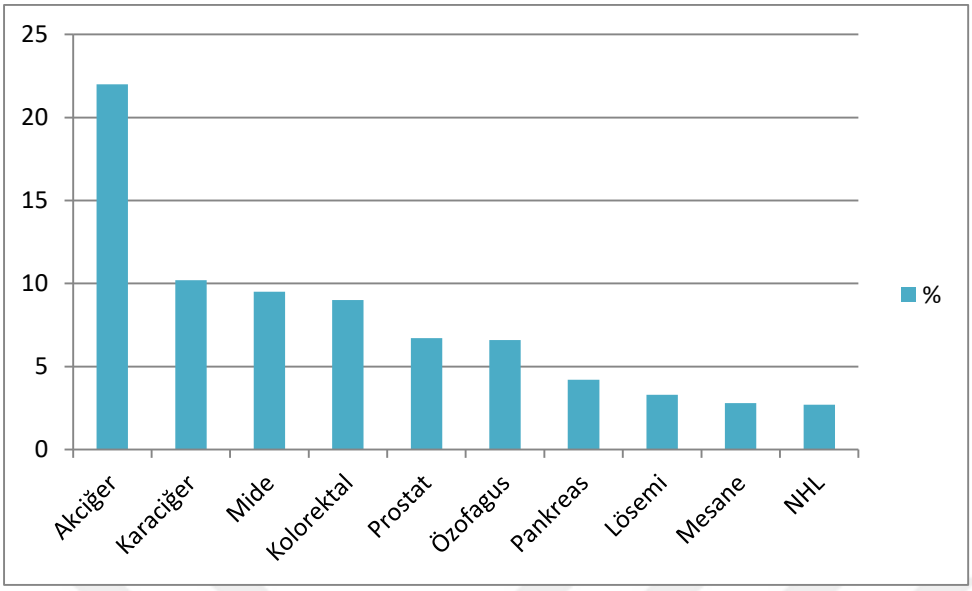


Şekil 2.1. GLOBOCAN 2018 verileri yaşa göre standardize edilmiş cinsiyete ve bölgeye özgü mide kanseri oranları

Kanser nedeniyle gerçekleşen ölümlerin %8,2'si yani her on iki ölümden biri mide kanseri nedeniyle meydana gelmektedir. Mide kanseri cinsiyete göre kanser nedenli ölüm sıralamasında kadınlarda beşinci erkeklerde üçüncü sırada yer alır (Bray et al., 2018).

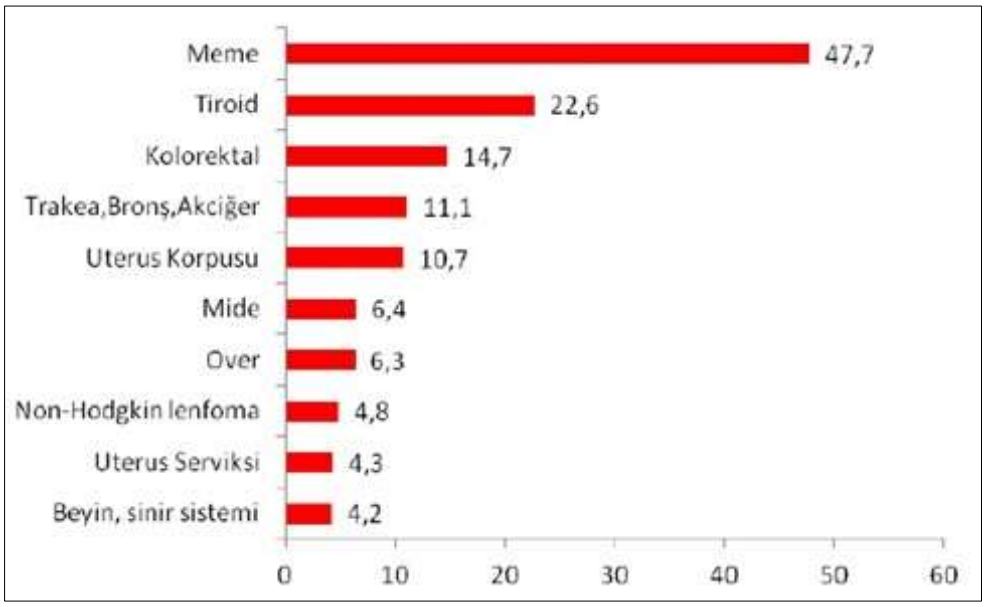


Şekil 2.2. Dünya genelinde kadınlar arasında en çok ölüme neden olan on kanserin yüzde dağılımları

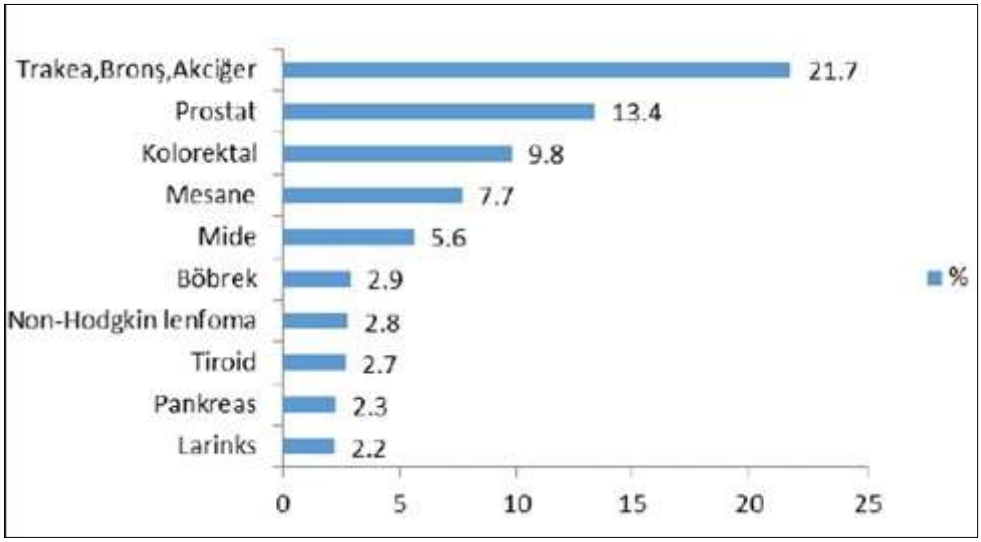


Şekil 2.3. Dünya genelinde erkekler arasında en çok ölüme neden olan on kanserin yüzde dağılımları

Türkiye'de 2021 yılında yayımlanan 2017 yılına ait kanser verileri; en yaygın 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları incelendiğinde mide kanserinin erkekler arasında beşinci, kadınlar arasında altıncı kanser olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.4. Türkiye'de tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları



Şekil 2.5. Türkiye'de tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları

2.3. Mide Kanseri Risk Faktörleri

Mide karsinogenezi, genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimler sonucunda oluşan çok aşamalı ve çok faktörlü bir süreçtir. Mide kanserine yatkınlık yaratan risk faktörleri arasında *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, yaş, cinsiyet, tütün ve alkol kullanımı, gastroözofageal reflü hastalığı, tuzlanmış ve tütsülenmiş gıdalar, kırmızı et ve işlenmiş et ürünleri, taze meyve ve sebze tüketiminin az olması ve EBV enfeksiyonu yer alır (Rawla ve Barsouk, 2019).

2.3.1. Yaş ve cinsiyet

Mide kanseri 50 yaşın altında nadiren görülür. Genellikle yaş ilerledikçe bireylerde mide kanseri riski de yaşla birlikte artar. 55-80 yaşları arasında risk en üst seviyeye ulaşır. 0-74 yaş aralığında hayatları boyunca erkeklerin mide kanseri geliştirme riski 54 bireyde 1, kadınlarda 126 bireyde 1'dir. Erkeklerde kadınlara göre iki ila üç kat daha fazla görülür (Thrift ve El-Serag, 2020).

2.3.2. Helicobacter pylori (H. pylori) Enfeksiyonu

Helicobacter pylori (*H. pylori*), asidik mide ortamında üreyebilen gram negatif, kamçılı, mikroaerofilik bir bakteridir. İlk olarak 1982 yılında Marshall ve Warren tarafından

tanımlanan ve kültürü yapılan *H. Pylori*'nin tek doğal rezervuarı insan midesidir (Warren) Mide lümenin asidik ortamında hayatta kalmasını sağlayan güçlü bir üreaz enzimine sahiptir. Mide kanseri gelişimi ile ilişkili bilinen başlıca risk faktörü olarak kabul edilir. 1994'te Dünya Sağlık Örgütü tarafından mide kanseri gelişiminde sınıf I kanserojen olarak tanımlanmıştır ("Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori," 1994). Bakteri, kişiden kişiye oral-oral veya fekal-oral yolla bulaşabilir. Dünya nüfusunun %50'sinin kronik olarak *H. pylori* ile enfekte olduğu ve enfekte olan kişilerin yaklaşık %15'inin mide ülseri geliştirdiği tahmin edilmektedir (de Brito et al., 2019). *H. pylori* ile enfekte olmuş bireylerde mide kanseri geliştirme riski 5,9 kat artmaktadır. Mide adenokarsinomları anatomik olarak proksimal (kardia) ve distal bölgeye yerleşik gelişebilir. Distal adenokarsinomlar genellikle *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkilidir (Helicobacter ve Cancer Collaborative, 2001). Correa kaskatı, normal mide mukozasının *H. pylori* enfeksiyonundan sonra kronik-atrofik gastrit, intestinal metaplazisi, displazi ve nihayetinde intestinal tip mide adenokarsinomları doğru kademeli olarak dönüştüğünü öne sürer (Correa, 2013). Prospektif çalışmalar, bakterinin antibiyotik aracılı eradikasyon tedavisinin kanser öncesi lezyonları önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Hindistan gibi *H. pylori* enfeksiyon oranlarının sürekli olarak yüksek olduğu birçok ülkede, mide kanseri insidansı her zaman bakteri varlığıyla paralellik göstermeyebilir (Rawla ve Barsouk, 2019) Bu durum, epidemiyolojik üçgen olarak adlandırılan, etkenin çevresel ve konakçı faktörlerle karmaşık etkileşimine dayanan kavramsal bir model temelinde daha iyi anlaşılabilir. Genetik miras, beslenme alışkanlıkları, sigara kullanımı gibi bireye özgü faktörlerin yanı sıra sosyoekonomik koşullar, bölgeye özgü parazitler ve hatta iklim gibi çevresel faktörler de belirli bir bireyde mide kanseri gelişiminde kilit rol oynayabilir. Bu faktörler etkilerini bireysel ve toplumsal düzeyde gösterebilir. Etken, konakçı ve çevrenin hassas dengesindeki değişiklikler örneğin daha virülan bir *H. pylori* suşu ile enfeksiyon veya yüksek tuz alımının artması mide kanseri gelişimine yol açan olaylar dizisinin hızını etkileyebilir (Piazuelo, Epplein, ve Correa, 2010).

2.3.3. *Epstein-Barr* virüsü (EBV)

Epstein-Barr virüsü'nün kanser hücrelerindeki varlığı ilk kez 1964 yılında Burkitt lenfomalı hastalarda Tony Epstein ve Yvonne Barr tarafından gösterilmiştir. EBV keşfedilmiş sekiz insan herpes virüsünden biridir. EBV genomu çift sarmallı DNA yapısında 172 kb uzunluğundadır. Virüs genomundan yaklaşık 80 tane protein ve 46 tane fonksiyonel küçük kodlanmayan RNA sentezlenir. Proteinlerin bazıları viral genomun kopyalanmasında ve litik

döngüde yeni virüsleri oluşturacak parçaların üretilmesinde rol oynar. Herpesvirüsler genellikle virüsün konakçıda latent döngüde uzun süre kalmalarına izin veren farklı viral genler eksprese edebilen ikinci bir gen ekspresyon modeline de sahiptir (Farrell, 2019). Erişkinlerin %90'nı adölesan döneminden önce virüsle enfekte olmaktadır. EBV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu asemptomatik olsa da, EBV ile enfekte olmuş bireylerin küçük bir kısmında Burkitt lenfoma, Hodgkin lenfoma, nazofaringeal karsinom, EBV ile ilişkili gastrik karsinoma gibi hematopoietik, epitelyal ve mezenkimal tümörler gelişir (Young, Yap, ve Murray, 2016). EBV ile ilişkili kanserler her yıl 200 000'den fazla yeni kanser vakasının ortaya çıkmasından sorumludur ve dünya çapında 150 000 ölüme neden olmaktadır (Kerr, 2019).

Karsinomlarda, EBV'nün ürettiği *LMP1* (latent membrane proteini 1), *LMP2* (latent membran proteini 2) ve *EBNA* (EB nükleer antijeni) onkoproteinlerinin hücre büyümesini teşvik ettiği ve neoplastik hücrelerde antiapoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir. *LMPA2A* onkoproteini ise hücrelerin epitelyal farklılaşmasını önler ayrıca kanser progresyonu, invazyon ve metastazların yanı sıra immün sistem hücrelerinden kaçabilmesinde de rol oynar. EBV' nün hücreye kanser özellikleri kazandırmak için konakçı gen ekspresyon profillerini ve MAPK / ERK, PIK3CA / AKT, JAK / STAT ve Notch sinyal ağlarını aktive ettiği de gösterilmiştir (Ma et al., 2017).

Epstein-Barr virüsü ile ilişkili mide karsinomu (EBVaGC), Kanser Genom Atlas projesi sonuçlarına göre önerilen yeni sınıflandırmada mide karsinomasının dört alt tipinden biridir (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Mide kanserlerinin yaklaşık %10'u (%1,3 ila %20,1) EBV pozitiftir. EBV pozitifliğinin mide epitel hücrelerini *in vitro* olarak kötü huylu bir fenotipe doğru yönlendirebilir, ancak virüsün bunu gerçekleştirdiği mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır. EBV pozitifliği olan mide kanserleri EBV negatif mide kanserlerinden önemli ölçüde daha iyi prognoz gösterir (Cho, Kang, ve Kim, 2016). EBV pozitif tümörlerin çoğu midede fundus ve korpus bölgesinde bulunur ve vakaların %81'i erkektir (Cancer Genome Atlas Research, 2014).

Moleküler altyapısı değerlendirildiğinde EBV pozitif mide kanserinin en dikkat çekici özelliği hem promotor hem de promotor dışı bölgelerde aşırı CpG adası hipermetilasyonu göstermesidir. EBVaGC'lar hücre döngüsü ile ilişkili genlerden *CDKN2A* (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2a) geninin promoter hipermetilasyonu oldukça dikkat çekicidir. *CDKN2A*

geni p16, CDKN2A veya INK4a olarak bilinen proteini kodlar. p16 proteini CDK4/CDK6'ya bağlanarak onların kinaz aktivitesini inhibe eder, Bu durum retinoblastoma proteininin hipofosforile olmasını engeller. E2F gibi transkripsiyon faktörlerine bağlanarak onları da etkisiz hale getirir. Sonuç olarak G1'den S fazına hücre döngüsünün ilerlemesi engellenir. EBV-pozitif mide kanserinde sıklıkla *PIK3CA* mutasyonu *ARID1A* ve *BCOR* mutasyonları ve nadiren TP53 gen mutasyonları da tespit edilmiştir. PD-L1/2 ekspresyon düzeyleri yükselmiştir (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Vo et al., 2002).

2.4. Mide Kanseri ile İlişkili Genetik Faktörler

Mide kanseri hastalarının %8-30'unda aile öyküsü pozitiftir ancak bu kanserlerin hepsi kalıtsal değildir (Oliveira, Pinheiro, Figueiredo, Seruca, ve Carneiro, 2015). Japonya ve Kore gibi sporadik mide kanseri insidansının yüksek olduğu ülkelerde germ hattı mutasyonlarının görülme sıklığı düşüktür. Bu ülkelerde ailesel kümelenmenin nedeni kalıtsal olmaktan çok çevresel faktörlerdir. Mide kanserlerinin yaklaşık %1-3'ü gerçekten kalıtsaldır. Bu vakaların %60'ında altta yatan genetik değişiklik bilinmemektedir (J. Luo et al., 2018). Mide kanseri yatkınlığı, Herediter diffüz gastrik kanser (HDGK), Lynch sendromu, Peutz-Jeghers sendromu, Li-Fraumeni sendromu, Ailesel adenomatöz polipoz sendromu gibi ailesel kanser sendromlarıyla ilişkilendirilmiştir. Midenin proksimal polipozis sendromu (GAPPS) ve Ailesel intestinal mide kanseri (FIGC) de yakın zamanda tanımlanmıştır (Kim, Kidambi, Lin, ve Idos, 2022). Sporadik kanserlerde olduğu gibi kalıtsal kanserlerde de hem intestinal tip hem diffüz tip mide kanserleri görülebilir ancak intestinal tipte daha yaygın görülür. Mide kanseri hastalarında yüksek oranda zararlı germline *ATM* mutasyonları tespit edilmiştir fakat hangi tipte olduğu çalışılmamıştır. *MAP3K6* germ hattı mutasyonlarından kaynaklanan mide kanserleri çoğunlukla taşlı yüzük hücre morfolojisine sahiptir (Luo, Fedda, Lynch, ve Tan, 2018). Bazı sendromik hastalarda, HDGK olarak adlandırılan diffüz tip mide kanseri gelişir. HDGK ailelerinin yaklaşık %40'ı *CDH1* geninde (Cadherin 1) germline mutasyonlar taşımaktadır. *CDH1*, epitelyal dokulardaki adherens kavşaklarında bulunan tümör baskılayıcı işlevi olan homofilik bir transmembran proteini olan E-cadherin'i kodlar. Normal hücrelerde, E-cadherin ifadesi hücre-hücre adezyonu, hücrelerde mekanik duyarlılık (mekanosensivite), epitelyalden mezenkimale geçiş ve hücre proliferasyonunun temas inhibisyonu ile önlenmesi gibi çok önemli fonksiyonlara sahiptir. E-cadherini kodlayan *CDH1* genine ek olarak, *PALB2 CTNNA1, INS, FBXO24, DOT1L, CD44, MSH2, BRCA1, RAD51C* ve *MET* genlerinde germline patojenik varyantlar tanımlanmıştır (Cosma,

Schlosser, Tews, Muller, ve Kandulski, 2022), (Gullo, van der Post, ve Carneiro, 2021; W. Luo et al., 2018).

Çizelge 2.1. Mide kanserinde kalıtsal yatkınlıkla ilişkili genler ve kanser sendromları

Gen Mutasyonu	Sendrom
APC	Familial Adenomatöz Polipozis sendromu
APC promotor 1B	Midenin proksimal polipozis sendromu
CDH1-CTNNA1	Herediter Diffüz Gastrik Kanser sendromu
MLH1-MSH2-MSH6-PMS2	Lynch sendromu
SMAD4-BMPR1A	Juvenile polyposis sendromu
STK11	PeutzeJeghers sendromu
TP53	Li-Fraumeni sendromu

2.5. Mide Kanserinin Belirtileri

Mide kanseri tanısı istenmeyen kilo kaybı, demir eksikliği anemisi ve disfaji (yutma güçlüğü) gibi belirtilerinin varlığında endoskopik olarak değerlendirilir ancak potansiyel olarak tedavi edilebilir mide kanseri hastaları genellikle bu belirtileri göstermez ve bu belirtilerin varlığı genellikle tedavi edilemez bir hastalığın habercisidir (Da et al., 2019).

2.6. Mide Kanserindeki Tedavi Yaklaşımları

Mide kanserinin tedavisi ve prognozu çoğunlukla Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC)'nin tümör, lenf nodu ve metastaz (TNM) sistemi kullanılarak elde edilen kanser evrelemesine bağlıdır. Bu sistemde, T kategorisi tümörün mide duvarı katmanlarına yayılma derecesini, N kategorisi tümörün yakındaki lenf düğümlerine yayılmasını ve M kategorisi kanser hücrelerinin diğer organlara göçünü tanımlar. Mide kanserinin genel evrelemesi, en erken evre 0 (karsinoma *in situ*) olmak üzere evre I'den, evre IV'e kadar değişir (Amin et al., 2017). TNM bilgilerinin kombinasyonu sonucu elde edilen sayı ne kadar büyükse, kanser o kadar ilerlemiş ve yayılma alanı da o kadar genişlemiştir. Cerrahi tedavi seçenekleri tüm mide kanseri hastalarında (özellikle erken evredeki mide kanseri hastaları) ilk yaklaşımdır. Kemoterapi veya kemoradyoterapi, tümörü küçültmek için ameliyattan önce veya kalan kanser hücrelerini öldürmek için ameliyattan sonra uygulanan ana terapötik müdahaledir. Rezeke edilemeyen lokal kanseri, nüksü veya metastazı olan ilerlemiş evre hastalar için, kemoterapi kanserin ilerlemesini mümkün olduğu kadar uzun süre kontrol etmek için kullanılır. Kemoterapinin hedefe yönelik tedavi, immünoterapi veya radyasyon tedavisi ile kombinasyonu da güncel yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Lei et al., 2022).

Çizelge 2.2. Mide kanserinde TNM sınıflaması ve evreleme

T Tümör
– Tis Karsinoma İn situ (lamina propriyayı aşmamış)
– T1 Mukoza, Submukoza (sm1, sm2, sm3)
– T2 Kas
– T3 Seroza
N Lenf nodu
– N0 Lenf nodu tutulumu yok
– N1 1-6 lenf nodu
– N2 7-15 lenf nodu
– N3 > 15 lenf nodu
M Metastaz
– M0 Metastaz yok
– M1 Metastaz var

TNM sınıflaması, Evreleme
• Evre O TisN0M0
• Evre IA T1N0M0
• Evre IB T1N1M0, T2N0M0
• Evre II T1N2M0, T2N1M0, T3N0M0
• Evre IIIA T2N2M0, T3N1M0, T4N0M0
• Evre IIIB T3N2M0
• Evre IV T4N1-3M0, T1-3N3M0

2.7. Diffüz Tip Mide Kanseri

Lauren sınıflamasına göre diffüz tip mide kanseri tüm mide kanserlerinin yaklaşık %30'unu oluşturur (Dicken et al., 2005) Erken evrede tümörler asemptomatiktir ve mevcut görüntüleme yöntemleri ile saptanması zordur. Diffüz tip mide karsinomu teşhisi alan hastaların sağ kalımları ortalama 18 aydır, kötü prognozun sebebi hastalığın geç tümör evresinde teşhis edilebilmesidir. Bu tip tümörlerde geleneksel tedaviler çoğunlukla etkisizdir veya tedaviye direnç ile sonuçlanır. Erken evrelerde mutant hücreler mide epitelinden ayrılır ve mukoza içinde küçük lezyonlar oluşturur. Bu intramukozal lezyonlar çekirdekleri membran kenarında ve hilal şeklinde sitoplazmaları müsin ile dolmuş taşlı yüzük hücreleri ve zayıf farklılaşmış hücrelerden oluşmuştur (Monster, Kemp, Gloerich, ve van der Post, 2022). Tümör hücreleri adhezyondan yoksundur tek tek hücreler veya küçük alt gruplar halinde submukozal katmanlara uzanan ve normal mukozanın arka planında ortaya çıkan zengin bir fibröz stroma içinde çoğalır. Tümörlerin agresif ileri evreye nasıl geçtiği de tam olarak anlaşılamamıştır. Kanser sıklıkla karın boşluğunu ve karın içi organları kaplayan peritona yayılır çoğunlukla malign asit oluşumu görülür. Peritonal metastaz nedeniyle hastaların hem yaşam kalitesi hem de sağ kalım oranı büyük ölçüde düşmektedir (Yamaguchi, Nagamura, ve Miyazaki, 2022).

2.7.1. Diffüz tip mide kanserinde hücre bağlantıları ile ilişkili genler

Epitel doku vücudumuzun dış yüzeyini, organların ve vücut boşluklarının iç yüzeylerini kaplayan, vücut ile dış çevre arasında seçici bir bariyer oluşturan birbirlerine sıkı bir şekilde bağlanmış hücrelerin bir araya gelmesi ile oluşur. Epitel hücreleri, yapısal ve işlevsel olarak farklı yüzey alanlarına sahip olacak şekilde polarizasyon gösterir. Epitelyal polaritenin sağlanması sıkı bağlantılar (zonula occludens, tight junction), ara bağlantılar (zonula adherens, adherens junction), oluklu bağlantılar (gap junction), desmozomlar ve integrinleri içeren hücre bağlantılarının kurulması ile sağlanır (Roignot, Peng, ve Mostov, 2013). Hücre adezyonu doku morfogenezi ve hemostazın korunmasının kilit taşıdır. Hücre adezyonu gen ekspresyonu ve farklı sinyal yolakları ile düzenlenen hücrenin farklılaşması, hayatta kalması ve göçü gibi biyolojik süreçler ile de yakın ilişkilidir (Janiszewska, Primi, ve Izard, 2020). Hücreler arası yapışmanın değişmesi sonucunda metastatik hücreler birincil tümörden ayrılıp dolaşıma girdiği ve daha sonra ikincil bölgelerde çoğalabildiği için süreci olumsuz etkiler. Histolojik olarak diffüz tip mide karsinomları, adezyon moleküllerinin ekspresyonundan yoksundur. Diffüz tip mide karsinomunda gözlenen kalın stromal fibroz yapı, kanser hücreleri ve kanserle ilişkili fibroblastlar tarafından üretilen TGF-β tarafından indüklenir. TGF-β1 üretiminin, diffüz tip mide karsinomunun ilerlemesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ancak TGF-β1 ekspresyonunun mide karsinomunun prognozu ile ilişkisi tartışmalıdır. Diffüz tip mide karsinomunda Smad4 ekspresyonunun kaybıyla TGF-β sinyalinin bozulması da gözlenmiştir Sıklıkla, TGF-β'nın aşırı ekspresyonu daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilen fibröz stroma oluşumu ile karakterize edilir (Komuro et al., 2009).

Diffüz tip mide karsinomları, farklı hastalardan alınan farklı tümörler arasında hatta aynı tümörün farklı alanlarında (tümör içi ve tümör dışı alanlarda morfolojik heterojenite) bile büyük morfolojik ve moleküler değişkenlik gösterebilir (Iyer et al., 2020). 23 diffüz tip tümör üzerinde yapılan tüm ekzom sekanslama verilerinin sonuçları *TTN* (%39.13) ve *CDH1* (%30.43) genlerinde sık görülen mutasyonlar tespit edilmiştir. *CHL1, RHOA* ve *TGFBR2* genlerindekiler tekrarlayan mutasyonların, kemokin benzeri bir faktör süper ailesinin bir üyesi olan *CMTM2*'deki mutasyonların, lenf nodu metastazın için öncü (driver) mutasyon olarak tanımlanmıştır (Choi et al., 2018). 2021 yılında Garcia-Pelaez ve ark. 9 farklı çalışmada yer alan bilgilere göre diffüz mide karsinomlarına özgü genleri belirlenmiştir. Gen listesi Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Diffüz Tip Mide kanserine özgü gen mutasyonları (Garcia-Pelaez, Barbosa-Matos, Gullo, Carneiro, ve Oliveira, 2021)

Gen adı	Mutasyon oranı %
TTN (Titin)	40
CSDM1 (CUB ve Sushi multipl domainleri1)	21
CDH1(Katherin1)	25
OBSCN (Obscurin)	15
RYR2(Ryanodine Receptor 2)	13
KMT2C (Lysine Methyltransferase 2C)	12
MUC6 (Gastrik pilorik tip müsin)	9
FAT3 (FAT atipik kaderin 3)	15
APOB(Apolipoprotein B)	9
CHL1(NRT1, Cell Adhesion Molecule L1 Like)	9
SETBP1(SET binding protein 1)	8
DOCK2(Dedicator of cytokinesis 2)	11
THSD7B (Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7B)	12
RHOA (Ras homolog family member A)	10
CACNA1E (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 E)	11
ABCA13 (ATP Binding Cassette Subfamily A Member 13)	10
TAF1 (TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1)	12
NCOR2 (Nuclear Receptor Corepressor 2)	9
TGFBR2 (Transforming growth factor beta receptor 2)	7
CTNNB1(Catenin Beta 1)	7
ERBB3(Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3)	6

Yeni nesil dizileme (NGS), RNA dizileme (RNA-seq) ve tüm genom dizilemenin (WES) gelişmesiyle birlikte, Diffüz tip mide kanserinin benzersiz moleküler özellikleri daha iyi anlaşılmıştır. En kapsamlı değerlendirmelerden olan Kanser Genom Atlası'nın (TCGA) bir parçası olarak mide kanserleri moleküler olarak sınıflandırılmıştır. EBV pozitif, mikrosatellit instabil (MSI), genomik stabil (GS) tümörler ve kromozomal instabil (CIN) tümör olmak üzere dört moleküler alt tip tanımlanmıştır. Diffüz tip tümörler ağırlıklı olarak genomik stabil alt grubunda tespit edilmiştir. Bu grupta yüksek oranda somatik *CDH1*

mutasyonları (vakaların %37'si), *RHOA* mutasyonları (vakaların %15'i) ve CLDN18-ARHGAP gen füzyonları (vakaların %15'i) bulunmaktadır (Iyer et al., 2020).

2.7.2. *CDH1* / E cadherin

CDH1 geni insan genomunda 16q22.1 kromozom lokusunda 100 kb'lık bir DNA bölgesini kapsamaktadır. Gen 16 ekzon 15 intron içerir ve türler arasında yüksek oranda korunmuştur. *CDH1* gen ürünü E-cadherin proteini 120 kDa ağırlığında glikoprotein yapısında kalsiyum bağımlı bir transmembran proteinidir (Shenoy, 2019). Epitel hücrelerinin bazolateral bölgesinde zonula adherens bağlantılarının oluşmasında kritik öneme sahip bu protein sitoplazmik bölge, beş tandem tekrardan oluşan hücre dışı kalsiyum bağımlı bölge ve iki alanı birbirine bağlayan transmembran bölge olmak üzere üç yapısal alandan oluşur. Hücre dışı bölge, komşu hücrenin homofilik kaderin molekülüne bağlanır. Bu yapının içerdiği kalsiyum iyonları hücrelerin hareket etmesini ve esnemesini önleyen gerekli sertliği sağlamaktadır. E-kadherin proteininin sitoplazmik kuyruğu, p120, β-katenin ve α katenin adı verilen bir dizi adaptör protein aracılığıyla aktin ve hücre iskeletinin filamentleri ile etkileşime girer. E-kadherin proteini β-katenin'i zarda tutarak çekirdeğe gitmesine izin vermez sonuç olarak Wnt sinyal yolu aktivasyonunun neden olduğu kontrolsüz hücre çoğalması baskılanır. E-kadherin-katenin bağı, hücreler arası adezyonunun sürdürülmesi için esastır ve epitelyal tümör hücresi istilasını ve metastazı baskıladığı düşünülmektedir (Figueiredo et al., 2019; Pecina-Slaus, 2003; Shenoy, 2019).

Herediter Diffüz Gastrik Kanser Sendromu (HDGC)'u birden fazla nesli etkileyen hastaların genç yaşta az diferansiye diffüz tip taşlı yüzük hücreli karsinomunun yanı sıra lobüler meme kanseri de geliştirdiği otozomal dominant kalıtılan bir kanser sendromudur. E-cadherin'i kodlayan *CDH1* genindeki germ hattı patojenik varyantları, kalıtsal diffüz mide kanserinde yer alan en yaygın genetik yatkınlıktır. İlk kez 1998 yılında Yeni Zelanda'da yaşayan üç Maori ailesinde tespit edilmiştir (Guilford et al., 1998). HDGC' de, *CDH1* germ hattı mutasyonlarının inaktive edilmesine ek olarak ikinci alelin en yaygın inaktivasyon sebebi promotör metilasyonudur. *CDH1* mutasyonunun aile öyküsü ile yakından bağlantılıdır. *CDH1* geninde patojenik bir mutasyonla doğan bireylerin 80 yaşına kadar diffüz tip mide karsinomu geliştirme riski yaklaşık %70'dir. Mutasyon taşıyan kadınların yaklaşık %40'ında lobüler meme kanseri gelişme riski de bulunmaktadır (Marwitz et al., 2020).

2.7.3. *RHOA*

Rho GTPazlar, Ras GTPaz süper ailesine ait sinyal proteini grubudur. Günümüze kadar 22 tane Rho GTPaz gen tanımlanmıştır. Rho GTPazlar, homoloji gösterdiği Rho ailesine göre alt gruplara ayrılır. *RHOA* (Ras homoloji ailesinin A üyesi), *Rac1* (Ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1) ve *Cdc42* (hücre bölünmesi kontrol proteini 42 homologu) bu grubun en çok çalışılan genleridir (Bros, Haas, Moll, ve Grabbe, 2019). Rho GTPazlar, aktin hücre iskeletinin yapısını ve dinamiklerini, hücre göçünü, sitokinezi düzenleyen *ROCK* (Rho kinaz) gibi aşağı akış efektörleri ile etkileşime girerek bu hedeflerin aktivasyonunu kontrol eden, tüm dokularda farklı seviyelerde ifade edilen sitoplazmik moleküler anahtarlardır. Rho aktivasyonu sıkı bir şeklide kontrol edilir. Rho ailesi proteinlerinin ifadesinin düzenlenmesi seksenden fazla GEF yetmiş tane GAP proteini ile sağlanır (Cherfils ve Zeghouf, 2013). RhoA geni, 3p21.31 kromozom bölgesinde bulunur ve beş ekzona sahiptir. RhoA'nın GTP'ye bağlı formu aktif, GDP'ye bağlı formu inaktiftir. RHOA içsel GTPaz aktivitesine sahiptir ancak GDP'nin GTP'ye değişimi çok yavaş gerçekleşir. Guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) tarafından GDP'nin GTP'ye değişimi katalize edilir. GTPaz aktive edici proteinler (GAP'ler), GTP'nin γ fosfatının hidrolizini sağlar. Rho GDP ayrışma inhibitörleri (GDI'ler) GDP'nin ayrışmasını engellemek için hücre iç yüzeyindeki zar bölgelerinden uzaklaştırır (Wheeler ve Ridley, 2004; W. H. Zhang et al., 2020).

RHOA geni, aktin hücre iskeletinin yapısını ve dinamiklerini, hücre göçünü, sitokinezi düzenleyen ROCK (Rho kinaz) gibi aşağı akış efektörleri ile etkileşime girer. RhoA'nın aşırı ekspresyonu çeşitli kanserlerde gözlenmiştir ve *RhoA* aktivasyonu tümorogenez ve tümör invazyonu ile ilişkilendirilmiştir (Karlsson, Pedersen, Wang, ve Brakebusch, 2009).

RHOA gen mutasyonları diffüz tip mide kanserlerinin %14,3–25,3'ünde tanımlanmıştır. Karsinogenezin erken evrelerinden itibaren görülen onkojenik mutasyonlar Y42C, G17E, R5Q/W ve L57V gibi Rho ailesi proteinleri arasında yüksek oranda korunan sıcak bölgelerdeki (hotspots) missense mutasyonlardır. Bu tür sıcak bölgelerin varlığı, genin ifadesinin artması ile sonuçlandığını işaret etmektedir. Y42C, L57V mutasyonlarının diffüz fenotipe sahip fare bağırsak organoid kültürlerinde anoikisten kaçışı desteklediği, G17E, Y42C mutasyonlarının ise büyümeyi teşvik ettiği gösterilmiştir (J. Zhou, Hayakawa, Wang, ve Bass, 2014).

2.7.4. *CLAUDİN* 18

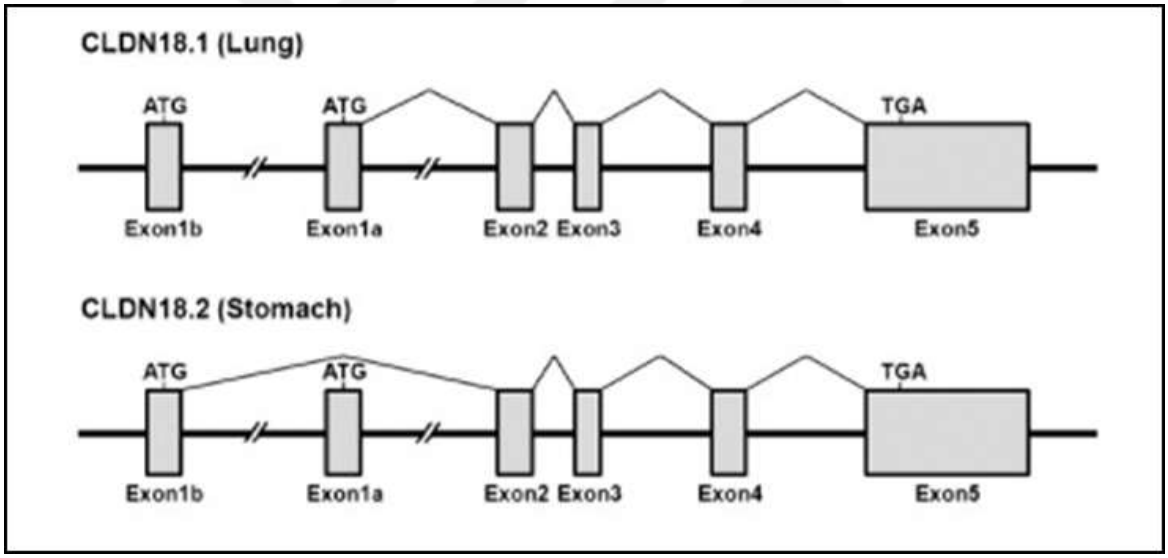
Epitel ve endotelin temel işlevi, organizmadaki farklı bölümleri ayırmak ve bunlar arasındaki madde alışverişini düzenlemektir. Sıkı bağlantılar (TJ), epitel ve endotelin bariyer işlevi için gerekli hücreler arası adezyon kompleksleridir. Epitel hücrelerinin apikal ve bazolateral membranında çok sayıda proteinin bir araya gelmesiyle oluşur. Sıkı bağlantılar su, iyonlar, makromoleküller ve bağışıklık hücrelerinin parasellüler geçirgenliğini kontrol eder ve hücre polaritesini korurlar aynı zamanda hücre sinyalleşmesinde de rol oynarlar (Zeisel, Dhawan, ve Baumert, 2019). Sıkı bağlantıların iki ana bileşeni, aktin hücre iskeletini stabil hele getirmek için zonula occludens (ZO) proteinlerinin PDZ alanlarına bağlanan okludin ve klaudin proteinleridir (Kyuno et al., 2021).

Klaudin gen ailesi proteinleri günümüze kadar tanımlanmış en az 27 üyeden oluşmaktadır (Kyuno et al., 2022). 20-27 kDa ağırlığındaki bu proteinler tipik olarak epitel hücrelerinin apikal tarafında bulunur ve hücreleri birbirlerine sıkı bir şekilde bağlar. Hücre adhezyonu ve polaritesinin korunmasının yanı sıra hücre bölünmesi, farklılaşma, hücre hareketliliği ve diğer hücresel süreçlerin düzenlenmesi için gerekli hücreler arası sinyal iletiminde de etkin rol oynarlar (Kyuno et al., 2021; Singh, Sharma, ve Dhawan, 2010). Klaudin proteinlerinin bazılarının apikal zar dışında epitel hücrelerinin bazoletaral bölgesinde ve zaman zaman hücrenin sitoplazması ve çekirdeğinde bulunması farklı hipotezlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu hipotezlerden ilki apikal yüzeyin dinamik yapısına bağlı olarak bazoletaral bölgede oluşturulan klaudin havuzundan gerektiğinde apikal yüzeye protein transferinin sağlanmasıdır. İkinci hipotez klaudin proteinlerinin bir bölümünün çekirdeğe girerek henüz açıklanmayan mekanizmalar ile transkripsiyon üzerinde etkili olmasıdır. Üçüncü hipotez ise spesifik proteinlerin taşınmasında rol oynayabilecekleridir (Hagen, 2017). Klaudin proteinlerinin çoğu neredeyse her organda eksprese edilirken, birkaç klaudin proteinin ifadesi tek doku ile sınırlıdır (Krause et al., 2008). Keşiflerinden günümüze kadar kanser gelişimi ve kaludin ifadesi arasındaki ilişkiyi inceleyen literatür giderek artmaktadır. Klaudin ekspresyonu, kanser hücrelerinin karsinogenezi ve epitelyal-mezenkimal geçişi sırasında genellikle azalır. Klaudinlerin kaybı, epitel hücre polarizasyonunun bozulmasına ve epitel hücrelerin bariyer özelliğinin kaybına neden olur (Kyuno et al., 2022). Bununla beraber çalışmalar, kanserde bu proteinlerden bazılarının dokuya özgü bir şekilde ifadesinin değiştiğini göstermiştir. Örneğin, Claudin-4 ekspresyonu pankreatik duktal adenokarsinom,

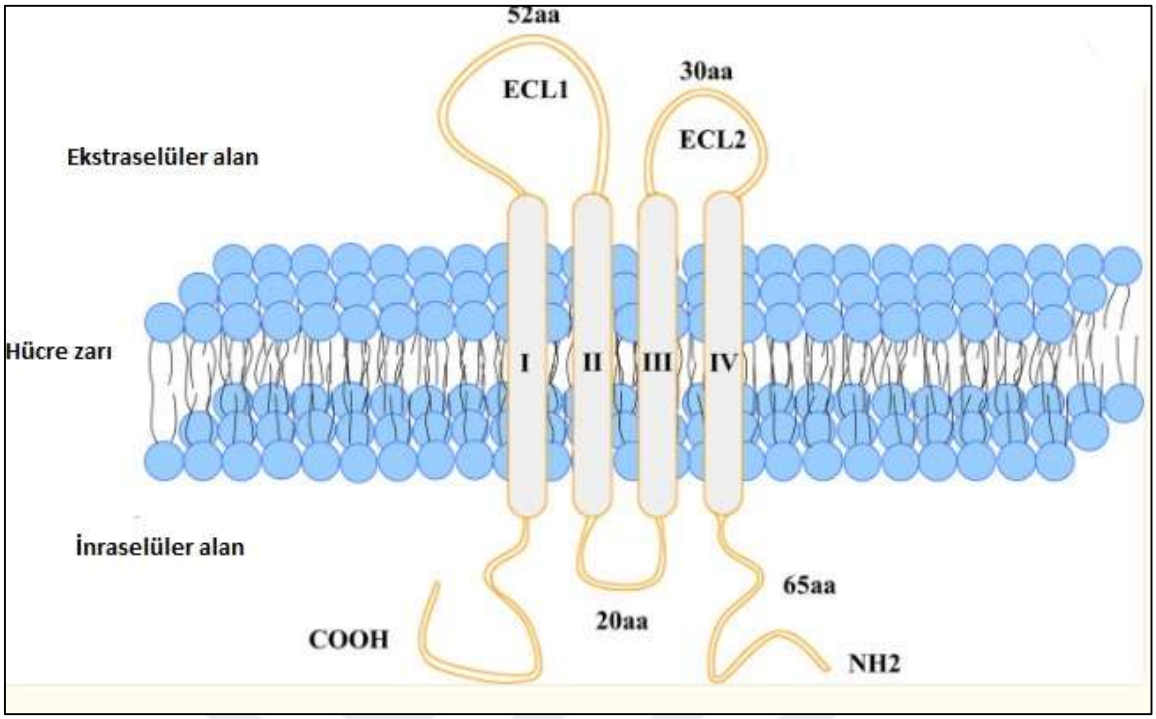
prostat, uterus, yumurtalık ve meme karsinomlarında artarken, hepatoselüler ve renal karsinomlarda ekspresyonu azalır (Singh, Uppada, ve Dhawan, 2017) (Singh et al., 2010).

CLAUDİN18 (CLDN18) geni 3q22.3 kromozom bölgesinde yaklaşık 35 kb'lik bir alanı kapsar, 6 ekzon ve 5 intronik bölge olarak organize edilmiştir. İki tane alternatif birinci ekzonu iki farlı protein izoformunun (*CLDN18.1* ve *CLDN18.2*) sentezlenmesine olanak tanır. İki protein arasındaki genel sekans özdeşliği %91'dir. (Krause et al., 2008)

CLDN18 proteini; dört kez tekrarlanan transmembran alan, iki hücre dışı döngü (ECL 1 ve ECL 2) içeren ekstraselüler alan, N terminal ve C terminal uçlarının bulunduğu sitoplazmik alandan oluşmaktadır. *CLDN18.1* ve *CLDN18.2* proteinlerinin N-terminallerindeki 21 amino asit, ECL 1 alanında 8 amino asit farklılık gösterir (Chen et al., 2023; Zhong et al., 2022).



Şekil 2.6. *CLDN18.1* ve *CLDN18.2* proteinleri ve alternatif ekzonları (Krause et al., 2008)



Şekil 2.7. Claudin 18 protein modeli (J. Chen, 2023'den değiştirilerek alınmıştır) (Chen et al., 2023)

Sağlıklı dokularda *CLDN18.1* varyantı sadece akciğerin alveoler epitel hücrelerinde, *CLDN18.2* varyantı ise sadece mide epitelininin farklılaşmış ekzokrin ve endokrin hücrelerinde sentezlenir. *CLDN18.2* boyun bölgesinde bulunan kök hücre bölgesinde ifade edilmez ve hücre zarına gömülü halde bulunur. Malign dönüşüm esnasında tümör hücrelerin polaritesinin kaybolması CLDN18.2'nin hücre yüzeyinde belirgin hale gelmesi ile sonuçlanır. *CLDN18.2*'yi hedefleyen antikorlarının tümör hücrelerine erişimini kolaylaştırır. *CLDN18.2* primer mide kanserleri ve metastazlarında genellikle eksprese edilir (Tureci et al., 2011; Zhu et al., 2019).

Normal mide dokusunda sınırlı ve spesifik ifade edilen bir zar proteini olan *CLDN18.2* kolay ulaşılabilir ideal antikor temelli bir ilaç hedefidir. İntravenöz olarak uygulanan antikor temelli ilaçlar normal hücrelerin *CLDN18.2* epitoplarına, büyük ölçüde erişemez bununla birlikte, karsinogenez sürecinde hücre polaritesinin bozulması ve *CLDN18.2* proteinin artan ekspresyon düzeyi monoklonal antikorların bağlanması için ortamı uygun hale getirir (Zhu et al., 2019). Yeni bir kimerik immünoglobulin G1 antikoru olan IMAB362 (zolbetuximab veya claudiximab), *CLDN 18.2*' ye bağlandıktan sonra efektör hücreler aracılığıyla hücresel sitotoksisiteyi aktive eder. Bu değişiklik apoptozu indükler ve hücre proliferasyonunu inhibe eder (Bednarz-Misa, Fortuna, Diakowska, Jamrozik, ve Krzystek-Korpacka, 2020).

Zolbetuximab, mide kanseri tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan ilk kimerik monoklonal antikordur (Singh et al., 2017). *CLDN18.2* proteininin başlangıçta mide tümörleri ve metastazlarında tutarlı ve kararlı bir şekilde yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir. Sonraki çalışmalar *CLDN18.2*'nin pankreas, yemek borusu, yumurtalık ve akciğer tümörleri gibi çeşitli primer tümörlerde ektopik olarak aşırı ifade edilebileceğini de gösterilmiştir (Tureci et al., 2011). *CLDN18.2*'nin ifadesinin düzenleyen mekanizmalar çeşitli çalışmalar ile araştırılmıştır. *CLDN18* geninin promotörü transkripsiyon faktörü CREB (siklik AMP tepki elemanı bağlayıcı protein) için bir bağlanma bölgesi içerir. CREB' in hipometillenmiş bir CpG adasına bağlanması genin aktivasyonunu sağlar. cAMP, tümör hücrelerinde protein kinaz A'yı (PKA) aktive ettikten sonra, PKA çekirdeğe gider ve CREB'in fosforilasyonunu indükler. CREB'in transkripsiyonel aktivitesi artar ve CREB, *CLDN18.2*'nin promotöründeki konsensüs diziye bağlanır ve *CLDN18.2*'in anormal aktivasyonu sonucu aşırı eksprese edilmesi ile sonuçlanır. Ayrıca akciğer kanseri dokuları ve akciğer kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışma miR-767-3p'nin hücrede susturulmasının *CLDN18.2* ekspresyonu artırdığını göstermiştir. miR-767-3p'nin, *CLDN18.2*'nin 3′-UTR bölgesine bağlayarak *CLDN18.2* ekspresyonunu modüle ettiği bulunmuştur (Cao et al., 2022; Sahin et al., 2008).

Mide karsinogenezinde *CLDN18* ifadesinin kaybı erken evrelerde yani Correa kaskatının intestinal metaplazi aşamasında meydana gelmektedir. *CLDN18* geni normal mide dokularında yüksek oranda eksprese edilirken mide kanserlerinin %57,5'inde ekspesyon kaybına uğrar. Özellikle intestinal tip mide kanserlerinde bu oran %73,7 olarak tespit edilmiştir. *CLDN18* ifade düzeyi, periton metastazlı hastalarda daha düşükken, kemik metastazı olan hastalarda daha yüksektir (Hashimoto ve Oshima, 2022).

2.7.5. ARHGAP26 / GRAF

RhoA GTPaz aktive edici protein 26 (*ARHGAP26, GRAF, GRAF1*), ilk olarak 1996 yılında kuş dokularında integrin aracılı sinyalleşmede fokal adezyon kinazı (FAK) incelerken keşfedilmiştir. Başlangıçta protein FAK ile ilişkili GTPaz düzenleyicisi (*GRAF, GRAF1*) olarak adlandırılmıştır (Hildebrand, Taylor, ve Parsons, 1996). ARHGAP26 proteini 5q31.3 kromozom bölgesindeki 46 kb uzunluğundaki *ARHGAP26* geninden kopyalanan 23 ekzondan oluşan mRNA'nın translasyonu sonucunda sentezlenir (Xie et al., 2018). ARHGAP26 çoğu organın epitel dokusunda yaygın olarak eksprese edilirken mezenkimal

kökenli vasküler olmayan bağ ve destek dokuda, birçok organın stromal hücrelerinde, beyaz yağ dokusunda, hiyalin kıkırdakta, miyeloid ve lenfoid sistemlerde ifadesi belirlenememiştir (Borkhardt et al., 2000).

ARHGAP26'nın çoğunlukla lökositlerde ifade edilen "A" izoformu, meme bezlerinde ve epitel dokuda yüksek oranda ifade edilen "B" izoformu olmak üzere iki ayrı izoforma sahiptir (Regev, Sabanay, Kartvelishvily, Kam, ve Bershadsky, 2017).

ARHGAP26 proteini amino ucundan başlayarak sırasıyla BAR alanı, PH alanı, RhoGAP alanı, serin/prolin açısından zengin alan ve karboksi ucunda Srchomology 3 (SH3) alanına sahiptir (Lundmark et al., 2008). BAR ve PH alanı aktin dinamiği ve membranın yeniden şekillendirilmesi için klatrin bağımsız endositozun düzenlenmesinde etkilidir. RhoGAP alanı, GTP'ye bağlı Rho proteinlerine bağlanır ve onların içsel GTPaz aktivitesini uyarır. Rho proteinlerinin negatif düzenleyicisi olan ARHGAP26 proteini Rho GTPaz'lardan Cdc42 ve RHOA'nın GTP hidrolizini uyarabilir ancak in vivo çalışmalar özellikle RhoA'yı tercih ettiğini göstermiştir (Cherfils ve Zeghouf, 2013; L. Zhang et al., 2021).

MDS Akut myeloid lösemi ve miyelodisplastik sendromlu vakaların bazılarında ARHGAP26 gen mutasyonları ve genin lokalize olduğu 5. kromozomun q kolunda delesyonlar tespit edilmiştir (Qian et al., 2011). ARHGAP26 proteini Rho ailesi GTPazların düzenleyicisi olarak ARHGAP26'nın fonksiyon kaybı, RhoA'nın regülasyonunu etkileyerek dolaylı yoldan tümör baskılayıcı bir gen olan p21'in inaktivasyonuna yol açabilir. Bu durum kusurlu hücrelerin S fazına ilerlemesi ve çoğalmasıyla son bulur. ARHGAP26 proteininin SH3 alanı, integrin kümelenme bölgelerinde bulunan fokal adezyon kinazın (FAK) karboksi terminalindeki prolinden zengin bölgeye bağlanabilir (Borkhardt et al., 2000). FAK, hücre büyümesi, çoğalması, hayatta kalması ve göçünün modülasyonunda önemli bir rol oynar. FAK'ın aşırı eksprese edildiği, yapısal olarak aktive olduğu çeşitli doku tiplerine ait neoplastik hücrelerde artan motilite, invazivlik ve proliferasyon ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Hildebrand et al., 1996).

Sirküler RNA'lar (circRNA) 5′ucunda Cap ve 3′ ucunda poly A kuyruğu olmayan kovalent bağ ile iki ucu birleştirilmiş sarmal kodlanmayan RNA sınıfıdır. Sadece ekzon veya intron bölgelerinden, bazen de hem ekzon hem de intron bölgelerinden oluşabilirler. circRNA'ların benzersiz yapıları lineer RNA'lara göre daha uzun bir yarı ömre sahip olmalarına ve RNaz

enzim degradasyonuna karşı daha dirençli olmalarına yardımcı olur. circRNA'lar miRNA süngerleri olarak görev yapabileceği gibi proteinlerle birleşerek gen ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili olur. Sirküler RNA'ların bir bölümü tümör oluşumunda ve ilerlemesinde kilit rol oynar (Xie et al., 2018; W. Y. Zhou et al., 2020). circ-ARHGAP26 (hsa circ 0074362), ilk olarak 2017 yılında mide kanserinde tanımlanmıştır. 23 ekzonlu ARHGAP26 geninin sadece beşinci ve on birinci ekzonu arasındaki bölgeyi içerir. Mide kanseri olgularındaki çalışmalar circ-ARHGAP26 ekspresyonunun mide kanserindeki rolünün hala tartışmalı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte mide kanseri hücre hatlarında circ-ARHGAP26 aşırı eksprese edilir ve baskılanması hücre çoğalmasını engeller ve kanser hücrelerinde apoptozu destekler (Wangxia et al., 2019; Xie et al., 2018).

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) habis epitelyal tümörlerin gelişimi için önemli bir süreçtir. EMT sırasında epitel hücreler hücre adezyonunu meydana getiren yapılarını kaybeder ve hücre iskeletini yeniden düzenler, hücrelerde ön ve arka polarite belirginleşir, göç etme yeteneği artar. Epitel hücrelerinde epitelyal E-cadherin yerine mezenkimal N-cadherinin ifade edilmesi EMT'nin tipik bir özelliğidir. Çalışmalar malign olamayan hücrelerde *ARHGAP26* geninin susturulmasının E-cadherin ifadesini azaltıp N-cadherin ifadesini artırdığını bu durumun iğsi hücrelerin ön kenarlarındaki çıkıntılarda daha belirgin olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte arka uçta E-cadherin hala kuvvetli bir şekilde ifade edilmektedir. Ayrıca hücrede *ARHGAP26* geninde meydana gelen fonksiyon bozukluklarının, epitelyal fenotipte dramatik bir kayıp ve tümör invazivliğinde artış ile sonuçlandığı da rapor edilmiştir (Regev et al., 2017; L. Zhang et al., 2021).

2.8. Füzyon Genleri

Füzyon genlerinin oluşmasına neden olan gen translokasyonları, kanserin önemli bir nedenidir. İki farklı geni yan yana getiren kromozomal yeniden düzenlenmeler, bir füzyon geni oluşturabilir (Yao et al., 2015). Kanserle ilişkili ilk kromozom anormalliği 1960 yılında Philadelphia kromozomu olarak adlandırılan kronik miyeloid lösemi hastalarında *BCR-ABL* genleri arasında tespit edilmiştir (Brien, Stegmaier, ve Armstrong, 2019). Bu vakaların taşıdıkları melez gen daima aktif olabilen bir kinaz molekülü sentezler. Normal hücre döngüsü bozulur ve anormal proteini ifade eden kemik iliğindeki miyeloid hücrelerin sınırsız çoğalması ve hızlı bölünmesi kanser ile sonuçlanır. Bu özel kromozomun keşfi kromozomların yeniden düzenlenmesi ile kanser arasındaki yakın ilişkiyi ortaya çıkarmıştır.

Kromozom anormallikleri, neoplazilerin karakteristik bir özelliğidir. Füzyon genleri tüm kanser hastalarının %20'sinde tespit edilmiştir. Epitelyal tümörler için en iyi bilinen füzyon geni, küçük hücreli akciğer kanseri hastalarının %5-10'unda saptanan *EML4-ALK* genidir (Stransky, Cerami, Schalm, Kim, ve Lengauer, 2014).

Kanser gelişimi çok basamaklı bir süreçtir. Erken evrelerde gerçekleşen kromozom değişiklikleri kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur. Hücrelerin hızlı artışı DNA ve kromozomlarda kırılganlık (instabilite) yaratarak yeni genetik değişimlere de zemin hazırlar, kademeli bir şekilde genom kararsızlığa sürüklenir. Füzyon genlerinin belirlenmesi doğru teşhis ve etkili bir tedavi için kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte, füzyon genlerinin prevalansı farklı kanser türleri arasında büyük farklılıklar gösterir ve birçok füzyon geni belirli bir kanser alt tipine özgüdür (Heyer et al., 2019).

2.8.1. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu

ARHGAP26 geninin diğer genlerle anormal füzyonu ilk kez 2000 yılında rapor edilmiştir. 11q23 kromozom bölgesinde bulunan lösemi geni (*MLL*) ile *ARHGAP26* geni arasındaki gen füzyonu akut myeloid lösemili bebek ve küçük çocuklarda gösterilmiştir. MLL/ARHGAP26 füzyonu olan bebekler tedaviye daha iyi yanıt vermektedir (Borkhardt et al., 2000).

Kanser Genom Atlası (TCGA) projesine göre; CLDN18-ARHGAP26 füzyonu, genomik stabil (GS) alt tipin %15'inde görülen genetik bir olaydır. *CLDN18* geninin 5. ekzonu ile *ARHGAP26* geninin 12. ekzonu arasında gerçekleşen gen füzyonu en sık karşılaşılan varyanttır. CLDN18'in 5.ekzonu ile ARHGAP26'nın 10.ekzonu, ARHGAP6'nın 2 ekzonu, ARHGAP10'nun 8. ekzonu, ARHGAP42'nin 7. ekzonunun kaynaştığı varyantlar ve çok nadir gerçekleşen CLDN18'in 4.ekzonu ile ARHGAP26'nın 11. ekzonunun kaynaştığı varyasyonlar tespit edilmiştir (L. Zhang et al., 2021).

Kimerik CLDN18-ARHGAP26 proteini CLDN18'in transmembran alanına sahiptir ancak karboksil terminalinde bulunan *RHOA*, kaderin ve integrinler gibi aktin-düzenleyici proteinlerle etkileşime giren sitoplazmik kısımda bulunan PDZ-bağlayıcı motiften yoksundur. CLDN18'in karboksi terminal alanının kaybı, aktin tarafından düzenlenen proteinlerin birleşme kompleksine bağlanmasını önleyerek hücre-hücre ve hücre-matriks

bağlanmasını gevşetebilir. Bu durum füzyon proteinini eksprese eden epitel hücrelerinin yapışma işlevinin bozulmasına ve mide mukozal bariyerinin yıkılmasına neden olur. ARHGAP26'nın merkezi bölgesinde yer alan GAP alanı ve karboksi terminalinde bulunan SH3 alanı korunur ancak amino terminalindeki BAR ve PH alanları füzyon proteininde eksiktir. Sonuç olarak füzyon proteininin GAP alanının aktivitasyonu RhoA'nın konstitütif inaktivasyonu ile sonuçlanır ayrıca ARHGAP26'nın endositoz yolunu düzenleme yeteneği de etkilenir. *CLDN18*'in promotoru ile sentezlenen proteinde CLDN18 fonksiyon kaybederken ARHGAP26 fonksiyon kazanır (Yao et al., 2015). Hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmalara göre; CLDN18'in fonksiyon kaybı, ARHGAP26'nın anormal ektopik aktivite kazanması, epitelyal fenotipte dramatik bir kayıp ve EMT gösteren uzun çıkıntıların oluşması ile sonuçlanmıştır. Bunlara ek olarak füzyon hücre bariyerlerinde kayıp, gecikmiş yara iyileşmesi, RHOA inhibisyonunda artış, metastaz ve hücre göçünün teşvik edilmesi gibi anormal fonksiyonlar kazanılmasına neden olur. Bu veriler diffüz tip mide kanserinde CLDN18-ARHGAP26 füzyonu olan hastaların olmayanlara kıyasla daha kötü prognoza sahip olmasının önemli bir nedeni olabilir (Cancer Genome Atlas Research, 2014; Doherty ve Lundmark, 2009; Holst et al., 2017).

CLDN18-ARHGAP füzyonu oksaliplatin ve floropirimidin bazlı kemoterapiye dirençle de ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, CLDN18-ARHGAP26 füzyonu mide kanserinde hastalığın ilerlemesi ve tedavi direnci ile ilgili önemli bir genetik değişiklik olarak görülmektedir.(Iyer et al., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Mide Karsinomu Olgularının Seçilmesi

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 04.05.2021 tarihinde GO 21/ 603 numaralı etik izin alınmıştır. Hacettepe Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2000-2015 yılları arasında ''Diffüz İnfiltratif Mide Karsinomu'' tanısı ile raporlanmış olgulardan oluşan 64 vaka ile başlayan çalışma kapsamı alt türden bağımsız olarak genişletilmiş ve toplamda 263 vakanın klinik bilgileri kaydedilip arşivde bulunan HE kesitleri çıkarılmıştır. Mikroskobik tekrar incelemelerden sonra çalışmaya dahil edilen toplam 263 hasta dokusu CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu ve CLDN18.2 ekspresyonu açısından incelenmiştir. Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasalların listesi çizelge 3.1'de verilmiştir.

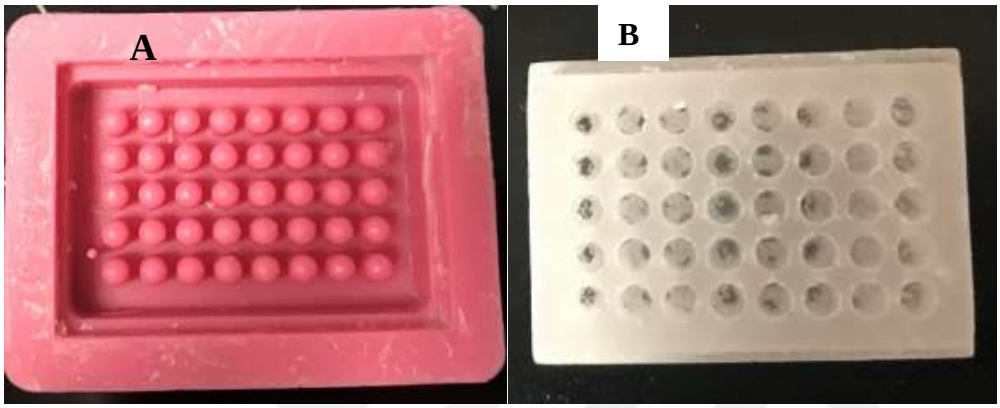
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasalların listesi

Malzeme Adı	Marka	Katalog No	Deney adı
Agaroz	Invitrogen	16500-500	Agaroz Jel Elektroforezi
100 bp DNA Ladder	SOLIS BIODYNE	07-11-00050	Agaroz Jel Elektroforezi
Etidyum Bromür (EtBr)	Thermo Scientific	15585011	Agaroz Jel Elektroforezi
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Invitrogen	4368814	cDNA sentezi
RNeasy FFPE Kit	Qiagen	73504	FFPE doku RNA izalasyonu
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen	210210	cDNA sentezi ve RT-PCR
Tth DNA Polymerase Kit	EURx	EK1115-01	İn situ RT-PCR
Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific	EP0402	PCR
dNTP Mix	SIGMA	D7295	PCR
Pepsin Solution	Epredia/Thermo	AP-9007-005	İn situ PCR

3.2. Doku Mikro Dizinlerinin Oluşturulması

Çalışmada bir mm ve üç mm'lik iki farklı boyutta doku mikrodizin bloğu kullanılmıştır. Bir mm'lik bloğun (TMA-M2) hazırlanması için Advanced Tissue Arrayer (ATA100) cihazı, üç mm'lik bloklar için Recipient Block Mold Kit (Quick Mold kalıp) kullanılmıştır. Doku mikro dizinlerinde yer alacak olguların HveE kesitleri iki ayrı patolog (AA, GG) tarafından

incelenerek tümör morfolojisinin en iyi temsil edildiği tümör odakları işaretlenmiştir. Kesitler ile aynı kodlu parafin bloklar eşleştirilerek bloktan alınacak doku alanı belirlenmiştir. Quick Mold kalıp 70-80 ºC'lik etüvde 30 dakika bekletilerek parafin ile aynı sıcaklığa ulaşması sağlanmıştır. Daha sonra etüvden alınan kalıpların üzeri tamamen kaplanacak şekilde 65 ºC sıcaklığındaki sıvı parafin ile doldurulmuş, bir gece oda sıcaklığında bekletilerek dokuların aktarılacağı bloklar hazırlanmıştır.



Resim 3.1. A. Quik Mold Kalıp B. Boş parafin blok

Daha önce donör bloklar üzerinde işaretlenen tümör alanları tek kullanımlık deri (punch) biyopsi iğneleriyle çıkarılarak, hazırlanan kalıp parafin bloğa aktarılmıştır. Oluşturulan parafin bloklar 45 ºC'deki etüvde bir gece bekletilmiş tümör örnekleri ve kalıbın kaynaşması sağlanmıştır. Lam yardımı ile tüm dokular aynı seviyeye getirilerek sabitlenmiştir.

Resim 3.2. TMA-M10, TMA-M11, TMA-M12,TMA-M13 doku mikrodizin blokları

3.3. Formalin ile Fikse edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) Doku Kesitinden DNA İzolasyonu

Olgulara ait parafin bloklarından mikrotom ile 6 µm kalınlığında alınan kesitler 48 ºC su banyosundan temiz lam üzerine alınmıştır. Dokuların HE kesitlerinde işaretlenen tümör bölgeleri bistüri ile kazınmış ve ependorf tüpe alınarak her vaka için 200 µl lizis tamponu (50 mM Tris-HCl, pH: 9,0/ 1 mM 0,5M EDTA, pH: 8,0/ 0,5% Tween-20) eklenmiştir. Kapakları sıkıca kapatılan tüpler mikrodalga fırında en yüksek güçte 30sn'de bir kere alt üst edilerek 2 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpte biriken parafin pipetajla uzaklaştırılmıştır. Proteaz aşaması 55 ºC'deki su banyosunda 3 saat süre ile tüplere 4 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek gerçekleştirilmiştir. 200 µl fenol/kloroform/isoamil alkol (25:24:1) ilave edilen örnekler oda sıcaklığında 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra tüplerde üç faz gözlemlenir. Sadece en üst katmanda oluşan şeffaf sıvı bölge DNA içerir bu alan pipetle dikkatli bir şekilde çekilerek yeni tüplere aktarılır. Etil alkol presipitasyonu için her örneğe 20 µl 3M sodyum asetat (pH:7,0) ve 550 µl %100 etanol ilave edilmiştir. Örnekler -20 ºC'de en az 30 dakika inkübe edilerek 13.000 rpm'de 10 dakika +4 C'de santrifüj edilmiştir. Alkol içeren süpernatant atılarak oluşan pelet 20 µl ddH20 ile çözülmüştür. Elde edilen toplam DNA miktarı spektrofotometre (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher) ile ölçülmüştür.

3.4. FFPE Doku Kesitlerinden RNA İzolasyonu

Mide kanseri doku dizinlerinde yer alan dokuların bloklarından mikrotom ile 4x6 µm kalınlığında kesitler elde edilerek ependorf tüpe alınmış ve etiketlenmiştir. Total RNA izolasyonu RNeasy FFPE Kit (Qiagen, 73504) ile üretici firmanın protokolü izlenerek RNA izalosyonu gerçekleştirilmiştir. RNA konsantrasyonu spektrofotometre (NanoDrop™ 2000,Thermo Fisher) ile ölçülmüştür. RNA örneklerinden final konsantrasyonu 100 ng/µl olan 15 µl'lık alikotlar hazırlanmıştır.

3.5. Komplementer DNA (c DNA) Sentezi

RNA'nın saflaştırılması ve eldesi kolaydır ancak DNA'dan çok daha kolay parçalanır. Bu nedenle, RNA analiz edilirken ilk adım RNA'yı daha dayanıklı tek iplikli komplamenter

DNA (cDNA) dönüştürmektir. Total RNA izolasyonu sonrasında edilen RNA moleküllerinden retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezi Invitrogen High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, 4368814) kullanılarak cDNA aşağıdaki protokol kullanılarak sentezlenmiştir**.**

Çizelge 3.2. cDna reaksiyonu için gerekli malzeme miktarları

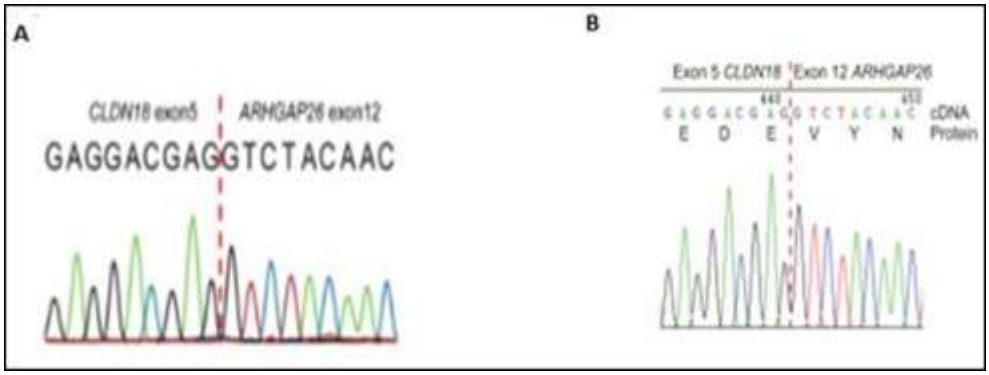
1X	
10 X RT Buffer	2 µl
25 X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10 X RT Random Primers	2 µl
MultiScribeTM-Reverse Transcriptase	1 µl
Nükleaz içermeyen H2O	4,2 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 3.3. cDNA sentezi için termal döngü programı

	1	2	3	4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.6. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Planlaması ve Dizayn Edilmesi

cDNA ve DNA kalitesinin, tüm hücrelerin temel işlevlerini yerine getirebilmesi için sürekli sentezlenmesi gereken (housekeeping) genlere ait primerler ile belirlenmesi planlanmıştır. Bu amaçla *GAPDH*, actin-beta ve *U6* genleri kullanılmıştır. Araştırılması hedeflenen gen füzyonu *CLDN18* geninin 5. ekzonu ile *ARHGAP26* geninin 12. ekzonu arasında gerçekleşmektedir. Daha önce yayımlanan çalışmaların RT-PCR ürünlerinin sekans sonuçlarına incelendiğinde tüm vakalarda füzyon bölgesinin aynı olduğu görülmüştür (Tanaka et al., 2018; Yao et al., 2015).



Şekil 3.1. CLDN18-ARHGAP26 genleri arasında füzyon sekansı (Tanaka et al., 2018; Yao et al., 2015)

NCBI veri tabanı kullanılarak CLDN18 ve ARHGAP26 genlerinin sekans bilgileri ‘’SnapGene’’ programına yüklenerek, genlere ait diziler kırık noktasından birleştirilip füzyon transkriptini sentezleyecek kimerik DNA modellenmiştir. Bu model üzerinde füzyona spesifik primerler dizayn edilmiştir. İlgili primerlerin temini sağlanmıştır. Primer dizileri Çizelge 3.4’de verilmiştir.

AACCAACTACAAAGCCGTTTCTTATCATGCCTCAGGCCACAGTGTTGCCTACAAGCCTGGAGGCTTCAAGG
CCAGCACTGGCTTTGGGTCCAACACCAAAAACAAGAAGATATACGATGGAGGTGCCCGCACAGAGGACGA
GGTCTACAACTCGAACAAAGACAGCCAGAGTGAAGGGACTGCGCAGTTGGACAGCATTGGCTTCAGCATA
ATCAGGAAATGCATCCATGCTGTGGAAACCAGAGGGATCAACGAGCAAGGGCTGTATCGAATTGTGGGTG
TCAACTCCA

Şekil 3.2. CLDN18-ARHGAP26 mRNA’sının transkribe edildiği gen bölgesi kırmızı altı çizili alan iki gen arasındaki füzyonu göstermektedir

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan primerler

Primer	DNA sekansı (5’-3’ yönünde)	Uzunluk (bp)
Actin-beta	b-actin-F: TGCGTGACATTAAGGAGAAG b-actin-R: GCTCGTAGCTCTTCTCCA	99 bp
GAPDH	GAPDH-F:CGGGTCTTTGCAGTCGTATG GAPDH-R: GCGAAAGGAAAGAAAGCGTC	236 bp
U6	U6-F: GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT U6 R: AAAAATATGGAACGCTTCACGAA	100 bp
FUS	Fus-F2: ACTGGCTTTGGGTCCAACAC Rv2: TCTGGCTGTCTTTGTTCGAG	94 bp
FUS2	Fus-F2: ACTGGCTTTGGGTCCAACAC Fus-R2: AACTGCGCAGTCCCTTCACT	113 bp
FUS3	FUS3-F: TTGGGTCCAACACCAAAAAC Rv2: TCTGGCTGTCTTTGTTCGAG	87 bp

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR)

Formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü dokulardan elde edilen DNA'lar *GAPDH* primeri ile aşağıda verilen protokole göre PCR gerçekleştirilmiştir. Her örnek için kullanılacak DNA mikrtarı 100 ng/µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde yürütülerek FluorChem FC3 (protein Simple) sistemi ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3.5.Polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli malzemeler ve miktarları

	1X
ddH2O	19,75 µl
10X DreamTaq PCR bufer	2,5 µl
GAPDH gen primer10mM	1 µl
dNTPs	0,5 µl
DreamTaq Polimeraz	0,25 µl
Ara Toplam	24 µl
DNA	1 µl
Toplam	25 µl

Çizelge 3.6. Polimeraz zincir reaksiyonu termal döngü programı

	1	2	3	4	5	6
Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	72	4
Süre	2 sn	45 sn	45 sn	1 dk	10 dk	∞
Döngü		39 döngü (2-4)				

3.8. İn situ Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İn situ PCR) ve İn situ Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (İn situ RT-PCR)

Bu tez çalışmasında CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu içeren vakaların yerinde polimeraz zincir reaksiyonu (*in-situ* PCR) tekniği kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Yöntem doku kesitleri üzerinde doğrudan DNA veya mRNA'yı şablon olarak kullanmaktadır.

İn situ RT-PCR hücre, organel veya dokularda bulunan mRNA'nın lokalizasyonu belirlemek için geleneksel olarak kullanılan *in situ* hibridizasyon tekniğini ile PCR'ı birleştiren

histolojik bir yöntemdir. mRNA'nın cDNA'ya revers transkripsiyonu ile elde edilen cDNA şablonlarından ilgilenilen gen bölgesine özgü primerler kullanılarak digoksigenin (digoxigenin-11-dUTP) veya biotin (biotin-16-dUTP) etiketli nükleotitler ile PCR gerçekleştirilir. Digoksigenin etiketli PCR ürünleri, alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş bir anti-digoksigenin antikoru ile tespit edilir. BClP/NBT (5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat/nitroblue tetrazolium) kromojeni kullanılarak amplifikasyon bölgeleri mavi renkte görüntülenir.

Biotin ile streptavidin arasındaki neredeyse geri döndürülemez bağlanma, bilinen en güçlü kovalent olmayan biyolojik etkileşimlerden biridir. Biyotin etiketli (biotin-16-dUTP) etiketli nükleotitlerinde olduğu karışım ile PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. Yumurta akından elde edilen avidin veya *Streptococcus avidini*'den elde streptavidin biotinle işaretli PCR ürünlerine yüksek afinite ile bağlanır. (Strep)avidine konjuge edilen peroksidaz enzimi son aşamada kromojen olarak kullanılan 3,3’-diaminobenzidine (DAP) ile reaksiyona girer ve bu bölgeler mikroskopla incelendiğinde kahverengi renkli görülür.

3.8.1. İn situ polimeraz zincir reaksiyonu (İn situ PCR)

CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonunun belirlenmesi amacıyla kullanılacak mRNA temelli in situ RT-PCR çalışması öncesinde in situ PCR aşaması *GAPDH* genine ait primerler kullanılarak optimize edilmiştir. Mide karsinomu doku mikrodizinlerine ait 4µm kalınlığında kesitler süper adesivli slaytlar üzerine alınmıştır. Kesitler 75 ºC'de etüvde bir saat bekletildikten sonra sırasıyla iki kez 5’er dakika ksilolden geçirilerek deparafinize edilmiştir. Kesitler %100’lik etil alkolde 1 dakika bekletilerek dokuların hidrasyonu sağlanmıştır. Endojen peroksit aktivitesini bloklamak için kesitler %6’lık H2O2/%80’lik metanol solüsyonunda 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Dokudaki proteinler ve diğer hücre bileşenleri ile uygulanan fiksatif arasında oluşan kimyasal ve fiziksel bağlanmaları ortadan kaldırmak için doku kesitleri sitrat (pH:6.0) içeren tampon çözeltide 10 dakika mikrodalgada kaynatılmıştır. Proteaz aşamasında dokuların üzerine pepsin solüsyonu (Epredia/thermo) damlatılarak nemli ortamda 37 ºC’de 5 dakika bekletilmiştir. Dokular tamponlu formaldehid içinde 10 dakika ikinci bir fiksasyona tabii tutulmuştur. Her işlem sonrasında gerçekleştirilen yıkamalarda oda sıcaklığında iki dakika iki kez DEPC (Dietilpirokarbonat) ile muamele edilmiş ddH2O ve DEPC-PBS (fosfat saline buffer) kullanılmıştır. Kesitler %100’lük etanole batırılarak kurutulmuştur. Biotin-16-dUTP

(Roche, Cat. No. 11 093 070 910) 3 mM dntp mix hazırlanmıştır. Slaytların üzerine FramesveCoverslips (AB-0578) yerleştirilerek çizelge 3.6'da belirtilen oranlarda hazırlanan karışımdan her örneğe 50 ul eklenerek plastik lamlar ile kapatılarak thermal döngü cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrasında lamlar 1X SSPE buffer ile 5 dakika iki kez yıkanmıştır. Biotin işaretli DNA fragmentlerine spesifik olarak bağlanan strepteavidin peroksidaz uygulanmıştır. Son aşamada peroksidaz ile reaksiyona giren 3,3'-diaminobenzidine (DAP) kromojen ile muamele edilerek reaksiyon çeşme suyunda yıkanarak durdurulmuştur. Dokunun renklendirilmesi için zıt boya olarak hematoksilene batırılıp durulanmıştır. İki kez %70'lik alkole, iki kez %100'lük alkolde 2 dakika bekletilerek dokuların dehidrasyonu ve ksilolde 5 dakika iki kez geçirelerek dokuların şeffaflaştırması sağlanmıştır. Dokular balsam damlatılarak uygun boyuttaki lamel ile kapatılmıştır. Kesitler dijital tarama sistemi Olympus VS 120 ile bilgisayar ortamına aktarılmış ve OlyVIA yazılımı ile görüntülenmiştir.

Resim 3.3. İn situ RT-PCR için kullanılan thermal cycler cihazı (BIOER-GenePro)

Çizelge 3.7. İn situ PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları

	1X
ddH2O	37,5 µl
10X DreamTaq PCR buffer	5 µl
GAPDH primer mix (10mM)	2 µl
dNTPs 3mM (biyotinli)	5 µl
DreamTaq Polymerase	0,5 µl
Toplam	50/ µl

Çizelge 3.8. İn situ PCR termal döngü programı

	1	2	3	4	5	6
Sıcaklık (°C)	95	95	60	72	72	4
Süre	2 sn	45 sn	45 sn	1 dk	10 dk	∞
Döngü		29 döngü (2-4)				

3.8.2. İn situ revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (İn situ RT-PCR)

İn situ RT-PCR aşamasında CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonuna ait primerler (FUS,FUS2,FUS3) kullanılmıştır. Mide karsinomu doku mikrodizinlerine ait 4µm kalınlığında kesitler 75 ºC'de etüvde bir saat bekletildikten sonra sırasıyla iki kez 5'er dakika ksilolden geçirilerek deparafinize edilmiştir. Kesitler %100'lik etil alkolde 1 dakika bekletilerek dokuların hidrasyonu sağlanmıştır. Endojen hidrojen peroksit aktivitesini bloklamak için kesitler %6'lık H2O2 /%80'lik metanol solüsyonunda 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Dokudaki proteinler ve diğer hücre bileşenleri ile uygulanan fiksatif arasında oluşan kimyasal ve fiziksel bağlanmaları ortadan kaldırmak için doku kesitleri sitrat (pH:6.0) içeren tampon çözeltide 10 dakika boyunca mikrodalgada kaynatılmıştır. Proteaz aşamasında dokuların üzerine pepsin solüsyonu (Epredia/thermo) damlatılarak nemli ortamda 37 ºC'de 5 dakika uygulanmıştır. Dokular tamponlu formaldehid içinde 10 dakika ikinci bir fiksasyona tabii tutulmuştur. Her işlem sonrasında gerçekleştirilen yıkamalarda oda sıcaklığında iki dakika iki kez DEPC (Dietilpirokarbonat) ile muamele

edilmiş ddH2O ve DEPC-PBS (fosfat saline buffer) kullanılmıştır. Kesitler %100'lük etanole batırılarak kurutulmuştur. İn situ RT-PCR aşaması öncelikle iki aşamalı (cDNA sentezi sonrası PCR) gerçekleştirilmiştir. Doku yapısının daha iyi korunabilmesi için tek aşamalı in situ RT-PCR çalışmasına geçilerek reaksiyonda Tth DNA polimeraz kullanılmıştır. Tth DNA polimeraz termofilik bakteri *Thermus thermophilus* (Tth) HB8 suşundan elde edilen bir DNA polimerazdır. Enzim, DNA polimeraz aktivitesine ek olarak düşük sıcaklıkta revers transkriptaz aktivitesine de sahiptir. in situ RT-PCR çalışmalarında mRNA'dan cDNA sentezini ve polimeraz zincir reaksiyonunu tek aşamalı olarak gerçekleşmesini sağlar. Çizelge 3.8'deki oranlara göre hazırlanan karışım her örneğe 50 ul eklenerek plastik lamlar ile üzeri kapatılarak thermal döngü cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrasında lamlar 1X SSPE buffer ile 5 dakika iki kez yıkanmıştır. Biotin işaretli DNA fragmentlerine spesifik olarak bağlanan strepteavidin peroksidaz uygulanmıştır. Son aşamada peroksidaz ile reaksiyona giren 3,3'-diaminobenzidine (DAP) kromojen ile muamele edilerek reaksiyon çeşme suyunda yıkanarak durdurulmuştur. Dokunun renklendirilmesi için zıt boya olarak hematoksilene batırılıp durulanmıştır. İki kez %70'lik alkole, iki kez %100'lük alkolde 2 dakika bekletilerek dokuların dehidrasyonu ve ksilende 5 dakika iki kez geçirelerek dokuların şeffaflaştırması sağlanmıştır. Dokular balsam damlatılarak uygun boyuttaki lamel ile kapatılmıştır. Kesitler dijital tarama sistemi Olympus VS 120 ile bilgisayar ortamına aktarılmış ve OlyVIA yazılımı ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3.9. Tek aşamalı in situ RT-PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları

	1X
ddH2O	37,5 µl
10X Tth PCR buffer	5 µl
FUS primer mix (10mM)	2 µl
dNTPs 3mM (biyotinli)	5 µl
Tth DNA Polymerase	0,5 µl
Total	50/ µl

Çizelge 3.10. Tek aşamalı in situ RT- PCR termal döngü programı

	1	2	3	4	5	6	7
Sıcaklık (°C)	60	94	94	60	72	72	4
Süre	30 dk	3 dk	30 sn	30 sn	1 dk	7 dk	∞
Döngü			30 döngü (3-5)				

3.9. İmmünhistokimyasal Boyama

Mide karsinomu doku mikrodizinlerine ait 4µm kalınlığında kesitler 75 ºC'de etüvde bir saat bekletildikten sonra sırasıyla iki kez 10'ar dakika ksilolden geçirilerek deparafinize edilmiştir. Kesitler %96, %90, %70'lik alkol serisinden iki kez 5 dakika geçirilerek doku rehidrasyonu sağlanmıştır. Proteinler ve diğer hücre bileşenleri ile uygulanan fiksatif arasında oluşan kimyasal ve fiziksel bağlanmaları ortadan kaldırmak için doku kesitleri ön çalışmalarda belirlenen sitrat veya EDTA (pH:6.0) içeren tampon çözeltide 10 dakika boyunca mikrodalgada kaynatılmıştır. Endojen peroksit aktivitesini bloklamak için kesitler %6'lık H2O2/%80'lik metanol solüsyonunda 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Dokular uygun dilüsyonda hazırlanmış Çizelge 3.11'de belirtilen primer antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında nemli tepsi içinde inkübe edilmiştir. Kesitler biyotinli keçi sekonder antikoru ve streptavidin peroksidaz (Thermo Scientific, anti-polyvalent HRP, TP-125-HL) ile inkübe edilmiştir. Kromojen olarak 3,3′- diaminobenzidine (DAB) (Thermo Scientific, 34002) zıt boyama için hematoksilen kullanılmıştır. Uygulanan basamaklar arasında kesitler ddH2O ve PBS (fosfat saline buffer) ile yıkanmıştır. %70, %90, %96'lık artan alkol serilerinden 2 dakika iki kez geçirilerek dehidrasyon sağlanmıştır. Ksilol içinde bekletilen dokularda şeffaflaştırılan dokular balsam ve uygun boyutta lamel ile kapatılarak ve görüntülenmiştir.

Çizelge 3.11. İmmünhistokimyasal boya için kullanılan antikorlar

Antikor Adı	Firma	Katalog no	Dilüsyon	Ön İşlem
E-cadherin	ECM Biosciences	CM1681	1:500	Sitrat
CLDN18	Thermo	38-8100	1:80	EDTA
ARHGAP26	Sigma Aldrich	HPA035106	1:500	Sitrat
RHOA	Santa Cruz	Sc-179	1:150	Sitrat
CLDN18.2	Abcam	ab-222512	1:250	Sitrat

3.10. One Step Revers Kriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

in situ RT-PCR sonuçlarına göre pozitif bulunan vakaların validasyonunun sağlanması amacıyla tek aşamalı RT-PCR yani hem cDNA sentezinin hem de PCR reaksiyonunun tek tüp içerisinde sentezleyebilen kit (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit) Çizelge 3.10'da belirtilen karışım kullanılarak Çizelge 3.11'deki program ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.12. One step RT-PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları

	1X
5X Onestep RT-PCR buffer	5
dNTPs mix	1
FUS 10mM mix	2
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1
ddH2O	13
RNA	3
Toplam	22

Çizelge 3.13. One step RT- PCR termal döngü programı

	1	2	3	4	5	6	7
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60	72	72	4
Süre	30 dk	15 dk	30 sn	30 sn	1 dk	10 dk	∞
Döngü			40 döngü (3-5)				

3.11. İstatistiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar ile hastaların demografik özellikleri IBM SPSS İstatistik sürüm 23.0 (IBM Corp.2015, Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılarak analiz edilmiştir. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu pozitifliği, CLDN18.2 protein ekspresyonu ile cinsiyet, yaş, T evresi, N evresi ve Lauren fenotipi gibi diğer değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson ki-kare testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki sağkalım farkları Kaplan Meier eğrisi ve log-rank testi ile araştırılmıştır. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Olguların Klinik ve Patolojik Özellikleri

Tez çalışması toplam 263 mide karsinomum olgusuna ait dokuları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait yaş, cinsiyet, evre, tümör tipi vb. özellikler tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Olgularının klinik ve patolojik özellikleri

		n= 263 (%)
Yaş ortalaması		62 (21-88)
Cinsiyet		
	Kadın	97(36,9)
	Erkek	166 (63,1)
Lauren sınıflaması		
	Diffüz	62 (23,6)
	İntestinal	123 (46,8)
	Nadir	37 (14,00)
	Diğer	41 (15,6)
Lenf nodu metastazı		
*Bilinen 261 olgu %99,2		
	Var	204 (77,6)
	Yok	57 (22,4)
Evre		
	Evre I	1 (0,4)
	Evre II	26 (9,9)
	Evre III	56 (21,4)
	Evre IV	179 (68,3)
Durum		
	Sağ	104 (39,5)
	Ölüm	159 (60,5)

Çizelge 4.2. CLDN18-ARHGAP26 füzyonu pozitif olgularının klinik ve patolojik özellikleri

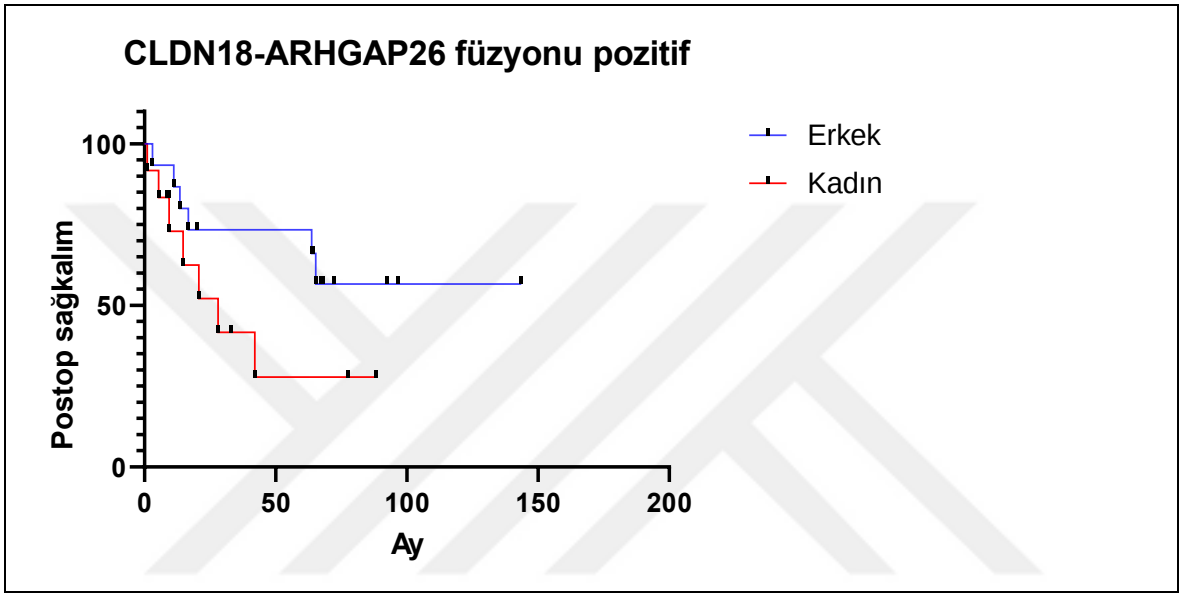
		n=27 (%)
Yaş ortalaması		64,59 (43-86)
Cinsiyet		
	Kadın	13 (48,1)
	Erkek	14 (51,9)
Lauren sınıflaması		
	Diffüz	5 (18,5)
	İntestinal	13 (48,1)
	Nadir	7 (25,9)
	Diğer	2 (7,4)
Lenf nodu metastazı		
*Bilinen 22 olgu%81,4	Var	17 (77,2)
	Yok	5 (22,7)
Evre		
	Evre I	0
	Evre II	2 (7,4)
	Evre III	9 (33,3)
	Evre IV	16 (59,2)
Durum		
	Sağ	13 (48,1)
	Ölüm	14 (51,8)

Yukarıdaki verilere göre;

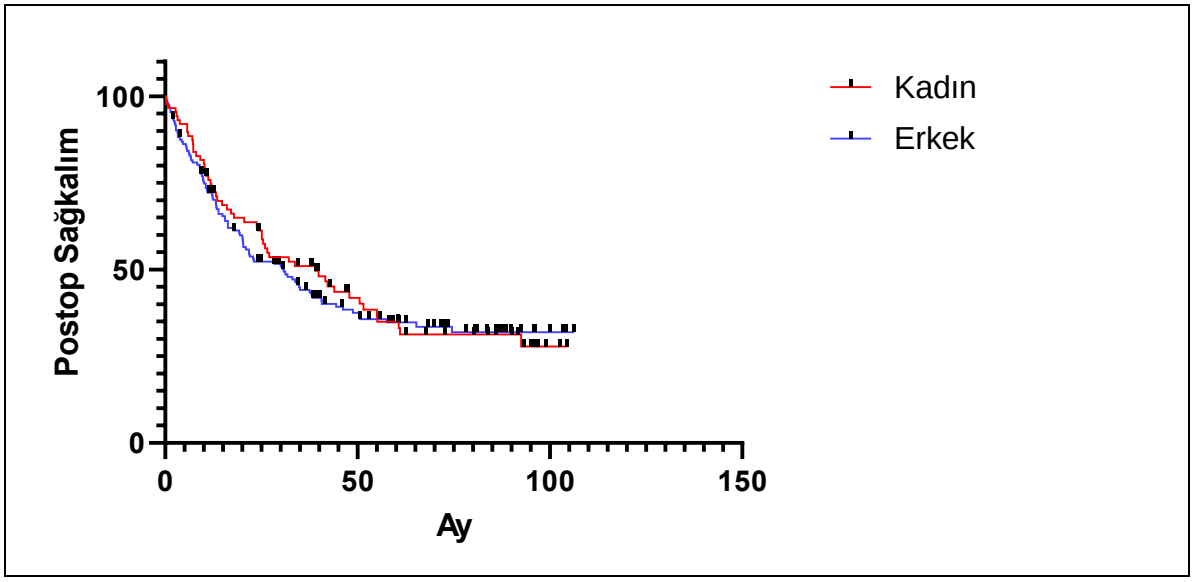
- in situ RT-PCR yöntemiyle değerlendirilebilen vakaların 27 tanesinde CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu tespit edilmiştir.
- Pozitif olguların kadın erkek oranlarının birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.
- Hayatta kalan ve ölen vakaların oranları benzer bir patern göstermektedir.
- Tümör derecesi değerlendirildiğinde vakaların %92,5'nin ileri evre tümör derecesine sahip olduğu belirlenmiştir.

- Olguların %77,2'sinde lenf nodlarına metastaz durumu gerçekleşmiştir.

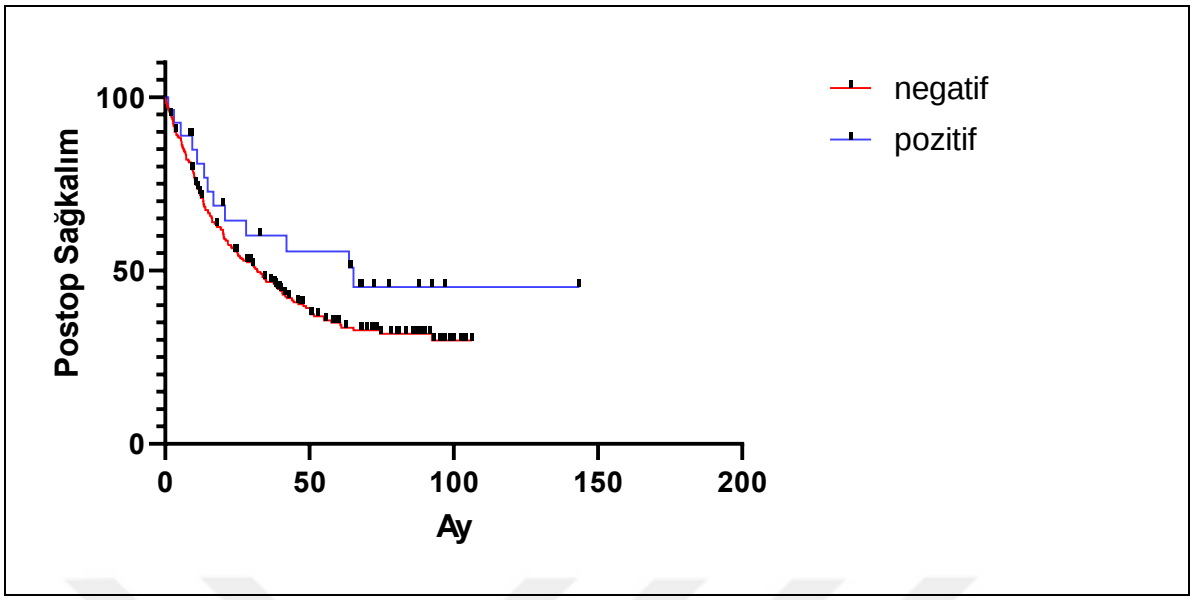
Gen füzyonu pozitifliği ve tümör morfolojisi arasındaki ilişki incelendiğinde vakaların %25,9'unun morfolojik olarak sınıflandırılamayan nadir tümör olarak adlandırılan grup içinde yer alması gen füzyonuna sahip tümörlerin bir bölümünün farklı bir morfolojik görünüme sahip olabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.1. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu pozitif olguların sağkalım eğrisi



Şekil 4.2. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu negatif olguların sağkalım eğrisi



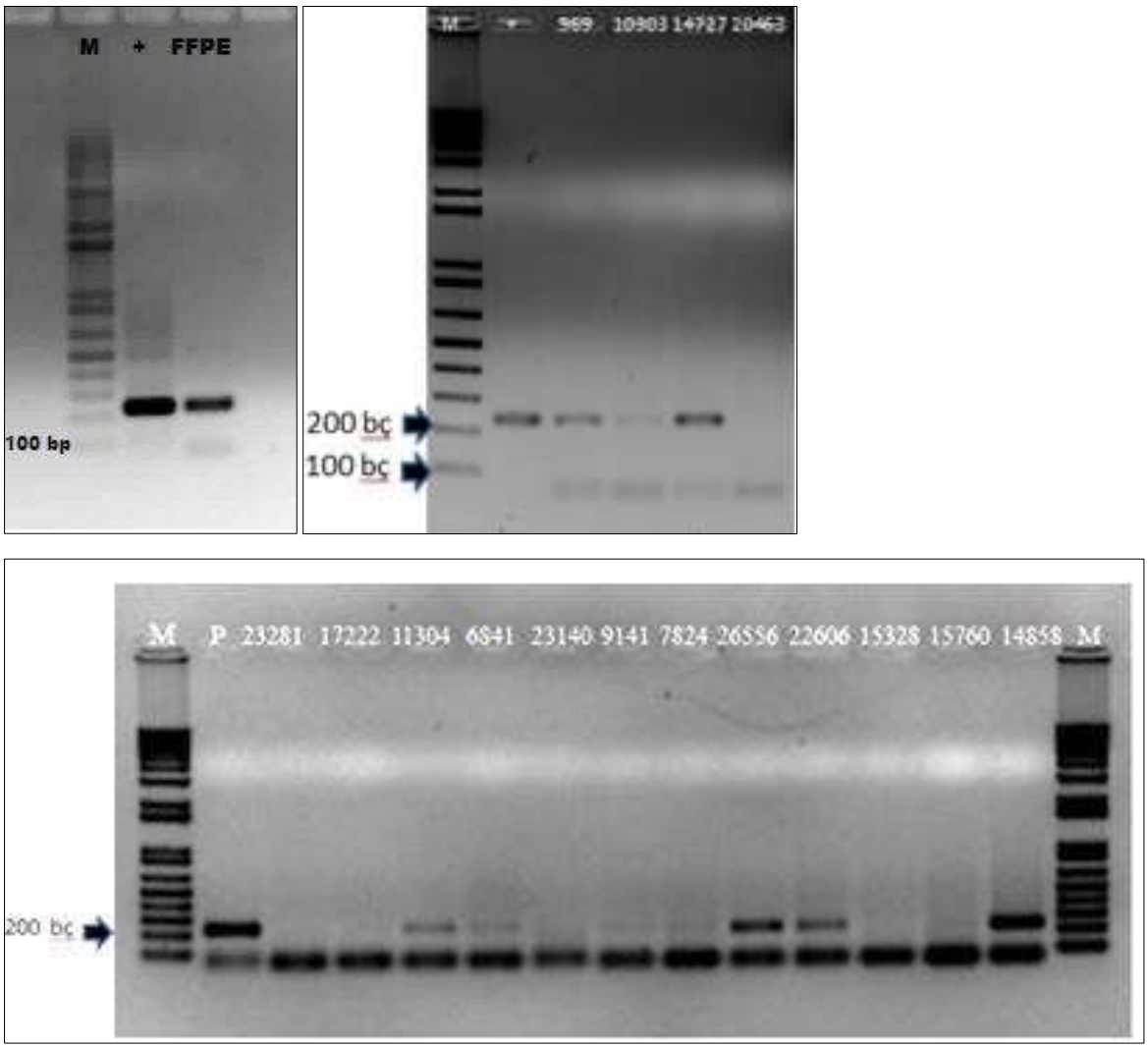
Şekil 4.3. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu negatif ve pozitif olguların sağkalım eğrisi

Hastaların ortalama sağkalım süresi 44,4 aydır. En uzun yaşam süresi 143,6 aydır. En düşük yaşam süresi 1,1 aydır. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu pozitif vakaların sağkalım eğrisinde erkeklerin daha uzun yaşam süresine sahip olduğu dikkat çekmiştir. Ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,1369). CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu negatif vakaların ortalam sağkalım süresi 23,9 aydır. En uzun yaşam süresi 106,3 aydır. En düşük yaşam süresi 2 gündür. Pozitif ve negatif vakalar arasında görülen fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,1692).

4.2. İn situ PCR Çalışması Sonuçları

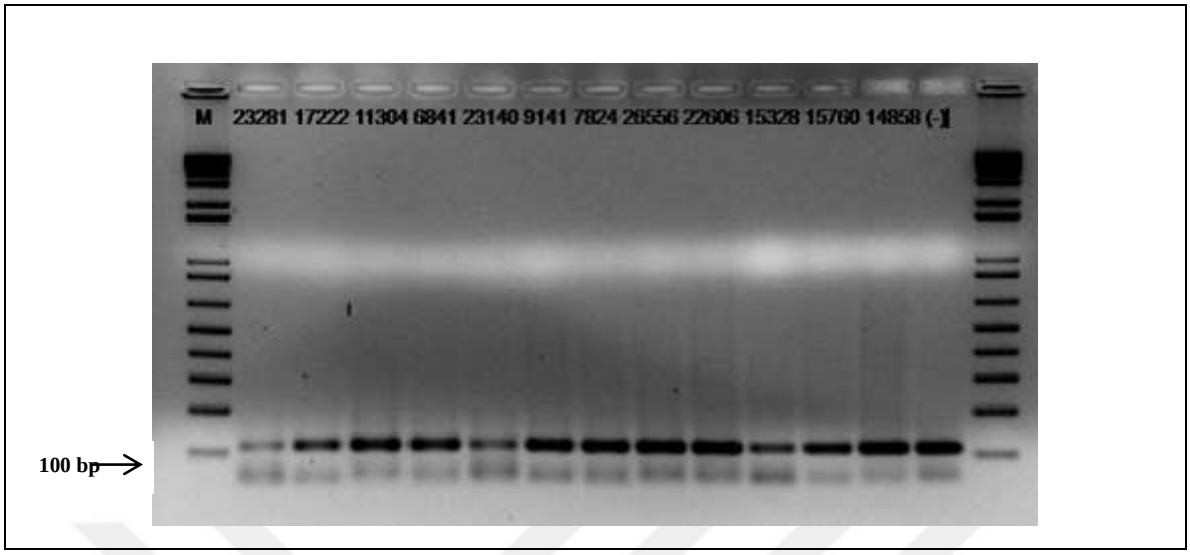
in situ RT-PCR çalışması öncesinde dokuda polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştiğinden emin olmak için *GAPDH* housekeeping gen olarak belirlenmiştir.

GAPDH genine ait primer dizisi kullanılarak taze dokudan elde edilmiş genomik DNA (+) ve parafin dokudan elde edilmiş tümör DNA'sı kalıp olarak kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi sonrasında FluorChem FC3 sistemi (Protein Simple) sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.



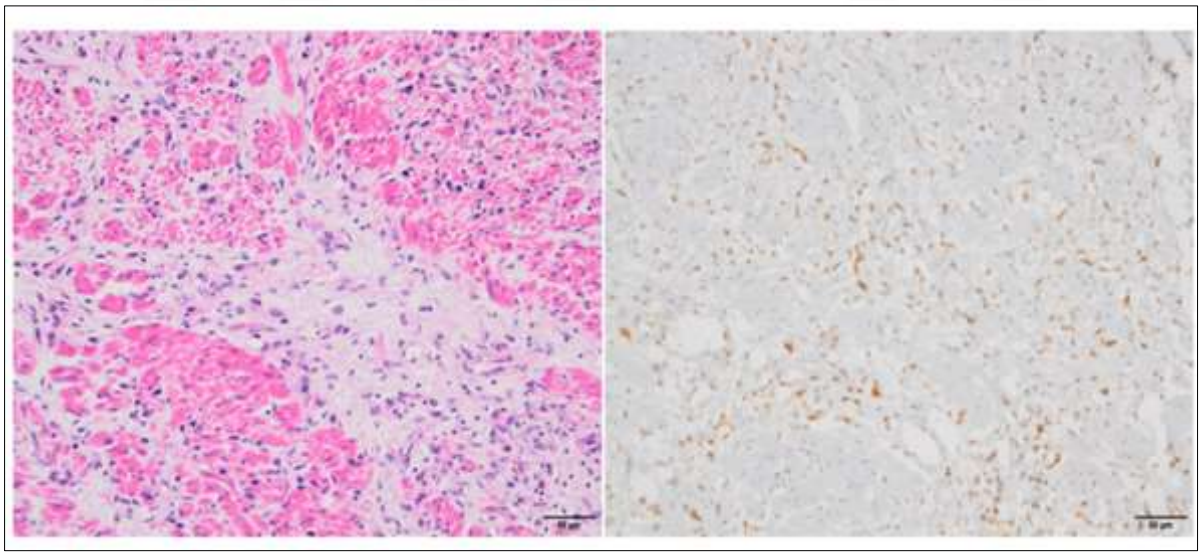
Resim 4.1. *GAPDH* genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü

Multipleks PCR için iç kontrol olarak dizayn edilen CLDN18 genine özgü primerler olgulardan elde edilen DNA örneklerinde test edilmiştir.



Resim 4.2. *CLDN18* genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü

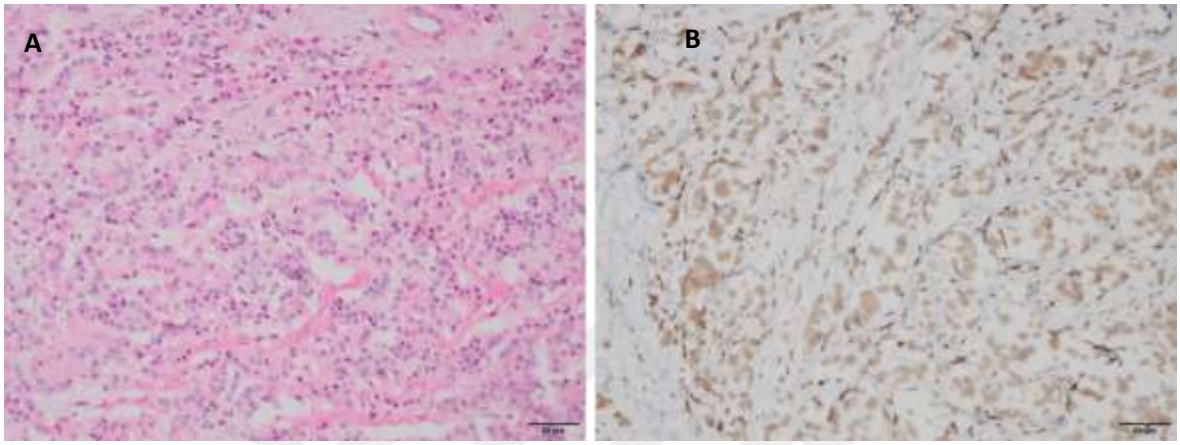
in situ PCR Biotin (biotin-16-dUTP) etiketli ve etiketsiz dntp'leri içeren reaksiyon sonrasında sentezlenen biotin işaretli DNA fragmentleri 3,3'-diaminobenzidine (DAP) kromojeni ile hücre çekirdeklerinde *GAPDH* ifadesi kahverengi renkli olarak görüntülendi**.**



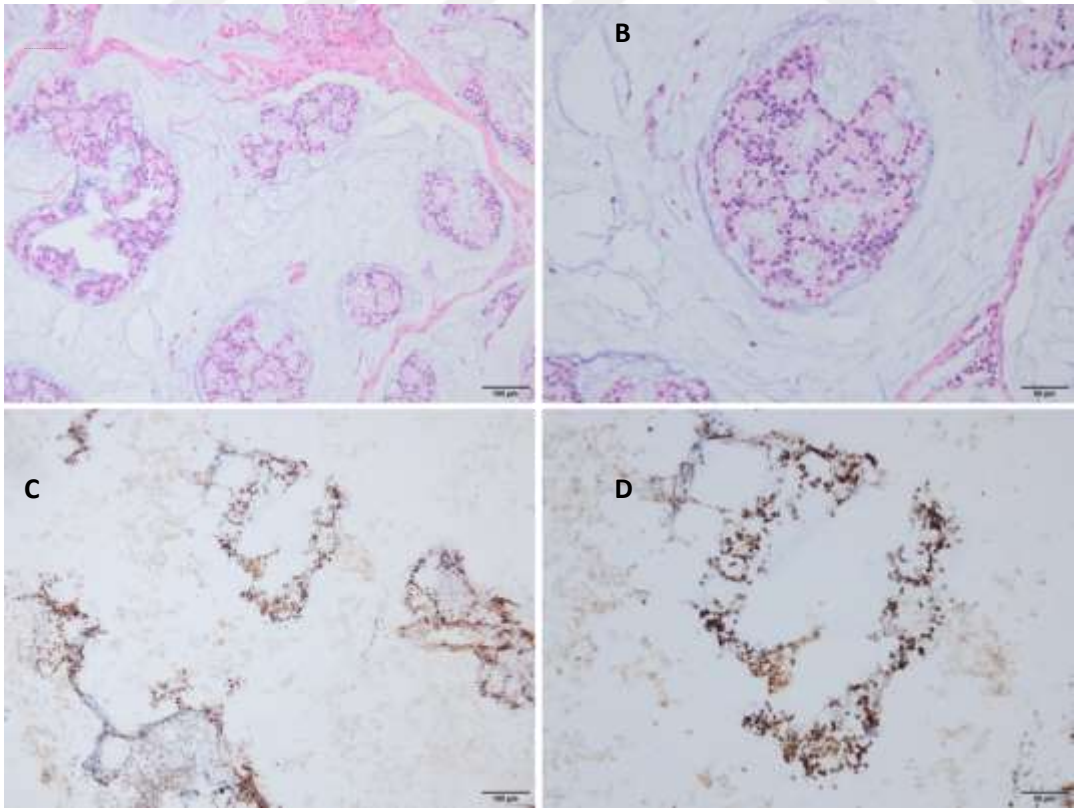
Resim 4.3. TMA-M8 vaka numarası: A2,A: HE, B: GAPDH İn situ PCR görüntüsü

4.3. İn situ RT-PCR Çalışması İle Elde Edilen Bulgular

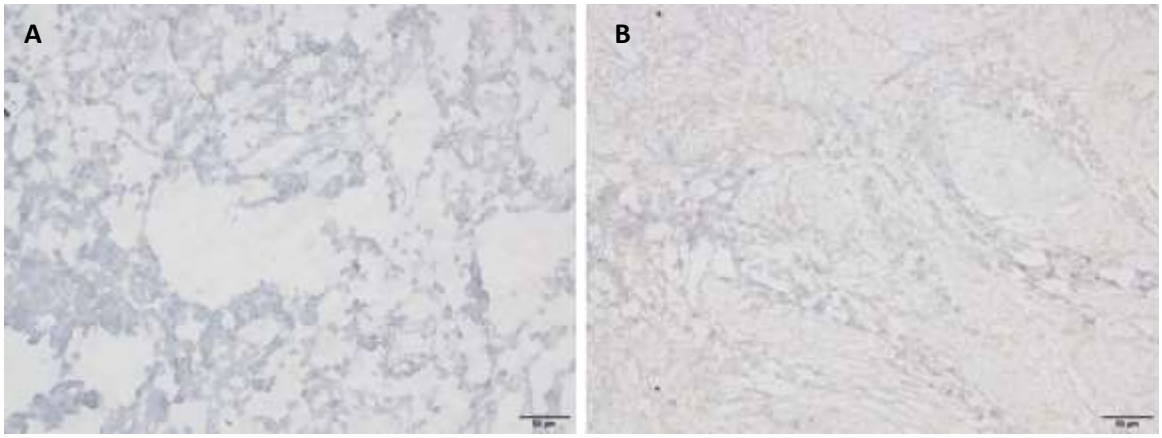
İn situ RT-PCR çalışmalasında CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonuna özgü primerler, Biotin (biotin-16-dUTP) etiketli ve etiketsiz dntp'leri içeren ve enzim olarak Tth DNA polimerazın kullanıldığı tek aşamalı reaksiyon sonucunda elde edilen bulgular.



Resim 4.4. TMA-M4 E4 (22606) A- HE ve B-Füzyona özgü primerler ile in situ RT-PCR görüntüsü



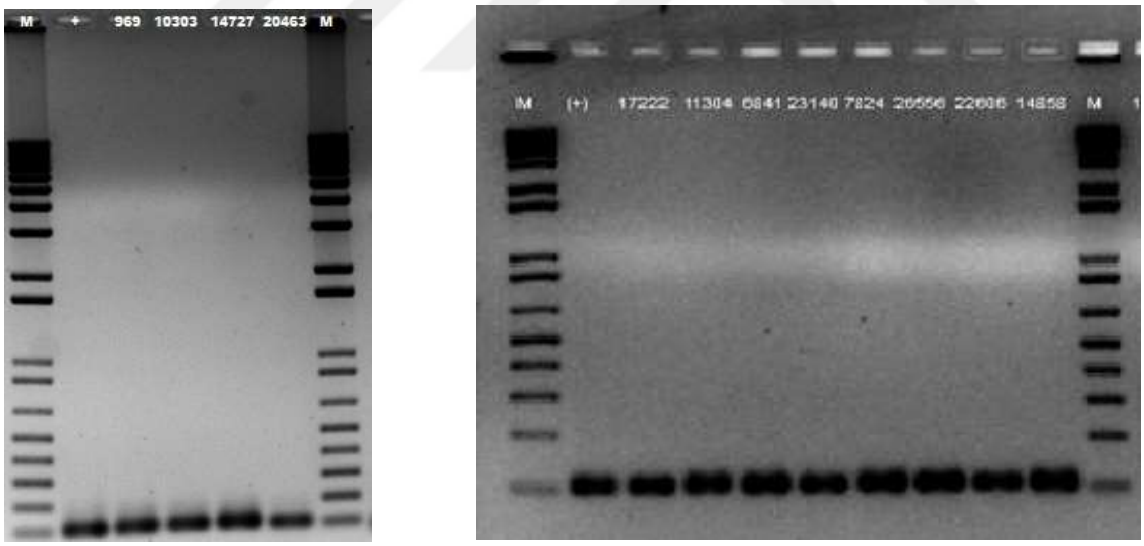
Resim 4.5. TMA M4 D5 A-B)Müsinöz karsinom HE C-D) in situ RT-PCR, Füzyon pozitif olgular



Resim 4.6. in situ PCR, Füzyon negatif olgular (A-B)

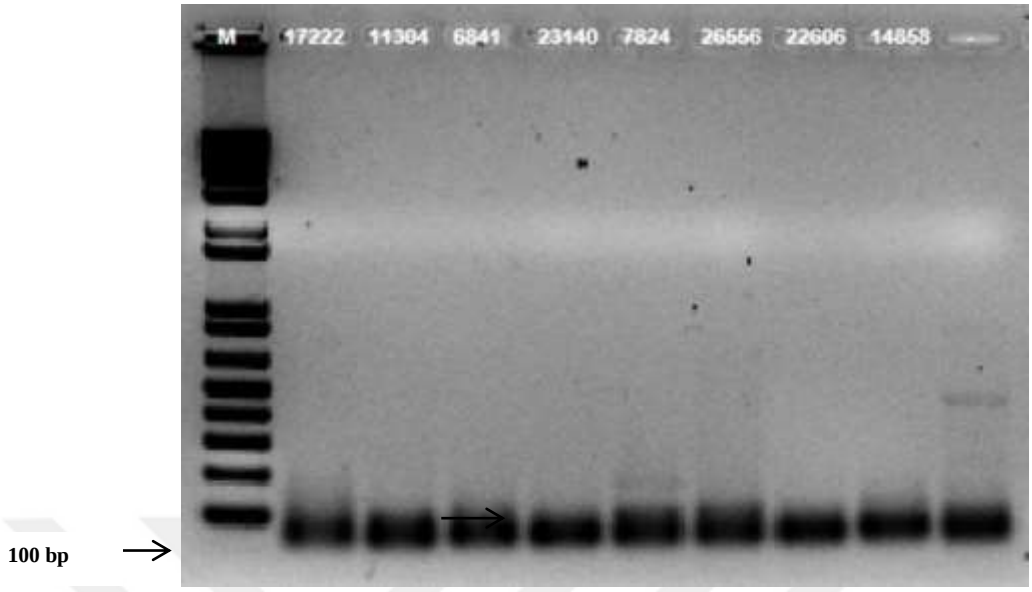
4.4. FFPE Dokularda Revers Transkripsiyon RT-PCR Bulguları

FFPE dokulardan elde edilen RNA'lar kullanılarak revers transkripsiyon elde edilen cDNA sentezinin başarılı olup olmadığını değerlendirmek için U6 küçük nükleer RNA'a ait primer çifti kullanılmıştır.



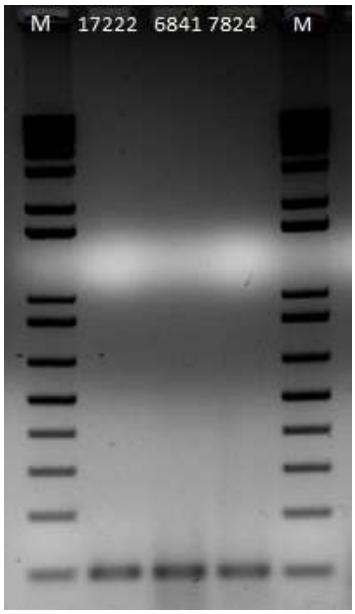
Resim 4.7. U6 genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü

in situ RT-PCR metodu ile pozitif olduğu belirlenen olgulardan elde edilen RNA'lar kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezi sonrasında füzyona özgü primerler ile RT-PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Agoraz jel görüntüsü ok işareti beklenen pozitif bantı göstermektedir le CLDN18-ARHGAP26 translokasyonuna sahip vakaların validasyonunda kullanılmak üzere iki aşamalı RT-PCR yöntemi (cDNA sentezi sonrası, PCR) uygulanmıştır.



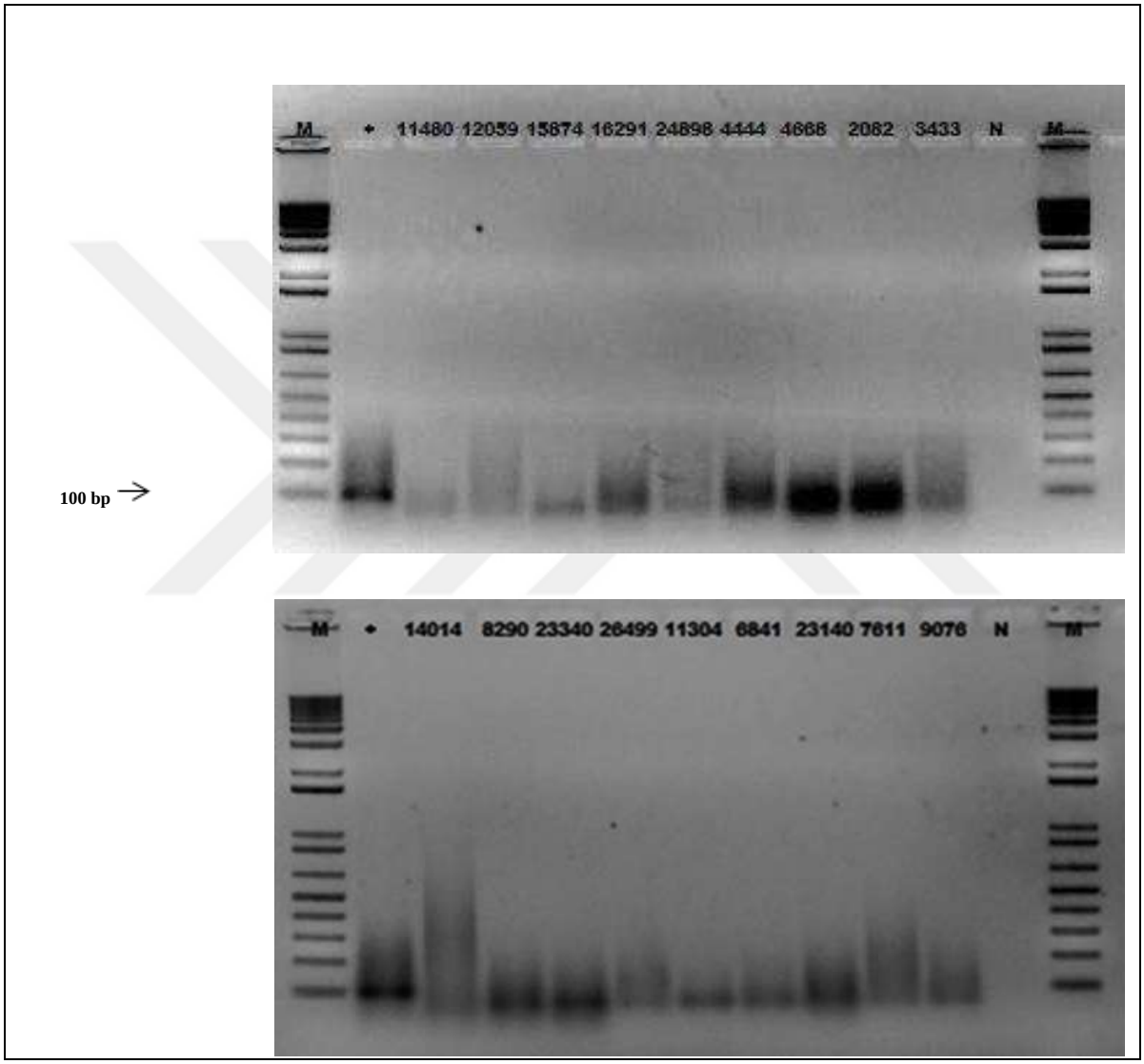
Resim 4.8. Füzyona özgü primerler ile ile RT-PCR çalışması sonucu agaroz jel görüntüsü (ok işareti pozitif bantı göstermektedir)

CLDN18-ARHGAP26 translokasyonuna sahip vakaların validasyonunda kullanılmak üzere iki aşamalı RT-PCR yöntemine (cDNA sentezi sonrası, PCR) göre istenilen gen bölgesine özgü cDNA sentezi sonrasında PCR'ın aynı tüp içinde gerçekleştirildiği tek aşamalı RT-PCR metodu kullanılmıştır. One Step RT-PCR(QIAGEN OneStep RT-PCR Ki) kiti ile öncelikle housekeeping gen *actin-beta* primerleriyle kitin çalışma koşulları belirlenmiştir.



Resim 4.9. One Step RT-PCR, *Beta-actin* genine ait PCR ürünlerinin agoroz jel görüntüsü

CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonuna özgü sentezlenen 87 bp uzunluğunda gen bölgesini çoğaltan FUS3 primer çifti ile One step RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon in situ RT-PCR yöntemiyle belirlenen 18 pozitif olguya ait RNA ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı taze dokudan elde edilen RNA ve *actin-beta* genine ait primerler ile kontrol edilmiştir.

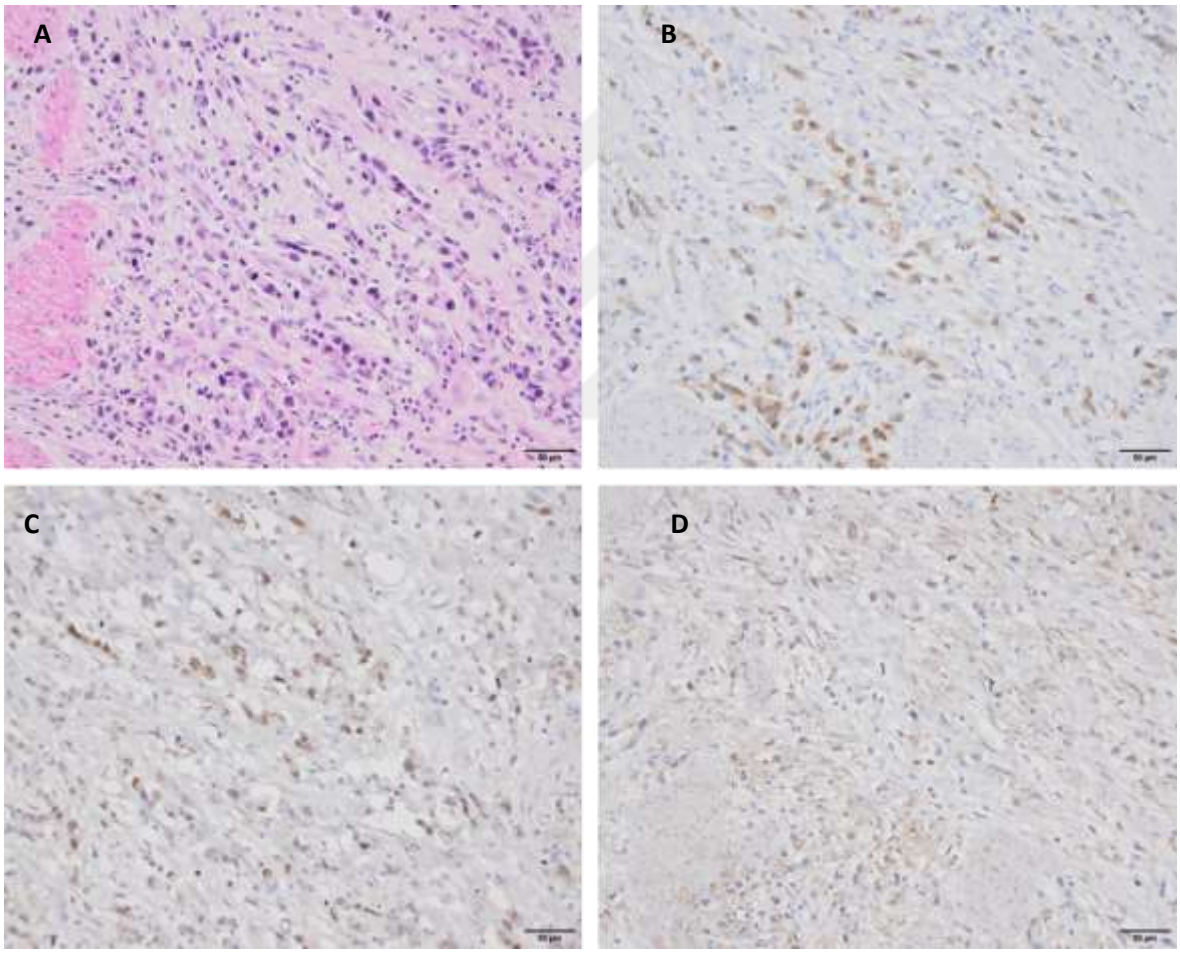


Resim 4.10. Füzyona özgü primerler ile One step RT-PCR agaroz jel görüntüsü

4.5. İmmünhistokimyasal (İHK) Boyama Sonuçları

4.5.1. E-cadherin, CLDN18, ARHGAP26 ifadesinin immünhistokimyasal boyama ile değerlendirilmesi

E-cadherin ifadesi pozitif 13 diffüz infiltratif mide karsinomu vakalarının hepsinin CLDN18'i de ifade ettiği, ARHGAP26 proteininin ise sadece 1 olgu haricinde 12 tümörde ifade edildiği görülmüştür. Bu olgu in situ RT-PCR yöntemiyle belirlenen füzyon pozitif 4 olgudan biridir.

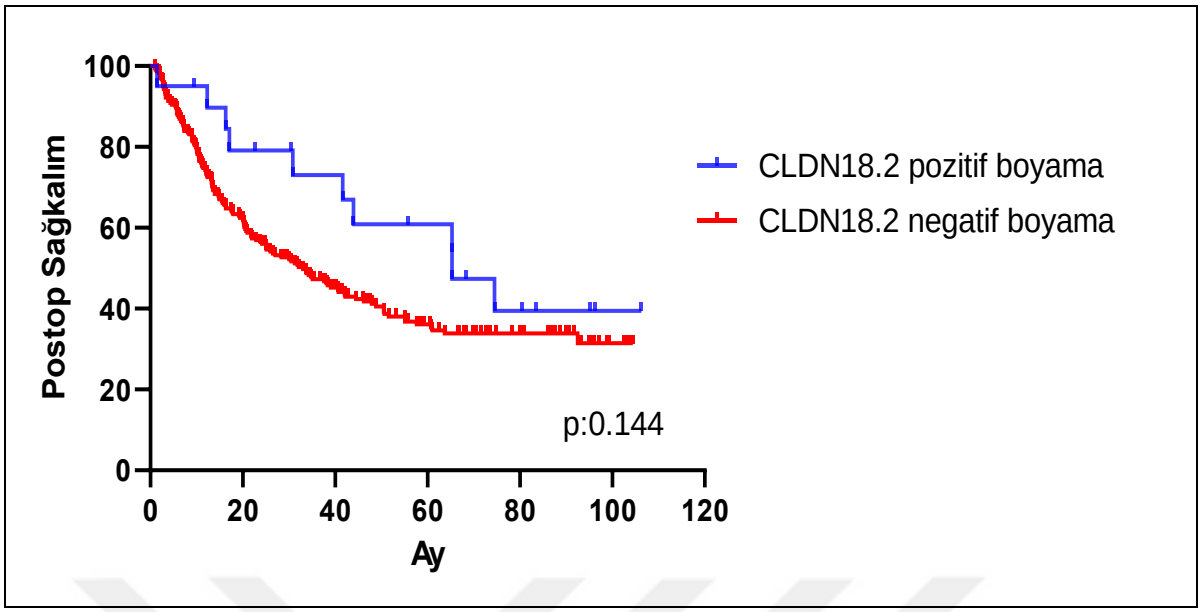


Resim 4.11. TMA-M8 lokalizasyonundaki hastaya ait immunohistokimyasal boya görüntüsü (C1, A: HE, B: E-Cadherin, C: CLDN18 , D: ARHGAP26)

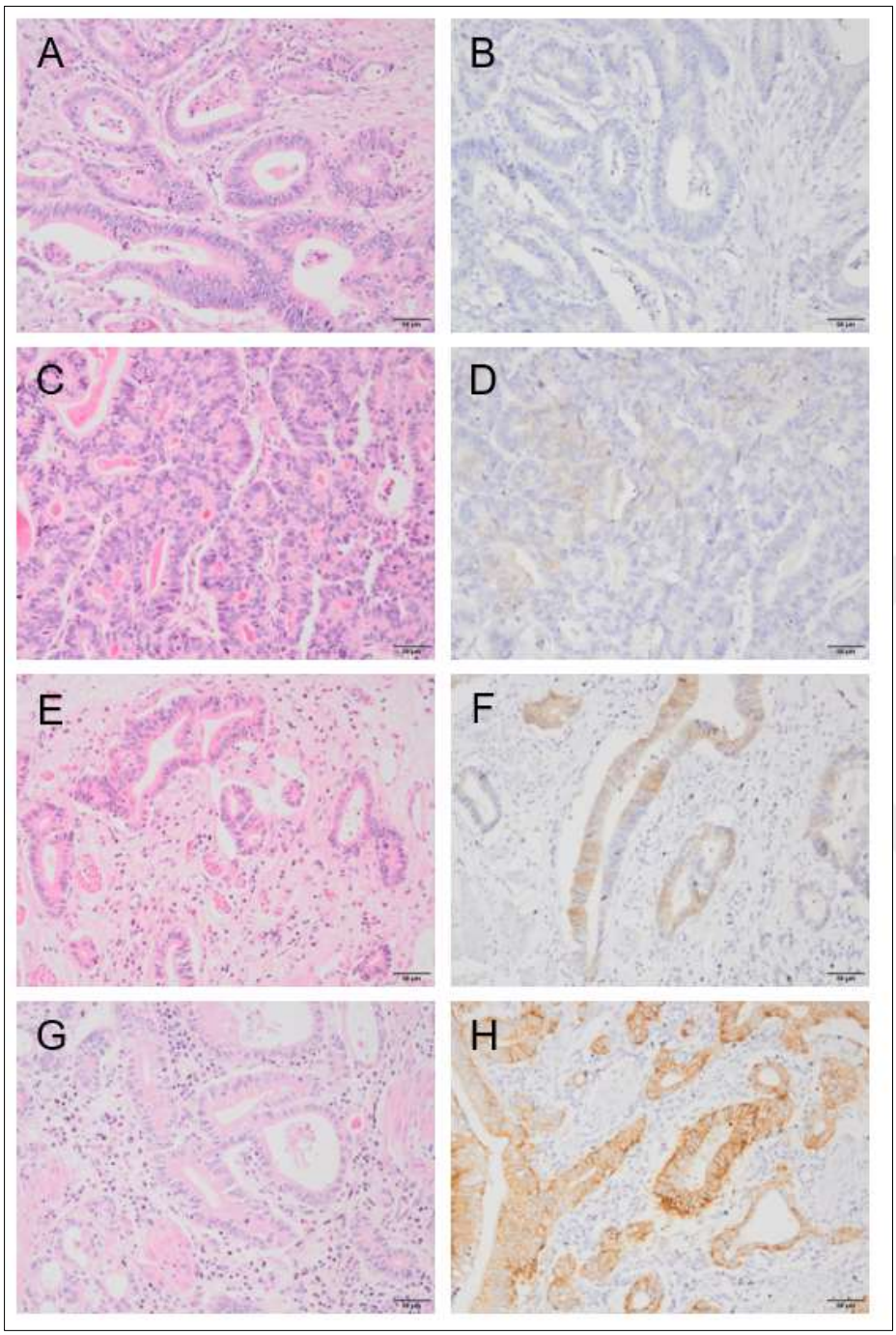
4.5.2. CLDN18.2 geninin mide karsinomlarındaki ifadesinin immünhistokimyasal boyama ile değerlendirilmesi

CLDN18.2 proteininin ekspresyon durumunun belirlenmesi için monoklonal anti-CLDN18.2 antikoru (Abcam, 222512) kullanılmıştır. 263 vakadan 5 tanesi teknik problemlerden dolayı değerlendirilememiştir. Başlangıçta, CLDN18.2 boyama yoğunluğu dört kategoriye ayrılmıştır: 0, (membran veya sitoplazmada hiç boyanma yok); 1+, (membran veya sitoplazmada zayıf boyanma); 2+, (membran veya sitoplazmada orta derecede boyanma); ve 3+, (membran veya sitoplazmada kuvvetli boyanma). Tüm olguların %14,3'üne (37/258) CLDN18.2 antikoru ile boyandığı görülmüştür. Daha sonra, FAST klinik çalışmasına göre tekrar sınıflandırılmıştır (tümör hücrelerindeki ≥%40'dan fazlasında olan boyama yoğunluğu pozitif olarak kabul edilir (Xu et al., 2020); örnekler boyama yoğunluğuna göre hiç reaktivite göstermeyen ve fokal olan vakalar (0-1+) negatif, orta ve kuvvetli reaktivite gösterenler vakalar pozitif (2+-3+) iki gruplara ayrılmıştır. Toplam 258 örnekten, %92,2'si (n=238) CLDN18.2 ekspresyonu için negatif %7,8'i (n=20) pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Genel sağkalım, cerrahi işlem sonrası bir ay içinde ölen 7 hasta cerrahiye bağlı mortalite olasılığı yüksek olduğundan sağkalım analizinden çıkarılarak hesaplanmıştır. CLDN18.2 negatif ve CLDN18.2 pozitif grupdaki hastaların ortalama sağkalım süreleri sırasıyla 33.0 ve 65.3 aydı. Pozitif CLDN18.2 ekspresyonu olan hastaların ortalama genel sağkalım süresinin daha uzun olduğu gözlemlense de, bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.144) (Şekil). Bu bulgulara ek olarak, CLDN18.2 ekspresyonunun cinsiyet, yaş, T evresi, N evresi ve Lauren fenotipi ile anlamlı bir ilişkisi olmadığı gözlemlenmiştir (p değerleri >0.05).



Şekil 4.4. CLDN18.2 negatif ve pozitif mide adenokarsinomlarının sağkalım eğrisi



Resim 4.12. Mide adenokarsinomlarında CLDN18.2 ekspresyonu immunohistokimya yöntemiyle; negatif (B), fokal (zayıf) (D), orta düzeyde (F) ve kuvvetli (H) boyaanma gösterilmiştir (A, C, E, G; HveE boyası görüntüleri ve B, D, F, H; sırasıyla aynı dokuların CLDN18.2 immunohistokimyasal boya görüntüleri, (ölçek çubukları: 50µm)

Çizelge 4.1. CLDN18.2 pozitif olgularının klinik ve patolojik özellikleri

		n=20 (%)
Yaş ortalaması		61 (24-77)
Cinsiyet		
	Kadın	4 (20)
	Erkek	16 (80)
Lauren sınıflaması		
	Diffüz	3 (15)
	İntestinal	11 (55)
	Diğer	6 (30)
Lenf nodu metastazı		
	Var	13 (65)
	Yok	7 (35)
Evre		
	Evre I	0
	Evre II	1 (5)
	Evre III	6 (30)
	Evre IV	13 (65)
Durum		
	Sağ	10 (50)
	Ölüm	10 (50)

Çizelge 4.2. CLDN18.2 immünhistokimyasal boya sonuçları ve hasta karakteristiği

			CLDN18.2				
		Toplam	Negatif boyama	Pozitif boyama	(%) negatif boyama	(%)pozitif boyama	p değeri
Yaş	≤60	117	110	6	46.0	30.0	0.242
	>60	146	129	14	54.0	70.0	
Cinsiyet	Erkek	166	149	16	62.3	80.0	0.148
	Kadın	97	90	4	37.7	20.0	
T	T1 - T2	27	25	1	10.5	5.0	0.505
	T3 - T4	235	213	19	89.5	95.0	
N	N0 - N1	96	84	9	35.4	45.0	0.469
	N2 - N3	165	153	11	64.6	55.0	
Tümör alt tip	İntestinal	123	110	11	47.8	57.9	0.612
	Diffüz	62	56	3	24.3	15.8	
	Diğer	78	64	5	27.8	26.3	

5. TARTIŞMA

Kanser tedavisinde geçtiğimiz on yılda birçok ilerleme kaydedilmiştir ve bu ilerlemelerin çoğu kanser tedavisinin bireye özgü hale getirilmesiyle bağlantılıdır. Mide kanseri tedavisinde cerrahi sonrası uygulanan kemoterapi ve radyoterapinin tek başına cerrahiye göre daha etkili olduğunu gösteren başarılı çalışmalar olsa da, bireysel tedavi geliştirme çabalarının çoğu başarısız olmuştur. Şu anda mide kanseri için yaygın olarak kullanılan kişiselleştirilmiş tedavi, insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2) antikoru Trastuzumab kullanılarak metastatik HER2-pozitif tümörlerin tedavisini içermektedir. 2013 yılında mide kanserinin tedavisi için uygunluğu onaylanmıştır (Katona ve Rustgi, 2017). Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2), ve programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-1) de mide kanseri tedavisinde klinik olarak doğrulanmış hedef moleküllerdir (Ooki ve Yamaguchi, 2022).

Klaudin ailesi sıkı bağlantı bölgesi proteinleri epitel ve endotel hücreler arasındaki molekül akışını kontrol ederek paraselüler bir bariyer oluştururlar. Yüzey proteinleri olan klaudinler, çeşitli terapötik stratejiler geliştirmek için ideal hedeflerdir. Zolbetuximab (IMAB362), CLDN18.2'ye bağlanan ve antikor bağımlı hücresel sitotoksisite ve antikor bağımlı kompleman aracılı sitotoksisite yoluyla tümör hücrelerinin ölümüne aracılık eden kimerik bir monoklonal immünoglobulin G1 antikorudur. 2021 Mayıs ayında Zolbetuximab'ın faz 2 çalışmasının ilk sonuçları açıklanmıştır. Tümör hücrelerinin % ≥40'da CLDN18.2 ekspresyonu pozitif olan ileri evre mide kanseri, gastroözofageal bileşke kanseri (GEJ) ve özofagus kanserlerinde epirubisin + oksaliplatin + kapesitabin bileşimi ve Zolbetuximab ilaç kombinasyonları uygulanmıştır. Tedavi tümör hücrelerinin % ≥70'inde pozitiflik gösteren hastalarda ortalama sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım oranlarında olumlu etkiler göstermiştir (Sahin et al., 2021).

Bu tez çalışması 263 mide kanserinden oluşan geniş bir Türk kohortunda gerçekleştirilmiştir. CLDN18.2 ekspresyonu, anti-CLDN EPR19202 antikoru (Abcam, Cambridge, UK) ile immünhistokimyasal yöntem kullanılarak belirlenmiştir.CLDN18.2 ifadesinin prognoz ve tümör özellikleri üzerindeki etkisi retrospektif olarak araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların hiçbiri cerrahi öncesi herhangi bir tedavi almamıştır. Vakaların %7,8'i (n=20) CLDN18.2 ifadesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. CLDN18.2 ekspresyonu olan ve olmayan vakalar arasında cinsiyet, TNM evresi, Lauren sınıflandırmasına göre belirlenen

histolojik alt tip ve genel sağkalım açısından istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak iki grubun Kaplan-Meier sağkalım eğrileri karşılaştırıldığında, CLDN18.2 ekspresyonu olan hastalarda daha uzun sağkalım eğiliminde olduğu dikkat çekmiştir. Daha önceki bir çalışmada ileri evre taşlı yüzük hücreli karsinomlarda CLDN18.2 ekspresyonu tüm örneklerin %64,8'inde (68/105) pozitif CLDN18.2 ekspresyonu gözlenmiştir. Bu çalışmada ortalama sağ kalım ve CLDN18.2 ifadesi arasında anlamlı bir ilişki yoktur (Xu et al., 2020). Başka bir çalışma Japonya'da mide karsinomlu hastaların primer tümörleri ve lenf nodu metastazlarında CLDN18.2 ifadesi araştırmıştır. CLDN18.2'nin tümör örneklerindeki ifadesi FAST klinik denemesinde kullanılan antikor (43-14A) ile belirlenmiştir. Analiz edilen 263 numunenin %52'si CLDN18.2 ekspresyonu göstermiştir. Lauren sınıflandırmasına göre diffüz tip mide kanseri ve yüksek dereceli tümörlerde önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (Rohde et al., 2019). Metastatik diffüz tip mide kanseri hastalarından oluşan başka bir kohortta CLDN18.2, RhoGAP ve E-kadherin ifadesi arasındaki ilişki araştırılmış ve CLDN18.2, RhoGAP, ve E-cadherin ekspresyonu ile pozitif korelasyon göstermiştir. Çalışmada ayrıca periton metastazı olmayan hastalarda CLDN18.2 ve E-cadherin ekspresyonu önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Ayrıca kemik metastazı olan hastaların CLDN18.2 ve E-cadherin ekspresyonunun daha yüksek olduğu görülmüştür (Kim et al., 2020).

2019 yılında yayımlanan raporda anti-CLDN18.2 antikoru (klon EPR19202) CLDN18.2 ifadesi intestinal metaplazide negatif, normal mukozada ve tümör hücrelerinde pozitif olduğu bulunmuştur. Hiçbir klinikopatolojik hasta özelliği cinsiyet, yaş, lokalizasyon, TNM veya tümör evresi ve sağ kalım ile CLDN18.2 ekspresyonu ile ilişki bulunamamıştır. Bu çalışmada EBV pozitif tümörler CLDN18.2 pozitifliği ile ilişkilidir. Almanya'daki geniş bir kohortun sonuçları FAST kriterlerine göre değerlendirildiğinde pozitif hasta sayısı %10'u geçmemektedir (Dottermusch, Kruger, Behrens, Halske, ve Rocken, 2019).

2021 yılında yayınlanan CLDN18.2'nin klinikopatolojik verilerle ilişkisini araştıran meta analiz çalışmasına 2055 vakayı içeren 6 farklı çalışma dahil edilmiştir. Sonuçlar iki gruba ayrılmıştır. Tümör hücrelerinde CLDN18.2 pozitifliği herhangi bir yoğunlukta olanlar, tümör hücrelerinin % 40'dan fazlasında pozitif olanlar, T1+T2 ve T3+T4 tümör derecesi arasında herhangi bir korelasyon yoktur. Diffüz tip veya intestinal tip ile arasında kolerasyon bulunamamıştır (Ungureanu et al., 2021).

Bu, çalışmalar birlikte incelendiğinde CLDN18.2 ifadesinin pozitifliği çalışmalar arasında büyük farklılık göstermektedir. Bu çelişkili sonuçlar birkaç yolla açıklanabilir. İHK çalışmalarında kullanılan farklı iki antikor bu durumun ana nedeni olabilir. Anti-CLDN18.2 (43-14A) antikoru Claudin 18'in C terminalini tanır ancak 18.2 izoformu için spesifik değildir. Anti-CLDN 18.2 (EPR19202) antikoru Claudin 18.2'nin 1-100 aminoasiti için spesifiktir ve sadece bu izoformu tespit ederek Claudin 18.2' yi diğer klaudin varyantlarından ayırt edebilir (Ungureanu et al., 2021). Klaudinler, hücre-hücre adezyonunu destekleyen sıkı bağlantıların çok önemli bir parçasını oluşturur. Hücre-hücre adezyonunun kaybı istila ve metastaza yol açan epitelyal-mezenkimal geçişin önemli bir nedeni olduğu zaten bilinmektedir. Mide tümörlerinin invaziv yüzeylerinde, invaziv olmayan yüzeye kıyasla klaudin ekspresyonu azalır. Klaudinlerin heterojen ekspresyonu aynı hastaya ait tümörünün farklı bölgelerinden alınan numunelerde bile değişken olabilir ve yüzeysel biyopsi örneklerinin pozitifliği genel doku ekspresyonu belirlemek için yanıltıcı sonuçlara neden olabilir (Matsuda et al., 2007). Tümörün derin ve invazif kısımlarında ekspresyonun düşük olması tedavi için hastaların belirlenmesi için biyopsi örneği kullanılacaksa en az 6 örneğin değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır (Dottermusch et al., 2019). Güncel çalışmalarda mide kanseri hastalarında CLDN18.2 ekspresyonunun prognostik veya klinikopatolojik etkileri konusunda bir fikir birliği yoktur. Çoğu çalışmada CLDN18.2 ekspresyonunun herhangi bir klinikopatolojik veri ve sağkalım arasında ilişkisi gösterilememiştir. Bazı çalışmalarda EBV pozitif tümörlerin CLDN18.2 yüksek oranda ifade ettiği gösterilmiştir. Kanser Genom Atlası Projesinin sonuçları CLDN18 ifadesinin diffüz tip tümörlerde azaldığını rapor ederken CLDN18.2 antikorları ile gerçekleşen çalışmalardaki sonuçlar çelişkilidir (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Etnik kökenlere göre pozitif hastaların yüzdesi hem Avrupa hem de Asya ülkelerinde değişiklik göstermiştir. Almanya'dan yapılan iki çalışma %17 ve %18 ile oldukça benzer sonuçlar gösterirken, Kore'de %15 ve %29 ve Japonya'da %87 pozitif bulunmuştur. Tez çalışması Türk kohortu üzerinde yapılmıştır ve CLDN18.2 ekspresyonu %7,8 pozitif bulunmuştur. Dottermusch ve ark. geniş bir beyaz ırk kohortunda CLDN18.2'yi değerlendirmiş FAST kriterlerine göre %10'dan az pozitiflik ile benzer sonuçlar elde etmiştir. Etnik kökenleri farklı popülasyonlar arasındaki değişen CLDN18.2 ekspresyonu genetik polimorfizmlerle açıklanabilir (Dottermusch et al., 2019; Ungureanu et al., 2021)

CLDN18.2'ye karşı bir monoklonal antikor olan Zolbetuximab'ın ileri evre mide kanseri için terapötik bir seçenek olarak sunulmasıyla, CLDN18.2 ekspresyon analizi klinik

uygulamalarda önem kazanmıştır. İleri evre vakalarda Zolbetuximab ile gerçekleşen çalışmalar ortalama sağ kalım ve hastalıksız sağ kalımı anlamlı şekilde artırmıştır. Tedaviye uygun hastaların belirlenmesi de önem kazanmıştır. Ayrıca CLDN18 ekspresyonunun azalması, mide kanserli hastalarda kötü prognozun bağımsız bir göstergesi olabileceğini de belirtilmiştir (Sahin et al., 2021).

CLDN18.2, rezeke edilemeyen/metastatik mide kanseri hastalarında ve CLDN18.2 pozitif ileri evre gastroözofagial bileşke karsinomu olan hastalarda CLDN18.2 ifadesinin kandan RNA düzeyinde tespit edilebilmektedir. Ayrıca bu sonuçlar hastaların primer tümörlerinden elde edilen İHK sonuçlarıyla %100 uyumlu olduğu belirtilmiştir. Bu yöntem Zolbetuksimab tedavisine uygun potansiyel hastaları aramak için invaziv olmayan alternatif bir seçenek ve daha fazla hastanın zamanında tedavi edilebilmesi için daha hızlı ve doğru bir yöntem olabilir (Fan et al., 2021) ve (Sahin et al., 2021).

Kanser tedavisi için hassas tıbbın nihai amacı, normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerine özgü süreçlerin terapötik olarak manipüle edilmesidir. Bu yaklaşıma duyarlı olan onkojenik füzyon genlerinin neden olduğu hastalıkların özgün bir kanser alt kümesini olduğu düşünülmektedir. Diğer kanserlerden farklı olarak bu hastalıklar, yalnızca kanser hücrelerinde bulunan kimerik ve neomorfik proteinler (yani füzyon proteinleri) içerir. Ayrıca, bu füzyonların oluşumu genellikle kanser gelişimini yönlendiren öncü (driver) genetik anormallikler olarak kabul edilir. Bu nedenle, füzyon proteinlerinin tümörler içinde klonal seviyelerde bulunduğu düşünülür. Bu, füzyon proteinleri ve etki mekanizmalarının terapötik olarak hedeflenmesinin, bu hastalıkları iyileştirmek için önemli fırsatlar olduğuna inanılır (Brien et al., 2019; Fan et al., 2021).

Tez çalışmasında *CLDN18* geninin beşinci ekzonu ile *ARHGAP26* geninin on ikinci ekzonu arasında oluşan CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu 263 mide kanseri vakasını içeren geniş bir hasta grubunda araştırılmıştır. Pozitif vakalar in situ RT-PCR yöntemi ve iki ayrı primer çifti (FUS2,FUS3) kullanılarak belirlenmiştir. Gen füzyonu pozitif 27 vakanın tümörlü dokularında elde edilen RNA'lar kullanılarak tek aşamalı RT-PCR ile validasyon gerçekleştirilmiştir. Olgunun klinik ve patolojik özellikleri belirlenmiştir. Olguların kadın erkek oranı benzerdir. Ortalama yaş 64,59'dur. Tümör histolojik tipi açısından nadir olarak tanımlanan herhangi bir alt gruba dahil edilemeyen vakaların tüm olguların %25'ini oluşturması füzyon pozitif vakaların morfolojik farklılıklara sahip olabileceğini göstermiştir.

CLDN18-ARHGAP gen füzyonu ilk kez Kanser Genom Atlası Projesi'nde tanımlanmıştır. Genomik stabil alt grupta yer alan tümörlerin %15'inde tespit edilmiştir. CLDN18-ARHGAP füzyonlarının, genomik stabil tipin genetik alt yapısında önemli yer tutan *CDH1* ve *RHOA* genlerindeki somatik mutasyonlar ile de karşılıklı olarak münhasırdır (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Taşlı yüzük hücreli karsinomlarda gerçekleştirilen başka bir çalışmada %25 oranında füzyon pozitifliği bulunmuştur. CLDN18-ARHGAP26/6 füzyonlu hastalar kemoterapiden fayda görmediği, CLDN18-ARHGAP26'yı aşırı eksprese eden hücreler kontrole kıyasla oksaliplatine karşı yaklaşık üç kat direnç sergilerken, tedavide sık kullanılan ilaçlardan 5-fluorourasile karşı da dirençli olduğu tespit edilmiştir. Gen füzyonu mide kanserleri için bağımsız bir prognostik faktör olabilir. CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu hücrelerin büyüme hızı ve göç kabiliyeti üzerinde çok az etki göstermiştir (Shu et al., 2018; W. H. Zhang et al., 2020). Japonya'da 40 yaş ve altı diffüz tip mide kanseri hastalarında %15,1'inde füzyon tespit edilmiştir. Füzyonun kötü prognoz ve agresif hastalık özelliklerine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Nakayama et al., 2019). Diğer bir çalışmada düzensiz bir şekilde kaynaşmış/anastomoz yapan mide bezlerini içeren intestinal tip mide tümörlerinin %7'si CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu için pozitiftir. Bu durum gen füzyonunun diffüz tipe özgü olmadığını farklı mide kanseri alt tiplerinde de bulunabileceğini göstermektedir (Hashimoto ve Oshima, 2022).

CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonunun yaşam süresi üzerine etkisi de araştırılmıştır. Ölen vakaların %8,1'i (159/13) füzyon pozitif olgulardan oluşmaktadır. Füzyon negatif olguların ortalama yaşam süresi 19,6 ay olarak belirlenirken füzyon pozitif olguların ortalama yaşam süresi 21,4 ay olduğu tespit edilmiştir. Gen füzyonunun incelenen örneklemde yaşam süresi üzerine herhangi olumsuz bir etkide bulunmadığı görülmüştür.

Formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü dokular (FFPE), moleküler testler için en yaygın kullanılan kaynaktır. FFPE doku örnekleri kolay ulaşılabilir uzun süreli saklamada ucuz ve birçok durumda da geriye dönük çalışmalar için mevcut tek materyaldir. Bireye özgü tıbbın önem kazandığı günümüzde kanserin klinik yönetimi için FFPE doku örneklerinden somatik mutasyonların doğru bir şekilde tanımlanması tanı ve tedavinin belirlenmesi için zorunlu hale gelmiştir. Tüm biyopsiler ve cerrahi numuneler formalinle sabitlenir ve parafine gömülür. Moleküler çalışmalarda uygulanan proteaz protokolleri fiksatiflerle proteinler ve nükleik asitler arasında gerçekleşen çapraz bağlanmaları tamamen ortadan kaldırılamaz. FFPE dokularından izole edilen nükleik asitler ciddi şekilde degrede olur ve genellikle küçük

parçalar şeklinde elde edilir. Bu durum nükleik asit parçalarının PCR gibi moleküler yöntemlerde kullanımını zorlaştırır. Yerinde revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (İn situ RT-PCR), doku bölümlerinde mRNA'nın belirlenmesi için daha geleneksel olarak kullanılan İn situ hibridizasyonu tekniği ile PCR'ı birleştiren düşük maliyetli avantajlı bir tekniktir (Dietrich et al., 2013; Patel et al., 2017).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İn situ RT-PCR yöntemi kullanılarak tespit edilen CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu pozitif vakaların özellikleri incelendiğinde;

- Olguların 27 tanesinde CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonu tespit edilmiştir.
- Kadın (n=13) ve erkekler (n=14) arasında dağılımı benzerdir.
- Ortalama yaş 64,59'dur.
- Histolojik tiple ilişkili değildir.
- Füzyon negatif ve pozitif grup arasında sağkalım açısından anlamlı bir fark yoktur.

CLDN18.2 antikoru ile gerçekleştirilen immünhistokimyasal boya sonuçları;

- Tüm vakaların%7,8'inde ifade edilir.
- Negatif ve pozitif gruplar arasında cinsiyet, TNM evresi, histolojik alt tip ve genel sağkalım açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Patoloji arşiv vakalarında izole edilen RNA kalitesinin iyi olmaması nedeniyle CLDN18-ARHGAP26 gen füzyonunun FISH (Floresan in situ hibridizasyon) veya yeni nesil sekanslama (NGS) tabanlı RNAseq gibi alternatif bir yöntemle de doğrulanabilir.

KAYNAKLAR

Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging.*CA:A Cancer Journal for Clinicians, 67*(2), 93-99.

Bednarz-Misa, I., Fortuna, P., Diakowska, D., Jamrozik, N., ve Krzystek-Korpacka, M. (2020). Distinct Local and Systemic Molecular Signatures in the Esophageal and Gastric Cancers: Possible Therapy Targets and Biomarkers for Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(12),4509

Borkhardt, A., Bojesen, S., Haas, O. A., Fuchs, U., Bartelheimer, D., Loncarevic, I. F.,.Lampert, F. (2000). The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97*(16), 9168-9173.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., ve Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians, 68*(6), 394-424.

Brien, G. L., Stegmaier, K., ve Armstrong, S. A. (2019). Targeting chromatin complexes in fusion protein-driven malignancies. *Nature Reviews. Cancer, 19*(5), 255-269.

Bros, M., Haas, K., Moll, L., ve Grabbe, S. (2019). RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. *Cells, 8*(7).733

Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature, 513*(7517), 202-209.

Cao, W., Xing, H., Li, Y., Tian, W., Song, Y., Jiang, Z., ve Yu, J. (2022). Claudin18.2 is a novel molecular biomarker for tumor-targeted immunotherapy. *Biomark Research, 10*(1), 38.

Chen, J., Xu, Z., Hu, C., Zhang, S., Zi, M., Yuan, L., ve Cheng, X. (2023). Targeting CLDN18.2 in cancers of the gastrointestinal tract: New drugs and new indications. *Frontiers in Oncology, 13*,1132319

Cherfils, J., ve Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews, 93*(1), 269-309.

Chia, N. Y., ve Tan, P. (2016). Molecular classification of gastric cancer. *Annals of Oncology, 27*(5), 763-769.

Cho, J., Kang, M. S., ve Kim, K. M. (2016). Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. *Journal of Gastric Cancer, 16*(1), 1-7.

Choi, J. H., Kim, Y. B., Ahn, J. M., Kim, M. J., Bae, W. J., Han, S. U., . . . Lee, D. (2018). Identification of genomic aberrations associated with lymph node metastasis in diffuse-type gastric cancer. *Experimental and Molecular Medicine, 50*(4), 1-11.

Correa, P. (2013). Gastric cancer: overview. *Gastroenterology Clinics, 42*(2), 211-217.

Cosma, L. S., Schlosser, S., Tews, H. C., Muller, M., ve Kandulski, A. (2022). Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Molecular Genetics, Biological Mechanisms and Current Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(14).7821

Da, B., Jani, N., Gupta, N., Jayaram, P., Kankotia, R., Yao Yu, C., Buxbaum, J. (2019). High-risk symptoms do not predict gastric cancer precursors. *Helicobacter, 24*(1), e12548.

De Brito, B. B., da Silva, F. A. F., Soares, A. S., Pereira, V. A., Santos, M. L. C., Sampaio, M. M., . . . de Melo, F. F. (2019). Pathogenesis and clinical management of Helicobacter pylori gastric infection. *World Journal of Gastroenterology, 25*(37), 5578-5589.

Dicken, B. J., Bigam, D. L., Cass, C., Mackey, J. R., Joy, A. A., ve Hamilton, S. M. (2005). Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Annals of Surgery, 241*(1), 27-39.

Doherty, G. J., ve Lundmark, R. (2009). GRAF1-dependent endocytosis. *Biochemical Society Transactions, 37*(Pt 5), 1061-1065.

Dottermusch, M., Kruger, S., Behrens, H. M., Halske, C., ve Rocken, C. (2019). Expression of the potential therapeutic target claudin-18.2 is frequently decreased in gastric cancer: results from a large Caucasian cohort study. *Virchows Archive, 475*(5), 563-571.

Fan, L., Chong, X., Zhao, M., Jia, F., Wang, Z., Zhou, Y., Shen, L. (2021). Ultrasensitive Gastric Cancer Circulating Tumor Cellular CLDN18.2 RNA Detection Based on a Molecular Beacon. *Analytical Chemistry, 93*(2), 665-670.

Farrell, P. J. (2019). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Annual Review of Pathology, 14*, 29-53.

Figueiredo, J., Melo, S., Carneiro, P., Moreira, A. M., Fernandes, M. S., Ribeiro, A. S., Seruca, R. (2019). Clinical spectrum and pleiotropic nature of CDH1 germline mutations. *Journal of Medical Genetics, 56*(4), 199-208.

Garcia-Pelaez, J., Barbosa-Matos, R., Gullo, I., Carneiro, F., ve Oliveira, C. (2021). Histological and mutational profile of diffuse gastric cancer: current knowledge and future challenges. *Molecular Oncology, 15*(11), 2841-2867.

Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Reeve, A. E. (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature, 392*(6674), 402-405.

Gullo, I., van der Post, R. S., ve Carneiro, F. (2021). Recent advances in the pathology of heritable gastric cancer syndromes. *Histopathology, 78*(1), 125-147.

Hagen, S. J. (2017). Non-canonical functions of claudin proteins: Beyond the regulation of cell-cell adhesions. *Tissue Barriers, 5*(2), e1327839.

Hanahan, D., ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 144*(5), 646-674.

Hashimoto, I., ve Oshima, T. (2022). Claudins and Gastric Cancer: An Overview. *Cancers (Basel), 14*(2).

Hausman, D. M. (2019). What Is Cancer? *Perspectives in Biology and Medicine, 62*(4), 778-784.

Helicobacter, ve Cancer Collaborative, G. (2001). Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut, 49*(3), 347-353.

Heyer, E. E., Deveson, I. W., Wooi, D., Selinger, C. I., Lyons, R. J., Hayes, V. M., Blackburn, J. (2019). Diagnosis of fusion genes using targeted RNA sequencing. *Nature Communications, 10*(1), 1388.

Hildebrand, J. D., Taylor, J. M., ve Parsons, J. T. (1996). An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Molecular and Cellular Biology, 16*(6), 3169-3178.

Holger Till, M. T., John E. Foker, George W. Holcomb III, Khalid M. Khan. (2017). Esophageal and Gastric Disorders in Infancy and Childhood. *Springer Berlin Heidelberg*, 957-61

Holst, M. R., Vidal-Quadras, M., Larsson, E., Song, J., Hubert, M., Blomberg, J., Lundmark, R. (2017). Clathrin-Independent Endocytosis Suppresses Cancer Cell Blebbing and Invasion. *Cell Reports, 20*(8), 1893-1905.

Iyer, P., Moslim, M., Farma, J. M., ve Denlinger, C. S. (2020). Diffuse gastric cancer: histologic, molecular, and genetic basis of disease. *Translational Gastroenterology and Hepatology 5*, 52.

Janiszewska, M., Primi, M. C., ve Izard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *The Journal of Biological Chemistry, 295*(8), 2495-2505.

Joshi, S. S., ve Badgwell, B. D. (2021). Current treatment and recent progress in gastric cancer.*CA: A Cancer Journal For Clinicians, 71*(3), 264-279.

Karlsson, R., Pedersen, E. D., Wang, Z., ve Brakebusch, C. (2009). Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1796*(2), 91-98.

Katona, B. W., ve Rustgi, A. K. (2017). Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions. *Cellular And Molecular Gastroenterology and Hepatology, 3*(2), 211-217.

Kerr, J. R. (2019). Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. *Journal of Clinical Pathology., 72*(10), 651-658.

Kim, W., Kidambi, T., Lin, J., ve Idos, G. (2022). Genetic Syndromes Associated with Gastric Cancer. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics, 32*(1), 147-162.

Komuro, A., Yashiro, M., Iwata, C., Morishita, Y., Johansson, E., Matsumoto, Y., Miyazono, K. (2009). Diffuse-type gastric carcinoma: progression, angiogenesis, and transforming growth factor beta signaling. *Journal of the National Cancer Institute, 101*(8), 592-604.

Kovalchuk, I., ve Kovalchuk, O. (2021). *Genome stability: from virus to human application* (26) *Academic Pressure*.615-633

Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., ve Blasig, I. E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta, 1778*(3), 631-645.

Kyuno, D., Takasawa, A., Takasawa, K., Ono, Y., Aoyama, T., Magara, K., Osanai, M. (2021). Claudin-18.2 as a therapeutic target in cancers: cumulative findings from basic research and clinical trials. *Tissue Barriers*, 1967080.

Lauren, P. (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, 64*, 31-49.

Lei, Z. N., Teng, Q. X., Tian, Q., Chen, W., Xie, Y., Wu, K., He, Y. (2022). Signaling pathways and therapeutic interventions in gastric cancer. *Signal Transduct Target Therapy, 7*(1), 358.

Liliac, I. M., Sacerdotianu, M. V., Ungureanu, B. S., Iordache, S., Mogoanta, L., Saftoiu, A., ve Pirici, D. (2021). Descriptive Analysis of Patients with Gastric Tumors Referred to the Largest Emergency Hospital in Oltenia Region-Romania, Between 2015-2020. *Current Health Sciences Journal, 47*(2), 290-297.

Lundmark, R., Doherty, G. J., Howes, M. T., Cortese, K., Vallis, Y., Parton, R. G., ve McMahon, H. T. (2008). The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Current Biology, 18*(22), 1802-1808.

Luo, J., Chimge, N. O., Zhou, B., Flodby, P., Castaldi, A., Firth, A. L., Borok, Z. (2018). CLDN18.1 attenuates malignancy and related signaling pathways of lung adenocarcinoma in vivo and in vitro. *International Journal of Cancer, 143*(12), 3169-3180.

Luo, W., Fedda, F., Lynch, P., ve Tan, D. (2018). CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Frontiers in Pharmacology, 9*, 1421.

Ma, S. D., Tsai, M. H., Romero-Masters, J. C., Ranheim, E. A., Huebner, S. M., Bristol, J. A., . . . Kenney, S. C. (2017). Latent Membrane Protein 1 (LMP1) and LMP2A Collaborate To Promote Epstein-Barr Virus-Induced B Cell Lymphomas in a Cord Blood-Humanized Mouse Model but Are Not Essential. *Journal of Virology., 91*(7). e01928-16.

Marwitz, T., Huneburg, R., Spier, I., Lau, J. F., Kristiansen, G., Lingohr, P., Strassburg, C. P. (2020). Hereditary Diffuse Gastric Cancer: A Comparative Cohort Study According to Pathogenic Variant Status. *Cancers (Basel), 12*(12). 3726.

Matsuda, Y., Semba, S., Ueda, J., Fuku, T., Hasuo, T., Chiba, H., Yokozaki, H. (2007). Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Science, 98*(7), 1014-1019.

McCracken, K. W., ve Wells, J. M. (2017). Mechanisms of embryonic stomach development. *Seminars in Cell and Developmental Biology 66*, 36-42.

McLean, M. H., ve El-Omar, E. M. (2014). Genetics of gastric cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology., 11*(11), 664-674.

Monster, J. L., Kemp, L. J. S., Gloerich, M., ve van der Post, R. S. (2022). Diffuse gastric cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1877*(3), 188719.

Nakayama, I., Shinozaki, E., Sakata, S., Yamamoto, N., Fujisaki, J., Muramatsu, Y., Noda, T. (2019). Enrichment of CLDN18-ARHGAP fusion gene in gastric cancers in young adults. *Cancer Science, 110*(4), 1352-1363.

Oliveira, C., Pinheiro, H., Figueiredo, J., Seruca, R., ve Carneiro, F. (2015). Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncology, 16*(2), 60-70.

Ooki, A., ve Yamaguchi, K. (2022). The dawn of precision medicine in diffuse-type gastric cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology, 14.* 1-25

Pecina-Slaus, N. (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International, 3*(1), 17.

Piazuelo, M. B., Epplein, M., ve Correa, P. (2010). Gastric cancer: an infectious disease. *Infectious Disease Clinics of North America, 24*(4), 853-869.

Qian, J., Qian, Z., Lin, J., Yao, D. M., Chen, Q., Li, Y., Wang, Y. L. (2011). Abnormal methylation of GRAF promoter Chinese patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research, 35*(6), 783-786.

Ratti, M., Lampis, A., Hahne, J. C., Passalacqua, R., ve Valeri, N. (2018). Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences, 75*(22), 4151-4162.

Rawla, P., ve Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Przegląd Gastroenterologiczny, 14*(1), 26-38.

Regev, M., Sabanay, H., Kartvelishvily, E., Kam, Z., ve Bershadsky, A. D. (2017). Involvement of Rho GAP GRAF1 in maintenance of epithelial phenotype. *Cell Adhesion and Migration, 11*(4), 367-383.

Reyes, G. X., Schmidt, T. T., Kolodner, R. D., ve Hombauer, H. (2015). New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma, 124*(4), 443-462.

Rohde, C., Yamaguchi, R., Mukhina, S., Sahin, U., Itoh, K., ve Tureci, O. (2019). Comparison of Claudin 18.2 expression in primary tumors and lymph node metastases in Japanese patients with gastric adenocarcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology, 49*(9), 870-876.

Roignot, J., Peng, X., ve Mostov, K. (2013). Polarity in mammalian epithelial morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5*(2), a013789.

Rustgi, S. D., Ching, C. K., ve Kastrinos, F. (2021). Inherited Predisposition to Gastric Cancer. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America, 31*(3), 467-487.

Sahin, U., Koslowski, M., Dhaene, K., Usener, D., Brandenburg, G., Seitz, G., Tureci, O. (2008). Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. *Clinical Cancer Research, 14*(23), 7624-7634.

Sahin, U., Tureci, O., Manikhas, G., Lordick, F., Rusyn, A., Vynnychenko, I., Al-Batran, S. E. (2021). FAST: a randomised phase II study of zolbetuximab (IMAB362) plus EOX versus EOX alone for first-line treatment of advanced CLDN18.2-positive gastric and gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Annals of Oncology, 32*(5), 609-619.

Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. (1994). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 61(1)*, 241.

Shenoy, S. (2019). CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics, Molecular Mechanisms and Guidelines for Management. *Cancer Management and Research, 11*, 10477-10486.

Shu, Y., Zhang, W., Hou, Q., Zhao, L., Zhang, S., Zhou, J., Hu, J. (2018). Prognostic significance of frequent CLDN18-ARHGAP26/6 fusion in gastric signet-ring cell cancer. *Nature Communications, 9*(1), 2447.

Singh, A. B., Sharma, A., ve Dhawan, P. (2010). Claudin family of proteins and cancer: an overview. *Journal of Oncology. 2010*, 541957.

Singh, A. B., Uppada, S. B., ve Dhawan, P. (2017). Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *European journal of Physiology., 469*(1), 69-75.

Slavin, T. P., Weitzel, J. N., Neuhausen, S. L., Schrader, K. A., Oliveira, C., ve Karam, R. (2019). Genetics of gastric cancer: what do we know about the genetic risks? *Translational Gastroenterology and Hepatology, 4*, 55.

Stransky, N., Cerami, E., Schalm, S., Kim, J. L., ve Lengauer, C. (2014). The landscape of kinase fusions in cancer. *Nature Communications,* 5(1), 4846.

Styk, J., Pos, Z., Pos, O., Radvanszky, J., Turnova, E. H., Buglyo, G., Szemes, T. (2023). Microsatellite instability assessment is instrumental for Predictive, Preventive and Personalised Medicine: status quo and outlook. *EPMA Journal 14*(1), 143-165.

Tanaka, A., Ishikawa, S., Ushiku, T., Yamazawa, S., Katoh, H., Hayashi, A., Fukayama, M. (2018). Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type gastric cancer with relatively early onset. *Oncotarget, 9*(50), 29336-29350.

Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., ve Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology, 138*(6), 2101-2114 e2105.

Thrift, A. P., ve El-Serag, H. B. (2020). Burden of Gastric Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology, 18*(3), 534-542.

Tureci, O., Koslowski, M., Helftenbein, G., Castle, J., Rohde, C., Dhaene, K., Sahin, U. (2011). Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals. *Gene, 481*(2), 83-92.

Ungureanu, B. S., Lungulescu, C. V., Pirici, D., Turcu-Stiolica, A., Gheonea, D. I., Sacerdotianu, V. M., Saftoiu, A. (2021). Clinicopathologic Relevance of Claudin 18.2 Expression in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology, 11*, 643872.

Vilar, E., ve Gruber, S. B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nature Reviews Clinical Oncology, 7*(3), 153-162.

Vo, Q. N., Geradts, J., Gulley, M. L., Boudreau, D. A., Bravo, J. C., ve Schneider, B. G. (2002). Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *Journal of Clinical Pathology, 55*(9), 669-675.

Wangxia, L. V., Fang, Y., Liu, Y., Zhao, Y., Shi, Z., ve Zhong, H. (2019). Circular RNA ARHGAP26 is over-expressed and its downregulation inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in gastric cancer cells. *Saudi Journal of Gastroenterology, 25*(2), 119-125.

Warren, J. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1273-1275.

Wheeler, A. P., ve Ridley, A. J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Experimental Cell Research, 301*(1), 43-49.

Xie, Y., Shao, Y., Sun, W., Ye, G., Zhang, X., Xiao, B., ve Guo, J. (2018). Downregulated expression of hsa_circ_0074362 in gastric cancer and its potential diagnostic values. *Biomarkers in Medicine, 12*(1), 11-20.

Xu, B., Liu, F., Liu, Q., Shi, T., Wang, Z., Wu, N., Wei, J. (2020). Highly expressed Claudin18.2 as a potential therapeutic target in advanced gastric signet-ring cell carcinoma (SRCC). *Journal of Gastrointestinal Oncology, 11*(6), 1431-1439.

Yamaguchi, H., Nagamura, Y., ve Miyazaki, M. (2022). Receptor Tyrosine Kinases Amplified in Diffuse-Type Gastric Carcinoma: Potential Targeted Therapies and Novel Downstream Effectors. *Cancers (Basel), 14*(15), 3750.

Yao, F., Kausalya, J. P., Sia, Y. Y., Teo, A. S., Lee, W. H., Ong, A. G., Hillmer, A. M. (2015). Recurrent Fusion Genes in Gastric Cancer: CLDN18-ARHGAP26 Induces Loss of Epithelial Integrity. *Cell Reports, 12*(2), 272-285.

Young, L. S., Yap, L. F., ve Murray, P. G. (2016). Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature Reviews Cancer, 16*(12), 789-802.

Zeisel, M. B., Dhawan, P., ve Baumert, T. F. (2019). Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. *Gut, 68*(3), 547-561.

Zhang, L., Zhou, A., Zhu, S., Min, L., Liu, S., Li, P., ve Zhang, S. (2021). The role of GTPase-activating protein ARHGAP26 in human cancers. *Molecular and cellular biochemistry*, 477(1), 319–326.

Zhang, W. H., Zhang, S. Y., Hou, Q. Q., Qin, Y., Chen, X. Z., Zhou, Z. G., Hu, J. K. (2020). The Significance of the CLDN18-ARHGAP Fusion Gene in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology., 10*, 1214.

Zhong, W., Lu, Y., Ma, Z., He, Y., Ding, Y., Yao, G., Huang, Y. (2022). Development of a Humanized VHH Based Recombinant Antibody Targeting Claudin 18.2 Positive Cancers. *Frontiers in immunology, 13*, 885424.

Zhou, J., Hayakawa, Y., Wang, T. C., ve Bass, A. J. (2014). RhoA mutations identified in diffuse gastric cancer. *Cancer Cell, 26*(1), 9-11.

Zhou, W. Y., Cai, Z. R., Liu, J., Wang, D. S., Ju, H. Q., ve Xu, R. H. (2020). Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Molecular Cancer, 19*(1), 172.

Zhu, G., Foletti, D., Liu, X., Ding, S., Melton Witt, J., Hasa-Moreno, A., Liu, S. H. (2019). Targeting CLDN18.2 by CD3 Bispecific and ADC Modalities for the Treatments of Gastric and Pancreatic Cancer. *Scientific Reports, 9*(1), 8420.

EKLER

EK-1. Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni

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

Sayı : 16969557-941
Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 04 MAYIS 2021 SALI
Toplantı No : 2021/10
Proje No : GO 21/603(Değerlendirme Tarihi: 04.05.2021)
Karar No : 2021/10-22

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Aytekin AKYOL'un sorumlu araştırmacı olduğu, Blm. Uzm. Aynur IŞIK, Uzm. Dr. Güneş GÜNER ile birlikte çalışacakları, GO 21/603 kayıt numaralı ***"Translokasyon İlişkili Diffüz İnfiltratif Mide Kanserlerinin Moleküler, İmmünohistokimyasal ve Klinikopatolojik Özelliklerinin Tanımlanması"*** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Ocak 2000-31 Aralık 2015 tarihleri arasındaki arşiv kayıtlarının 01 Haziran 2021 -01 Aralık 2022 tarihleri arasında geçerli olmak üzere incelenmesi etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1.Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Başkan)
2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN
3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK
4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER
5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN
6. Doç. Dr. Can Ebru KURT

İZİNLİ
7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR
8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTII
9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ
10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR
11. Av. Serap MORALIOĞLU

Ceylan, F., Guven, D. C., Taban, H., Aktepe, O., Sahin, T. K., Kilickap, S., Dizdar, O. (2023). Prognostic and predictive value of tumoral DNA damage repair protein expression in patients with resected pancreatic cancer. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 47*(3), 102091.

Demirkol Canli, S., Uner, M., Kucukkaraduman, B., Karaoglu, D. A., Isik, A., Turhan, N., Gure, A. O. (2023). A Novel Gene List Identifies Tumors with a Stromal-Mesenchymal Phenotype and Worse Prognosis in Gastric Cancer. *Cancers (Basel), 15*(11).

Efil, S. C., Guner, G., Guven, D. C., Celikten, B., Celebiyev, E., Taban, H., Dizdar, O. (2023). Prognostic and predictive value of tumor infiltrating lymphocytes in combination with systemic inflammatory markers in colon cancer. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 47*(7), 102171.

Gok, A., Isik, A., Bakir, S., Uzun, S., Guner, G., Ozcan, O., Akyol, A. (2023). Role of Reduced Bdnf Expression in Novel Apc Mutant Allele-induced Intestinal and Colonic Tumorigenesis in Mice. *In Vivo, 37*(4), 1562-1575.

Guner, G., Isik, A., Karabulut, E., Gedikoglu, G., Sokmensuer, C., & Akyol, A. (2018). Morphologic and Immunohistochemical Appraisal of Primary Gastric Carcinomas. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology, 26*(10), e107-e115.

Işık, A. , Güner, G. , Zeyneloğlu, C. , Demirkol Canlı, S. , Tastan, H. , Akyol, A. Claudin 18.2 Expression in Gastric Adenocarcinomas in a Large Turkish Cohort. Abant Tıp Dergisi 12 (2023): 122-130

Oztop, S., Isik, A., Guner, G., Gurdal, H., Karabulut, E., Yilmaz, E., & Akyol, A. (2019). Class III beta-tubulin Expression in Colorectal Neoplasms Is a Potential Predictive Biomarker for Paclitaxel Response. *Anticancer R esearch, 39*(2), 655-662.

Saatci, O., Kaymak, A., Raza, U., Ersan, P. G., Akbulut, O., Banister, C. E., Sahin, O. (2020). Targeting lysyl oxidase (LOX) overcomes chemotherapy resistance in triple negative breast cancer. *Nature Communications, 11*(1), 2416.

Uner, M., Isik, A., Oztop, S., Karabulut, E., Demirkol-Canli, S., & Akyol, A. (2022). Gastric Carcinoma with Lymphoid Stroma: A Combination of Mismatch Repair Deficient Medullary Type and Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinomas. *International Journal of Surgical Pathology, 30*(6), 623-633.

Uzun, S., Isik, A., Katipoglu, K., Guner, G., & Akyol, A. (2023). Characterization of the Subcellular Distribution of Phospho-beta-catenin in Colorectal Cancer. *In Vivo, 37*(4), 1576-1583.

Uzun, S., Ozcan, O., Isik, A., Saglam, A., Gedikoglu, G., Demiroz, A. S., Akyol, A. (2021). Loss of CTNNB1 exon 3 in sclerosing angiomatoid nodular transformation of the spleen. *Virchows Archive, 479*(4), 747-754.

Gazili olmak ayrıcalıktır