T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ANKARA ONKOLOJİ SUAM TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

CIC-REARANJMAN SARKOMLARDA SİKLİN E1 EKSPRESYONUNUN EWİNG SARKOMLAR İLE AYIRICI TANISINDAKİ ÖNEMİ, KLİNİK, HİSTOMORFOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

Dr. Berna KARABULUT

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2022

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DR. ABDURRAHMAN YURTASLAN ANKARA ONKOLOJİ SUAM TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

CIC-REARANJMAN SARKOMLARDA SİKLİN E1 EKSPRESYONUNUN EWİNG SARKOMLAR İLE AYIRICI TANISINDAKİ ÖNEMİ, KLİNİK, HİSTOMORFOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

Dr. Berna KARABULUT

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Sibel YENİDÜNYA
Yardımcı Tez Danışmanları: Prof. Dr. Olçay KANDEMİR
Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU
Dr. Fisun ARDIÇ YÜKRÜK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2022

TEŞEKKÜR

Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji EAH Tıbbi Patoloji bölümünde geçirdiğim uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, eğitimim sırasında bana destek olan Prof. Dr. Olçay KANDEMİR'e; zorlu tez sürecinin her anında bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen, tezimin başlangıcından sonuna kadar bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım Prof. Dr. Sibel YENİDÜNYA ve yardımcı tez danışmanım Uzm. Dr. Fisun ARDIÇ YÜKRÜK'e; tez çalışmamın FISH aşamasını Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda yürütmemi ve bölümün her türlü imkanını kullanmamı sağlayan, yoğun iş temposuna rağmen tezimin her aşamasında yardımcı olan yardımcı tez danışmanım Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU'na; FISH sonuçlarını değerlendirme aşamasında yol gösteren ve sorularımı hoşgörü ile yanıtlayan Öğr. Gör. Dr. Meral ÜNER'e; uzmanlık eğitimim boyunca bana rehberlikte bulunan, klinik tecrübelerimin gelişmesinde katkısı olan bölümümüzün diğer tüm uzmanlarına teşekkürlerimi arz ederim.

Tezimin yazımı esnasında her türlü sorumu hoşgörü ile cevaplayan Dr. Emine Begüm COŞKUN, Dr. Müzeyyen Burcu KAPLAN YILMAZ ve Dr. Esin ERGÜN başta olmak üzere, destekleri ile her zaman yanımda olan ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

FISH sonuçlarının dijital ortama aktarılmasında yardımcı olan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediyatrik ve Perinatal Patoloji Araştırmaları Anabilim Dalı'nda Öğr. Gör. Sercan ÇADIRCI'ya ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda çalışan tüm laboratuvar çalışanlarına,

Çalışmamın arşiv, kesit ve immünohistokimya çalışmalarında emeği geçen laboratuvar çalışanlarımız ve arşiv sorumlumuza ve tez çalışmamı destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Birimi'ne de ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında yanımda olan, koşulsuz sevgi ve desteklerini esirgemeyen, babam Bahri KARABULUT, annem Songül KARABULUT ve kardeşim Hakkı Alperen KARABULUT'a teşekkürü borç bilirim.

Dr. Berna KARABULUT

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
KISALTMALAR ..... **iv**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÖZET ..... **viii**
ABSTRACT ..... **x**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
1.1. GİRİŞ 1
1.2. AMAÇ 2
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. EWİNG SARKOMU 3
2.1.1. Tarihçe 3
2.1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji 3
2.1.3. Yerleşim Yeri 3
2.1.4. Klinik Bulgular 4
2.1.5. Radyolojik Özellikler 4
2.1.6. Makroskopi 4
2.1.7. Histopatoloji 5
2.1.8. İmmünofenotipik Özellikler 8
2.1.9. Moleküler Patoloji 10
2.1.10. Prognoz ve Tedavi 12
2.2. CIC-REARANJMAN SARKOMLAR 13
2.2.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji 13
2.2.2. Lokalizasyon 13
2.2.3. Klinik Bulgular 14
2.2.4. Makroskopi 14
2.2.5. Histopatoloji 14
2.2.6. İmmünfenotipik Özellikler 17
2.2.7. Moleküler Patoloji 18

2.2.8. Prognoz ve Tedavi 22
2.3. SİKLİN E1 23
2.3.1.Siklin E aktivasyonunun Replikasyon Stresi, Kromozomal ve Genomik İnstabilite ile İlişkisi 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1. ETİK KURUL 32
3.2. OLGU SEÇİMİ 32
3.3. İNCELENEN PARAMETRELER 33
3.4. BLOK HAZIRLANMASI 34
3.5. İMMÜNOHİSTOKİMYA ÇALIŞMALARI 34
3.6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME 35
3.7. FLORESAN IN-SITU HİBRİDİZASYON 35
3.8. FISH SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 36
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ……...…..37
4. BULGULAR 38
5. TARTIŞMA 59
6. SONUÇLAR 71
KAYNAKLAR 74
ÖZGEÇMİŞ 87
EKLER 90
EK 1. TEZ KONUSU ONAY FORMU 91
EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU 98

KISALTMALAR

BBA: Büyük Büyütme Alanı

CAP: College of American Pathologists

CDK2: Cyclin Dependent Kinase 2

CRF: Corticotrophin releasing hormone

CRS: CIC-rearranjman Sarkom, CIC rearrangement sarcoma

DMA: Doku Mikroarray

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ES: Ewing Sarkomu, Ewing Sarcoma

ETS: Avian Erythroblastosis virus Transforming Sequence

EWSR1: Ewing sarcoma breakpoint region 1 gene

FISH: Floresan in-situ hibridizasyon

FLI-1: Friend of Leukemia virus Integration site 1

GBM: Glioblastoma Multiforme

HMG: High-mobility group

HMW-CK: High molecular weight cytokeratin

KT: Kemoterapi

LMW-CK: Low molecular weight cytokeratin

PNET: Primitif Nöroektodermal Tümör

pRb: Retinoblastom proteini

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse-transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

TMA: Tissue microarray

TMZ: Temozolomid

VGF: VGF nerve growth factor inducible

WHO: World Health Organization

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. İmmünohistokimyasal boyamada otomatik cihaz içi basamaklar 35
Tablo 2. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve patolojik verileri ... 43
Tablo 3. Siklin E1 skoru ile FISH tanısı arasındaki ilişki 44
Tablo 4. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile FISH tanısı arasındaki ilişki 44
Tablo 5. Siklin E1 skoru ile FISH sonucu arasındaki ilişki 45
Tablo 6. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile tanı arasındaki ilişki 45
Tablo 7. Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyi ile yaş arasındaki ilişki 46
Tablo 8. Siklin E1 skorunun klinik ve patolojik verilerle ilişkisi 49
Tablo 9. Siklin E1 ekspresyon düzeyinin klinik ve patolojik verilerle ilişkisi 50
Tablo 10. FISH sonucu ile yaş arasındaki ilişki 52
Tablo 11. FISH sonucu ile Cinsiyet arasındaki ilişki 53
Tablo 12. FISH sonucu ile Cinsiyet arasındaki ilişki 53
Tablo 13. FISH sonucu ile tümör lokalizasyonları arasındaki ilişki 54
Tablo 14. FISH sonucu ile tümör lokalizasyonları arasındaki ilişki 54
Tablo 15. FISH sonucu ile tümör morfolojisi arasındaki ilişki 54
Tablo 16. FISH sonucu ile tümör morfolojisi arasındaki ilişki 55
Tablo 17. FISH sonucu ile miksoid stroma varlığı arasındaki ilişki 55
Tablo 18. FISH sonucu ile miksoid stroma varlığı arasındaki ilişki 55
Tablo 19. FISH sonucu ile metastaz varlığı arasındaki ilişki 56
Tablo 20. FISH sonucu ile metastaz varlığı arasındaki ilişki 56
Tablo 21. FISH sonucu ile CD99 pozitifliği arasındaki ilişki 56
Tablo 22. FISH sonucu ile CD99 pozitifliği arasındaki ilişki 56
Tablo 23. FISH sonucu ile FLI pozitifliği arasındaki ilişki 57
Tablo 24. FISH sonucu ile FLI pozitifliği arasındaki ilişki 57
Tablo 25. FISH sonucu ile ERG pozitifliği arasındaki ilişki 57
Tablo 26. FISH sonucu ile ERG pozitifliği arasındaki ilişki 58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bir ES olgusunda klasik morfoloji (Hematoksilen&Eozin, x200). 6
Şekil 2. Klasik morfoloji gösteren bir ES olgusu (Hematoksilen&Eozin, x200). 7
Şekil 3. CD99 ile diffüz sitoplazmik-membranöz ekspresyon gösteren ES olgusu (x100). 9
Şekil 4. *EWSR1::FLI1* gen rearanjmanının basit şematik görünümü 11
Şekil 5. *EWSR1::FLI1* ve *EWSR1::ERG* gen rearanjmanlarının basitleştirilmiş şeması 12
Şekil 6. CIC rearanjman sarkomda lobüler gelişim paterni (Hematoksilen&Eozin, x40). 15
Şekil 7. CIC-rearanjman sarkomda dev hücre formasyonu ve rabdoid morfoloji (Hematoksilen&Eozin, x200). 16
Şekil 8. CIC rearanjman sarkom olgusunda nükleol belirginliği (Hematoksilen&Eozin, x400). 17
Şekil 9. CRS olgusunda immünohistokimyasal CD99 ile yamasal ekspresyon paterni (x200). 18
Şekil 10. CIC::DUX4 sarkomda gen rearanjmanının basitleştirilmiş şematik görünümü (CHD:Capicua Homeodomain; NLS: Nükleer lokalizasyon sinyali, MAPK fosforilasyon bölgeleri noktalarla belirtilmiştir). 20
Şekil 11. *CIC::FOXO4* rearanjmanının [t(X;19)(q13;q13.3)] basitleştirilmiş şematik görünümü (CHD: Capicua homedomain, FHD: Forkhead homedomain) 21
Şekil 12. *CIC::NUTM1* gen rearanjmanında olası kırılma noktaları 22
Şekil 13. *NUTM2A::CIC* gen rearanjmanının şematik görünümü (CHD: Capicua homedomain)..... 22
Şekil 14. Hücre siklusu ve düzenleyici proteinlerini içeren şema (Cyc:Siklin, CDK: Siklin Bağımlı Kinaz) 24
Şekil 15. Siklin E1 proteininin şematik yapısı (NLS: Nuclear localization signal-Nükleer lokalizasyon bölgesi, CLS: Sentrosome localisation sequence- Sentrozomda lokalize sekans, p: Fosforilasyon bölgeleri) 25
Şekil 16. Siklin E1 ve Siklin E2 proteinlerinin karşılaştırmalı yapısal şemaları 25
Şekil 17. Siklin E1 proteininin şematik yapısı 26

Şekil 18. Siklin E/CDK2 kompleksinin DNA replikasyonundaki işlevleri. ORC: Origin recognisation complex- Orijin tanıma bölgesi, MCM: Minichromose maintenance-Minikromozom korunumu, CDT1: Chromatin licensing and DNA replication factor 1-Kromatin lisanslama ve DNA replikasyon faktör; CDK, Cyclin dependent kinase; TOPBP1, DNA topoisomerase II binding protein 1-DNA topoizomeraz II bağlayıcı protein; RECQL4, RecQ like helicase 4- RecQ benzeri helikaz 4; GINS, Go-ich-ni-san..... 27
Şekil 19. Normal ve neoplastik Siklin E fonksiyonları..... 31
Şekil 20. EWSR1 gen rearanjmanı gösteren bir olguda siklin E1 negatifliği (Skor 0) (x200). 38
Şekil 21. EWSR1 (+) bir olguda siklin E1 ile skor 1 ekspresyon (x400). 39
Şekil 22. EWSR1 (-) / CIC (-) bir olguda siklin E1 ile skor 2 ekspresyon (x400). ... 39
Şekil 23. CIC (+) bir olguda siklin E1 ile skor 3 ekspresyon (x200). 40
Şekil 24. *EWSR1* gen rearanjmanı içeren bir olgu. Bir sarı sinyal ile birbirinden ayrı bir turuncu ve bir yeşil sinyal görülmektedir (40x, Olympus OlyVIA)..... 41
Şekil 25. *EWSR1* gen amplifikasyonu içeren bir olgu, hücrelerin içinde ikiden fazla turuncu sinyaller görülmektedir (80x, Olympus OlyVIA)..... 41
Şekil 26. *EWSR1* gen rearanjmanı bulunmayan bir olgu (40x, Olympus OlyVIA) .. 42
Şekil 27. *CIC* gen rearanjmanı içeren bir olgu (30x, Olympus OlyVIA) 42
Şekil 28. Siklin E1 skoru ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal-Wallis testi)..... 46
Şekil 29. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal-Wallis testi) 47
Şekil 30. EWSR1 gen rearanjmanı varlığı ve sağ kalım süresi arasındaki ilişki..... 51
Şekil 31. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ve sağ kalım süresi arasındaki ilişki..... 51
Şekil 32. FISH sonucu (Tanı) ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal Wallis testi) 52
Şekil 33. FISH sonucu (tanı) ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal-Wallis testi) 53

ÖZET

Amaç: CIC rearanjman sarkomlar (CRS), *EWSR1* gen rearanjmanı içermeyen küçük yuvarlak hücreli tümörler grubunda yer alan yüksek dereceli sarkomlardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2020 sınıflamasından önce Ewing benzeri sarkom olarak nitelendirilen CRS olguları, Ewing Sarkomu'na (ES) göre daha agresif klinik ve patolojik özellikler göstermesi ile güncel DSÖ sınıflamasında ayrı bir başlık altında incelenmektedir. CRS'lerde en sık görülen gen rearanjmanı olan CIC::DUX4 tümörlerde, siklin E1 gen ekpresyonunda artışın tümörün büyümesi ile ilişkili olduğunu gösteren deneysel çalışma bulunmaktadır. Ayrıca immünohistokimyasal siklin E1 ekspresyonundaki artışın osteosarkom ve kordoma gibi tümörlerde kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, CIC rearanjman tümörler başta olmak üzere küçük yuvarlak hücreli tümörlerde, immünohistokimyasal siklin E1 ekspresyon düzeyinin saptanması ve klinikopatolojik özellikler ile ilişkisinin olup olmadığını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza küçük yuvarlak hücreli tümör tanısı almış ES, Atipik ES ve ES benzeri sarkom olarak yorumlanmış 40 hasta dahil edildi. Doku mikroarray yöntemi (DMA) ile hazırlanmış parafin bloklardan alınan kesitlerde ayrılma FISH yöntemi ile *EWSR1* ve *CIC* gen rearanjmanları araştırıldı ve siklin E1 antikoru ile boyandı. Siklin E1 ekspresyon şiddetine göre gruplanarak klinikopatolojik verilerle karşılaştırıldı.

Bulgular: FISH çalışmasında 40 olgunun 5'i CIC (+), 22'si EWSR1 (+) ve 13'ü EWSR1 (-) / CIC (-) olarak değerlendirildi. Her üç tanı grubu arasında CRS ve EWSR1 (-) / CIC (-) olgu grubunda siklin E1 ekspresyon düzeyi, EWSR1 (+) olgulara göre daha yüksekti ($p<0.001$). 5 CRS olgusunun 4'ünde yüksek siklin E1 ekspresyonu gördük. Ayrıca siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan olgularda, ortalama tanı yaşı, atipi, miksoid stroma, düşük CD99 ekspresyonu ve tanı anında metastaz varlığının görülme sıklığı anlamlı olarak daha yüksekti. Yüksek siklin E1 ekspresyon düzeyinin EWSR1 (-) olguları saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %66,67 ve %95,45 idi. Ancak siklin E1 ekspresyon düzeyi ve sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptamadık.

Sonuçlar: Çalışmamız bu konudaki ilk çalışma olup, *EWSR1* gen rearanjmanı görülmeyen sarkomlarda, *EWSR1* gen rearanjmanı görülen sarkomlara göre siklin E1 ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı oranda olması ve siklin E1 ekspresyon düzeyinin klinikopatolojik verilerle ilişkisi düşünüldüğünde, tanı ve tedavide yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz. Olgu sayımızın azlığı nedeni ile daha geniş vaka serilerinin yer aldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Küçük Yuvarlak Hücreli Sarkomlar, CIC-rearanjman sarkom, Siklin E1, Ewing Sarkomu, *EWSR1* gen rearanjmanı

THE IMPORTANCE OF CYCLIN-E1 EXPRESSION IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CIC-REARRANGEMENT SARCOMAS AND EWING SARCOMAS, ITS RELATIONSHIP WITH CLINICAL, HISTOMORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS

ABSTRACT

Aim: CIC rearrangement sarcomas (CRS) are high grade sarcomas in the group of small round cell tumors that do not contain *EWSR1* gene rearrangement. CRS, which was described as Ewing-like sarcoma before the World Health Organization (WHO) 2020 classification, is now examined under a separate title in the current WHO classification; since they show more aggressive clinical and pathological features compared to Ewing's Sarcoma (ES). There is an experimental study showing that the increase in cyclin E1 gene expression is associated with tumor growth in CIC::DUX4 tumors, which is the most common gene rearrangement in CRSs. In addition, immunohistochemical high expression of cyclin E1 has been shown to be a poor prognostic factor in tumors such as osteosarcoma and chordoma.

In our study, we aimed to determine whether the immunohistochemical cyclin E1 expression level is correlated with clinicopathological features in small round cell tumors, especially in CIC-rearrangement tumors.

Materials and Methods: Forty patients diagnosed as small round cell tumor with a comment as ES, atypical ES and ES-like sarcoma were included in our study. *EWSR1* and *CIC* gene rearrangements were investigated by FISH method in sections taken from paraffin blocks prepared by tissue microarray method (TMA) and stained with Cyclin E1 antibody. They were grouped according to the level of cyclin E1 expression intensity and compared with clinicopathological data.

Results: According to the FISH, 40 cases were distributed as 5 CIC (+), 22 EWSR1 (+), and 13 EWSR1 (-) / CIC (-). Among all three diagnostic groups, we found cyclin E1 expression level to be higher in CRS and EWSR1 (-) / CIC (-) case groups compared to EWSR1 (+) cases ($p<0.001$). We observed high cyclin E1 expression in 4 of 5 cases. In addition, the mean age at diagnosis, atypia in histological findings,

myxoid stroma, low CD99 expression, and presence of metastasis at diagnosis were significantly higher in cases with high cyclin E1 expression levels. The sensitivity and specificity of high expression level of Cyclin E1 in detecting EWSR1 (-) cases was 66.67% and 95.45% respectively. However, we did not find a statistically significant correlation between cyclin E1 expression level and survival.

Conclusion: In this unique study on this subject, considering higher expression level of cyclin E1 in sarcomas without *EWSR1* gene rearrangement than sarcomas with *EWSR1* gene rearrangement and the relationship between cyclin E1 expression level and clinicopathologic data, cyclin E1 levels can guide the diagnosis and treatment. Due to the small number of our cases, studies with larger case series are needed.

Keywords: Small Round Cell Sarcomas, CIC-rearrangement sarcoma, Cyclin E1, Ewing Sarcoma, *EWSR1* gene rearrangement

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. GİRİŞ

Küçük yuvarlak hücreli tümör ailesi geniş geniş bir yelpazeye sahiptir. Ewing Sarkomu (ES) , rabdomyosarkom, desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör, küçük hücreli osteosarkom, küçük hücreli karsinom, nöroblastom ve mezenkimal kondrosarkom bu grup içerisinde yer alan tümörlerdir. Bu gruptaki tümörler belirli genetik mutasyonlara sahip olmaları ve klinik özelliklerindeki farklılık sebebi ile birbirlerinde ayırımı son derece önemlidir (1).

Dünya Sağlık Örgütü'nün yeni sınıflamasından önce ES ailesi tümörleri 3 gruba ayrılırdı. Histolojik olarak bu gruplar klasik ES, primitif nöroektodermal tümör (PNET) ve atipik ES olarak sınıflanmaktaydı (2). 2020 yılında yayımlanan DSÖ'nün yeni sınıflama sisteminde kemik ve yumuşak dokunun farklılaşması belirsiz küçük yuvarlak hücreli tümörleri 4 grupta toplanmıştır (3):

1.ES,
2."EWSR1:: ETS-dışı" füzyonunu içeren yuvarlak hücreli sarkomlar,
3.CIC-rearranjman sarkomlar (CRS),
4.BCOR genetik değişikliği içeren sarkomlar.

ES için karakteristik olan *EWSR1* veya *FUS* gen aranjmanları göstermeyen ve çok daha agresif seyirli yuvarlak hücreli tümörler, andiferansiye ya da sınıflandırılamayan yuvarlak hücreli tümörler olarak yıllarca adlandırılmıştır. Yakın geçmişte moleküler çalışmalardaki ilerlemeler ile bu grupta yer alan tümörlere ait spesifik genetik değişiklikler saptanmıştır (4).

ES en sık 1. ve 2. dekatta görülür. Çoğunlukla uzun kemiklerin diyafizinde ya da metafiz-diyafiz geçişinde görülmekle birlikte pelvis ve kaburgalarda da görülebilmektedir. Yumuşak doku tutulumu olguların %15'inden azında görülmektedir (5). ES, FET gen ailesinde ve ETS gen ailesinde yer alan genlerin

füzyonu sonucu oluşur. En sık görülen füzyonu, ETS gen ailesinden *EWSR1* geni ile FET gen ailesindeki *FLI1* geni ile oluşan *EWSR1::FLI1* füzyonudur [t(11;22)(q24;q12)] (6). Histopatolojik olarak monoton görünümde yuvarlak/oval nükleuslu, ince kromatinli, çoğunlukla dar eozinofilik/şeffaf sitoplazmalı hücrelerden oluşur (7).

EWSR1 gen rearranjmanı içermeyen farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücreli sarkomların yaklaşık 2/3'ünü CRS'nin oluşturduğu saptanmıştır (8). CRS'nin yaklaşık %95'inde ikinci genin *DUX4* olduğu tespit edilmektedir. İkinci sıklıkta *FOXO4* geni yer alırken, *LEUTX, NUTM1* ve *NUTM2A* genleri ise daha nadirdir (4). Geniş bir yaş aralığında görülmesine rağmen olguların büyük bir çoğunluğu 3-4. dekatta görülür. Sıklıkla ekstremitelerin ve gövdenin yumuşak dokusunda yerleşimlidir. Histopatolojik olarak ES'ye benzemekle birlikte atipinin daha belirgin olması ve olguların bir kısmında miksoid stroma görülmesi önemli özelliklerindendir. Agresif klinik gidiş ile karakterlidir. Tedavisi ES'ye benzerdir; ancak tedaviye yanıt iyi değildir (9-10).

Siklin E1, CDK2 (Cyclin Dependent Kinase 2) proteini ile hücre siklusunun G1/S fazının geçişinden sorumludur. Siklin E1 aktivitesinin düzenlenmesindeki bozukluklar ve artmış siklin E1 ekspresyonu; replikasyon stresi, kromozomal ve genomik instabiliteye yol açarak bir çok organda tümör gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (11). Okimoto ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada, CIC::DUX4 sarkomlarda artmış siklin E1 aktivitesinin tümöral gelişimde rol oynadığını ve siklin E1/CDK2 aksını hedefleyen tedavilerin CIC-rearranjman sarkomlarda etkili bir seçenek olabileceğini öne sürmüşlerdir (12).

1.2. AMAÇ

Bu çalışmada küçük yuvarlak hücreli sarkomlarda (ES ve CRS), siklin E1 proteininin immünohistokimyasal ekspresyonun sıklığı ve şiddetinin saptanması ve klinikopatolojik verilerle ilişkisini saptamak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EWİNG SARKOMU

2.1.1. Tarihçe

Lücke'nin yuvarlak hücreli tümör grubunu ilk tarif eden kişi olduğu öne sürülmekle birlikte; 1918 yılında Stout ve arkadaşları, ulnar sinirden köken alan farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücreli tümörü raporlamışlardır. Rozet formasyonunun izlendiği bu tümöre Nöroepitelyoma adını vermiştir (6). Kemikte görülen ilk ES olgusu 1921 yılında James Ewing tarafından Diffüz Endotelyoma olarak raporlamıştır (13). 1984 yılında Jaffe ve arkadaşlarının sunduğu olgu serilerinde klasik ES morfolojisi yanı sıra rozet benzeri yapılanmalar ile karakterli morfolojiye sahip ilk PNET kavramını tanımlamışlardır (14).

2.1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

ES, çocukluk çağında ve genç erişkinlerde kemiğin en sık görülen ikinci malign tümörüdür. Olguların çoğunluğu ilk 20 yılda görülmektedir ve en sık 2.dekatta izlenir. Erkeklerde kadınlardan daha sık olarak görülür (E: K=1.4:1). Beyaz ırkta daha sık karşılaşılan ES, Afrikalılarda daha nadirdir. 30 yaşından sonra görülmesi daha nadirdir ve görüldüğü zaman sıklıkla yumuşak doku yerleşimi izlenir. Olguların çoğu sporadiktir (3, 15).

2.1.3. Yerleşim Yeri

ES en sık uzun kemikler, pelvis ve kostalarda görülmektedir. Bu anatomik lokalizasyonlar dışında vücutta herhangi bir kemikte görülebilmekle birlikte %20-30 oranında kemik dışı lokalizasyonlarda da bildirilmiştir (3, 16). Kemik dışında en sık uyluk, kalça, üst ekstremite ve omuzda derin yumuşak dokularda ve retroperitonda yerleşimli olgular bildirilmiştir (6, 7).

2.1.4. Klinik Bulgular

ES, hızlı büyüyen ve genellikle 5-10 cm uzun çaplı kitlelerdir. Çoğunlukla derin yerleşimlidirler, nadiren yüzeyel yerleşimli tümörler bildirilmiştir (7). Ağrı, yumuşak doku şişliği, hiperemi ve venöz dilatasyon semptomları görülür. Lokal yayılım ya da metastazlarında nörolojik bulgular ve patolojik kırıklar gözlenmektedir. Periferik kanda anemi, lokösitoz ile sedimentasyon hızı, C-reaktif protein (CRP), alkalen fosfotaz (ALP) ve laktat dehidrogenazda (LDH) artış görülür. Periferik kan tablosu osteomyelit gibi başka inflamatuar hastalıklarda da benzer şekilde görülebilmektedir. Spesifik olmamakla birlikte LDH düzeyinin artması kötü prognoza işarettir (6).

2.1.5. Radyolojik Özellikler

ES uzun kemikler, pelvis ve kostaların diyafizinde veya epifizinde yerleşim göstermektedir. Litik paternde infiltrasyon göstermesi; soğan-zarı ve Codman üçgeni gibi periost reaksiyonu paternlerinin bir arada görülebilmesi sebebi ile ayırıcı tanıda osteosarkom da akla gelmelidir. Çoğunlukla intramedüller yerleşim izlenmektedir. Korteks yerleşiminin olduğu olgularda ise tekrarlayan periost reaksiyonlarına bağlı olarak görülen soğan zarı görünümü oldukça karakteristiktir. Yassı kemik tutulumlarında ise infiltratif ve sklerotik patern birlikte görülmektedir. ES olgularında kemiği aşarak yumuşak doku infiltrasyonu görülmesi ise sık görülen bir durumdur (2).

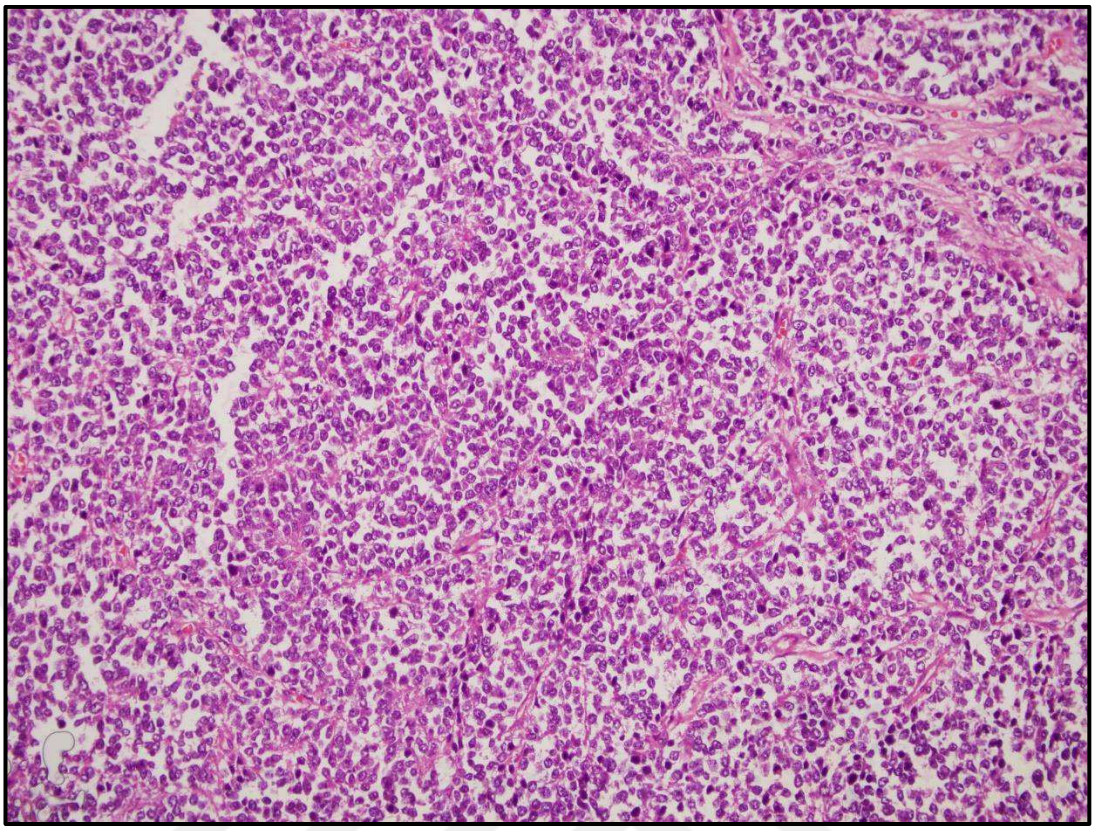
2.1.6. Makroskopi

Genellikle 10 cm'i aşmayan, multilobüle, yumuşak ve frajil kıvamlı, kesi yüzü gri-sarı ya da krem-sarı renkli solid lezyonlardır. Çoğunlukla nekroz ve kanama alanları içerir, kistik oluşumlar ya da ossifikasyon alanları görülebilir (7).

2.1.7. Histopatoloji

ES'in mikroskopik görüntüleri tarihsel olarak üçe ayrılmaktadır. DSÖ ve "College of American Pathologist" (CAP)'in revize edilmiş son kemik ve yumuşak doku tümörlerinin raporlanmasında tanı kısmına sadece ES yazılmasının yeterli olduğu alt tipin belirtilmesine gerek olmadığı görülmektedir (3, 17–20).

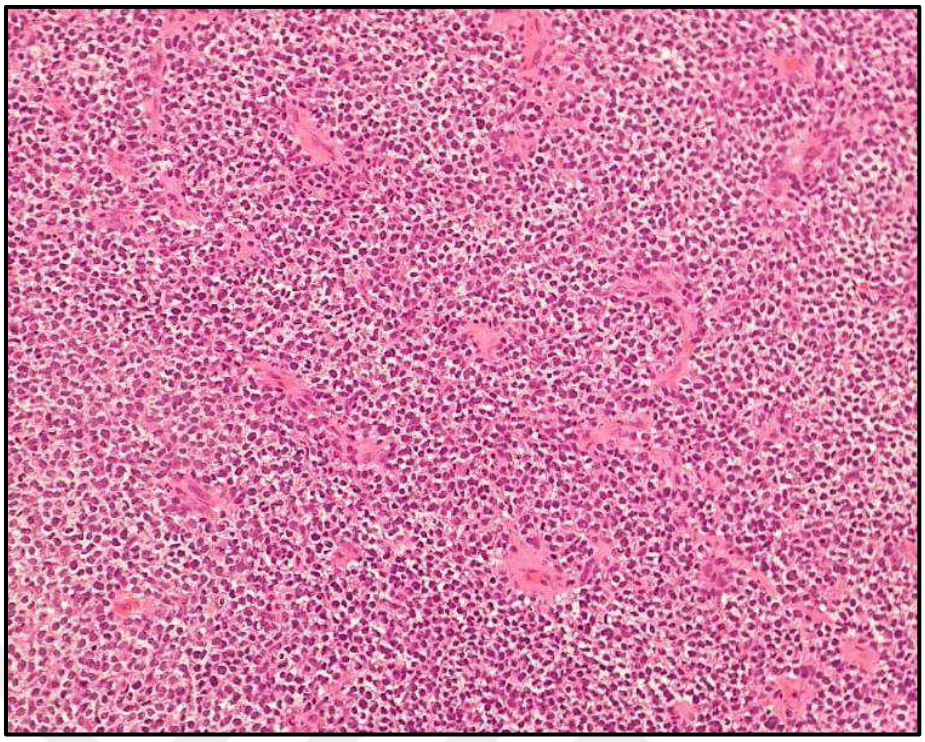
Klasik ES kollajenöz bantlarla ayrılmış düzensiz lobüller şeklinde gelişim göstermektedir (21). Monoton görünümde, küçük yuvarlak yer yer oval nükleuslu, çoğunlukla dar belirsiz soluk eozinofilik sitoplazmaya sahip hücrelerden oluşur. Bazı olgularda intrasitoplazmik glikojen varlığı nedeni sitoplazma vakuole görünümdedir. Kromatin ince fibriler özelliktedir ve nükleolleri belirsizdir. Mitotik aktivite 10 BBA'da (büyük büyütme alanı) 2-3 adet olacak şekilde düşük olarak izlenir. Nekroz ise özellikle neoadjuvan kemoterapi almış olan olgularda daha belirgin olmak üzere değişik oranlarda görülebilir ve zonal paternde izlenebilir (2, 7). Bazı olgularda ise interstisyel sıvı ya da kan dolu boşluklar çevresinde dizilim göstererek psödovasküler veya psödoalveolar patern gösterebilir (7). Işık mikroskobisinde izlenen az sayıda koyu hücrenin apoptoza giden hücreler olduğu düşünülmektedir (22).



Şekil 1. Bir ES olgusunda klasik morfoloji (Hematoksilen&Eozin, x200).

Monoton görünümde, sitoplazmaları seçilemeyen küçük yuvarlak nükleuslu hücreler izlenmektedir. Aralarda koyu renkli hücreler dikkati çekmektedir.

ES olgularında sıklıkla görmeyi beklediğimiz klasik histopatolojinin yanı sıra iri nükleuslu, belirgin nükleollü, geniş şeffaf ya da soluk eozinofilik sitoplazmalı, düzensiz sınırlı hücrelerden oluşan atipik morfolojiye sahip alanlar içerebilir. Sitoplazmik görünüm epiteloid, rabdoid veya hipernefroid görünümlere kadar değişebilir. Eskiden atipik ES olarak tanımlanan bu görünümü diğer andiferansiye yuvarlak hücreli sarkomlardan ayırmak için tanıda moleküler yöntemler gerekebilir (2-3).



Şekil 2. Klasik morfoloji gösteren bir ES olgusu (Hematoksilen&Eozin, x200).

Atipik morfolojik bulguları içeren ES olguları, klasik morfolojik bulguları gösteren ES olguları ile karşılaştırıldığında immünohistokimyasal profilde farklılık olmadığı izlenmiştir. Önceden bu grup içerisinde yer alan bazı olgular ise saptanan spesifik moleküler rearranjman sebebi ile DSÖ'nün güncel baskısında CIC-rearranjman sarkomlar adı altında incelenmiştir (4).

ES olgularının bir kısmında santralinde nörofil olarak adlandırılan fibriler kor etrafında dizilim gösteren rozet benzeri formasyonlar izlenir. DSÖ'nün güncel baskısından önce Homer Wright rozetleri olarak adlandırılan rozet benzeri yapılanmaları içeren tümörler PNET olarak adlandırılmaktaydı (2-3, 23). Ancak DSÖ'nün son sınıflamasında PNET ismi sınıflamadan çıkarılmıştır (3).

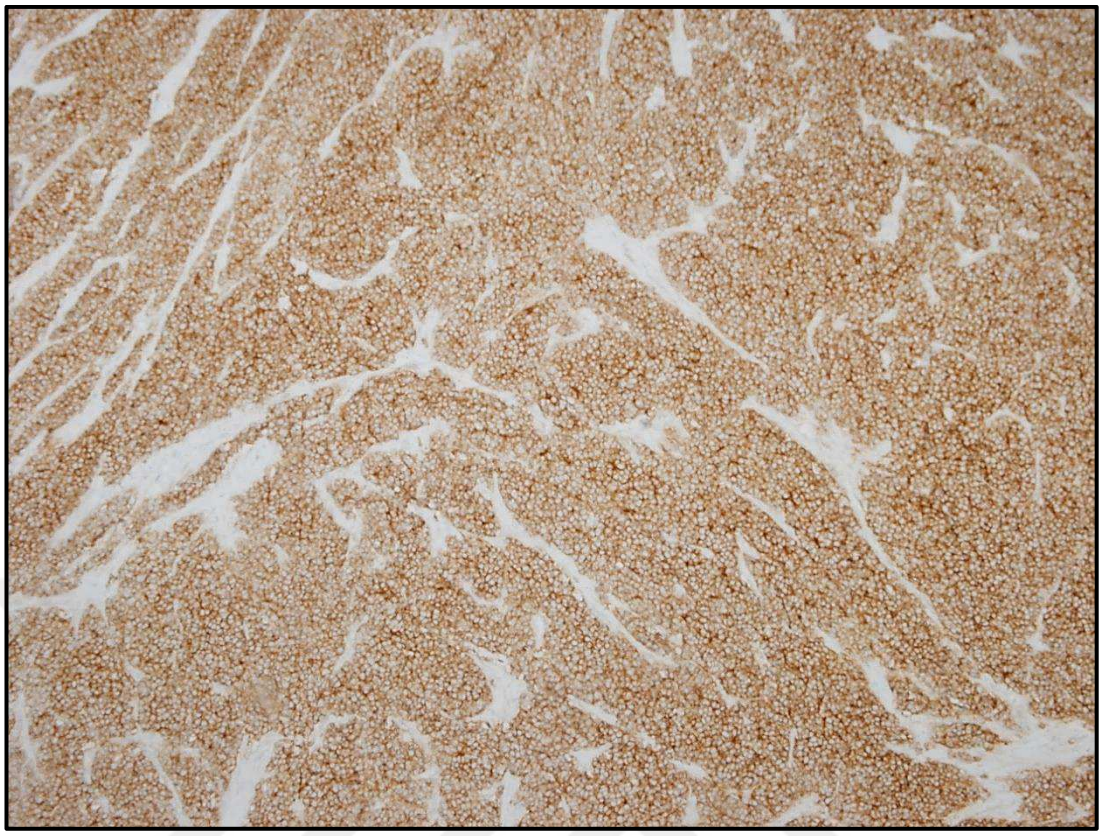
ES'nin nadir görülen varyantları arasında, santralinde eritrosit kümelerinin ve plazma sıvısının bulunduğu, gerçek vasküler yapıların izlenmediği tümör adaları ile karakterli hemanjioendotelial patern bunlardan biridir. Belirgin sklerotik stroma ile karakterli sklerotik patern veya iğsi hücreli alanlar ile karakterli iğsi hücre patern

görülebilir (24). ES'in nadir bir varyantı olan adamantinoma benzeri ES'te, klasik morfolojinin yanı sıra; desmoplastik stromada yuvalanmalar halinde izlenen hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleollü, dar sitoplazmalı, iri bir kısmı bazoloid bir kısmı ise skuamoid morfolojide poligonal hücreler görülmektedir. Hücre adalarının periferinde palizatlanma görülür ve çok nadiren keratin incileri izlenebilir (25).

2.1.8. İmmünofenotipik Özellikler

CD99 seks kromozomlarının kısa kolunda yer alan psödootozomal bir gen olan *MIC2* geninin ürünüdür (26). CD99 vücudun çoğu hücresinde düşük düzeyde bile olsa bulunabilen transmembran proteindir. Bazı normal hücrelerde ve bazı tümörlerde yüksek düzeyde eksprese edilen bu molekülün hücre apoptozu, farklılaşması, lenfosit ve nötrofil gibi immün hücrelerin diapedezleri ve hücre içindeki protein taşınma mekanizması gibi çok sayıda önemli hücresel aktiviteyi kontrol ettiği gösterilmiştir (27).

CD99'un tümör onkogenezisinde rolü aktivasyon da ya supresyon olarak organdan organa değişebilmektedir. ES'in tümör yolağında artan CD99 ekspresyonunun nöronal farklılaşmayı baskılamada rolü olduğu görülmüştür. FLI1 (Friend of leukemia virus integration site 1) ile zıt etkiye sahip olan CD99 aynı zamanda FLI1 ekspresyonunu artırmaktadır. İkisinin birlikte eksprese olması sonucunda ise nöronal farklılaşmanın tamamen baskılanmadığı, bazı nöral belirteçlerin korunduğu gözlenmiştir (27). İki molekülün de ES hücrelerinde artış göstermesi ayırıcı tanıda kullanılmasını sağlamaktadır. Klasik ES'te CD99'un diffüz/yaygın sitoplazmik-membranöz ekspresyon göstermesi beklenir (Şekil 3). CD99'un fokal ya da yamasal ekspresyon göstermesi sık olmamakla birlikte bazı olgularda izlenebilmektedir (1-2).



Şekil 3. CD99 ile diffüz sitoplazmik-membranöz ekspresyon gösteren ES olgusu (x100).

CD99'un ES patogenezinde ve tanıda önemli yeri olmasına rağmen spesifitesi düşüktür (1-2, 27). Lenfoid hücrelerdeki fonksiyonları sebebi ile hematolojik malignitelerden akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut miyeloblastik lösemi (AML), pediyatrik B hücreli lenfoma/lösemilerde CD99 ekspresyon artışı gözlenmiştir. Ayrıca malign gliomlar, sinovial sarkom olgularının bir kısmında, mezenkimal kondrosarkom, rabdomyosarkom, timik tümörler, hemanjiperisitoma, gastrointestinal ve pulmoner nöroendokrin tümörler, sex-kord stromal tümörler ve bazı osteosarkom olgularında değişen oranda CD99 pozitifliği bildirilmiştir (27).

EWSR1::FLI1 füzyonu görülen olguların çoğunda ve *EWSR1::ERG* füzyonu görülen olguların bir kısmında yaygın nükleer FLI1 ekspresyonu görülmüştür. FLI1, endotelyal hücrelerin ve reaktif lenfositlerin yanı sıra; merkel hücreli karsinom, melanom, vasküler tümörler ve desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörlerde

eksprese olabilmektedir. Bu nedenle tek başına tanı koydurucu değeri düşüktür. CD99 ile birlikte değerlendirilmelidir (28-29).

ES olgularının tanısında kullanılan diğer immünohistokimyasal belirteç ERG antikorudur. *EWSR1::ERG* rearrranjmanlarını içeren ES olgularında ERG antikorunun yüksek sensitif ve spesifik özelliği olduğu saptanmıştır (29).

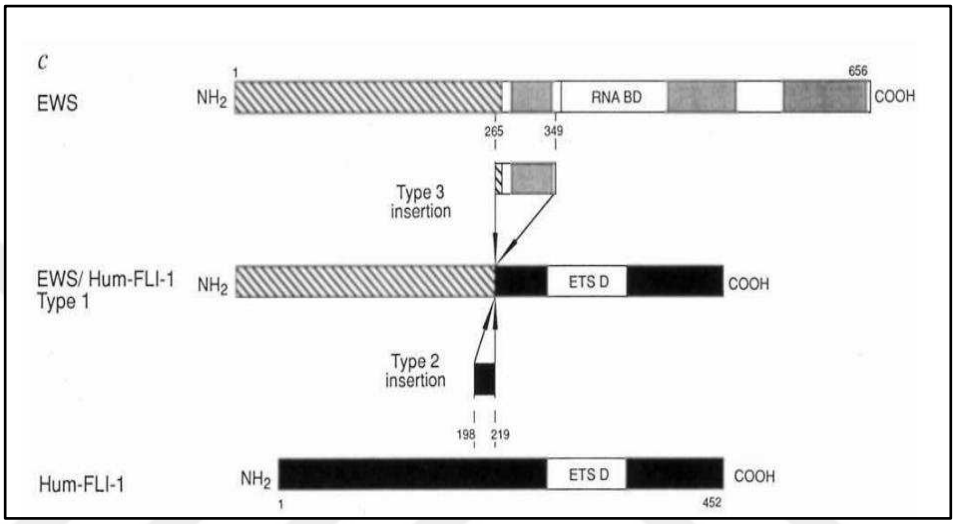
NKX2.2, ES tanısında kullanılan diğer immünohistokimyasal belirteçtir (30). *NKX2.2* geni insanda nöronal gelişimde rol oynadığı bilinmekte iken *EWSR1::FLI1* füzyonunun hedef genlerinden biri olduğu gösterilmiştir (31). Hung ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise NKX2.2 proteininin sadece *EWSR1::FLI1* translokasyonu gösteren ES olgularında değil tüm ES olgularında %93 oranında eksprese olduğunu saptamışlardır. Ayrıca yine bu çalışmada CIC::DUX4 ve BCOR rearranjman sarkomlarda ekspresyonunun oldukça düşük görülmesi ayırıcı tanıda kullanılabileceğini göstermektedir; ancak mezenkimal kondrosarkom ve olfaktör nöroblastom gibi farklı sarkom türlerinde görülen pozitiflik nedeni ile spesifitesi düşüktür (32).

ES olgularında pozitif olabilen diğer immünbelirteçler ise S100, CD57, nörofilament proteini, LMW-CK (Low molecular weight cytokeratin), nöron spesifik enolaz, Sinaptofizin, desmin ve PAX7'dir (7, 33). Adamantinoma benzeri varyantında ise CD99 ve FLI1 dışında AE1/AE3, CAM5.2, HMW-CK (High molecular weight cytokeratin), p63 ve p40 pozitiflikleri bildirilmiştir (25).

2.1.9. Moleküler Patoloji

ES olgularının büyük çoğunluğunda FET ailesi üyelerinden biri olan *EWSR1* geni ile ETS (avian Erythroblastosis virus Transforming Sequence) transkripsiyon ailesine ait genlerin füzyonu görülür (33). Olguların %85'inde *EWSR1* (Ewing sarcoma breakpoint region 1 gene) ve *FLI1* gen füzyonu t(11;22) (q24;q12) görülmektedir (3). *EWSR1::FLI1* füzyonunda, 22. kromozomda yer alan *EWSR1* geninin 3' ucunda yer alan RNA bağlayıcı bölge, 11. kromozomda yer alan *FLI1*

geninin 3’ ucunda bulunan ETS-bağlayıcı bölgesi ile yer değiştirir. En sık görülen füzyon proteinine ek ilk tanımlandığında *EWSR1* geninin kodladığı 84 aminoasitin ve *FLI-1* geninin kodladığı 22 aminoasitin eklenmesi ile oluşan iki ayrı füzyon proteini de saptanmıştır (Şekil 4) (34-35). Oluşan füzyon proteini DNA üzerine bağlanarak aberan bir transkripsiyon faktörü olarak etki gösterir. Kanser oluşumunda rolü olan genleri düzenler (36).

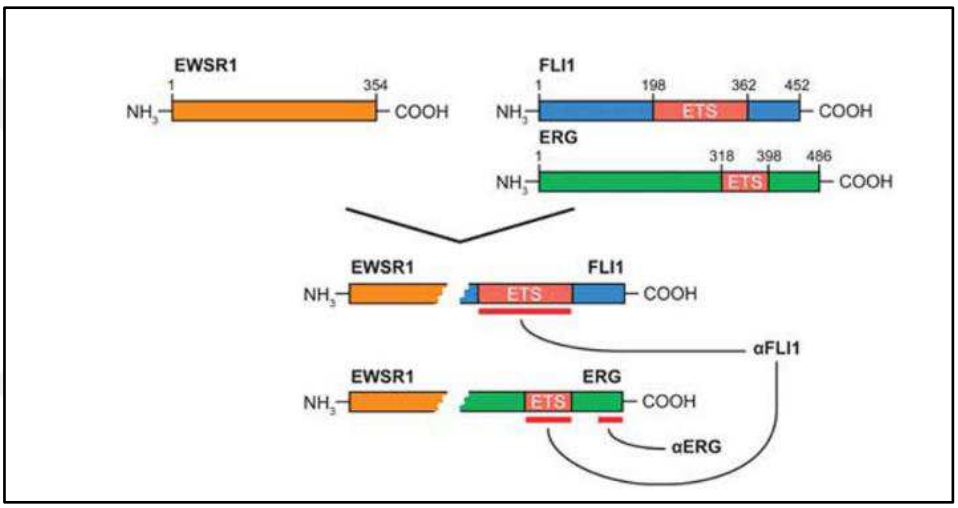


Şekil 4. *EWSR1::FLI1* gen rearanjmanının basit şematik görünümü (34).

EWSR1::FLI1 füzyonu sonucu oluşan 18 farklı kimerik transkript bildirilmiştir. Tek bir RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) yöntemi ile tüm kimerik proteinler saptanamayacağı için çok sayıda çalışma yapılması gereklidir. RT-PCR tekniklerinden aynı zamanda elde edilen proteinlerin kalitesi fiksasyon ve arşiv süresi ile ilişkili olduğu için daha yaygın olarak kullanılan yöntem FISH ile translokasyonun tespit edilmesidir (36). Ancak ayrılma FISH yönteminin de yanlış negatifliklerinin bulunmasının yanı sıra ES dışında da yumuşak doku tümörlerinde görülmesi nedeni ile tek başına EWSR1 probu füzyon partnerini göstermediği için yeterli olmayabilir (37).

Alternatif füzyon partnerleri *EWSR1* ya da yine FET ailesi üyelerinden olan *FUS* geni ile ETS ailesinin diğer üyeleridir. ETS ailesi üyelerinden olan *ERG, ETV1, ETV4* ve *FEV1* genleri arasında *ERG* rearranjmanı ek sık görülür (33). Olguların

%10'unda ise *EWSR1::ERG* füzyonunu oluşturan t(21,22) (q22;q12) transloklasyonu saptanmıştır (3). ETS transkripsiyon faktörleri ailesinde yer alan *ERG* geni, 21. kromozomun uzun kolunda yer alır (21q22). Protein ürünü ise %68 oranında *FLI1* ile benzer aminoasit sekansı içerir. *EWSR::FLI1* transloklasyonuna benzer şekilde, *EWSR1::ERG* transloklasyonu sonucu üretilen proteinde karboksi ucunda *EWSR1* geni ile 3' amino ucunda *ERG* geninden gelen DNA bağlayıcı bölge bulunmaktadır (38). *EWSR1::ERG* translokasyonu sonrası gösterilmiş olan 5 farklı kimerik transkript bulunmakla birlikte *EWSR1::FLI1* ve *EWSR1::ERG* füzyonları arasında klinik fenotip olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (39).



Şekil 5. *EWSR1::FLI1* ve *EWSR1::ERG* gen rearanjmanlarının basitleştirilmiş şeması (29).

2.1.10. Prognoz ve Tedavi

Tanı anında hastaların %25'inde metastaz bildirilmiştir. En sık metastatik odaklar akciğer, kemik ve kemik iliğidir. Kötü prognostik faktörlerin başında metastaz yer alırken; tümör hacmi, LDH düzeyi, aksiyal lokalizasyon, hastanın 15 yaşından büyük olması, neoadjuvan tedaviye kötü yanıt ve cerrahi eksizyonun yetersiz olması diğer faktörlerdir. Çok sayıda kemik metastazı olması akciğer metastazından daha kötü prognozludur (40).

Tedavide biyopsi sonrasında çoklu ajan içeren neoadjuvan kemoterapi ilk sırada yer almaktadır. Çoklu ajan kemoterapisinde vinkristin, doksorubisin, siklofosfomid/ifosfomid ve etoposidi içeren kemoterapi protokolleri uygulanmaktadır. Kemoterapiyi lokal tedavi takip eder. Lokal tedavide ilk seçenek, kemoterapi öncesi tümörün infiltre ettiği tüm dokuları içeren cerrahi eksizyondur. Yeterli cerrahi eksizyon yapılamayacaksa radyoterapi tercih edilir. Tümör volümünün 200 ml'den büyük olması, neoadjuvan tedaviye zayıf cevap ve yetersiz cerrahi eksizyon gibi kötü prognostik faktörlerin varlığında adjuvan tedavinin lokal rekürrensi azalttığı gösterilmiştir (40).

2.2. CIC-REARANJMAN SARKOMLAR

2.2.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

CIC-rearrajman sarkomlar (CRS), 6-81 gibi geniş yaş aralığında görülebilmekle birlikte çalışmalarda ortanca yaş 25-35 olarak saptanmıştır (9-10, 41). Çalışmalarda cinsiyet dağılımı ile ilgili farklılıklar bildirilmiş olup en geniş olgu serisine sahip olan 115 olgunun yer aldığı çalışmada hafif erkek baskınlığı bildirilmiştir (10).

Etyolojide bilinen faktör yoktur (3).

2.2.2. Lokalizasyon

Sıklıkla gövdede ve ekstremitelerin derin ve yüzeyel yumuşak dokularında olmak üzere; baş/boyun, retroperiton, perine, vulva, labia, pelvis, viseral organlar, beyin ve aksiller lenf nodunda bildirilmiştir (10, 42–44). Viseral organlarda genitorüriner ve gastrointestinal sistemde baskın olarak görülürken, baş/boyun bölgesinde skalp, tonsil, parafarengeal bölge ve submandibular yerleşimli CRS olguları raporlanmıştır (10, 45). Kemik yerleşimi oldukça nadir olup en yüksek oranda görülen çalışmada %3 civarındadır (10). Uterus ve uterin serviks tutulumu ile plevral

tutulum sonrası bildirilmiş kardiyak tamponand gibi nadir olgu raporları mevcuttur (46–48).

2.2.3. Klinik Bulgular

Yavaş büyüyen ağrısız yumuşak doku kitleleridir (7). Hastaların bir kısmında metastaza bağlı semptomlar bildirilmiştir (9-10).

2.2.4. Makroskopi

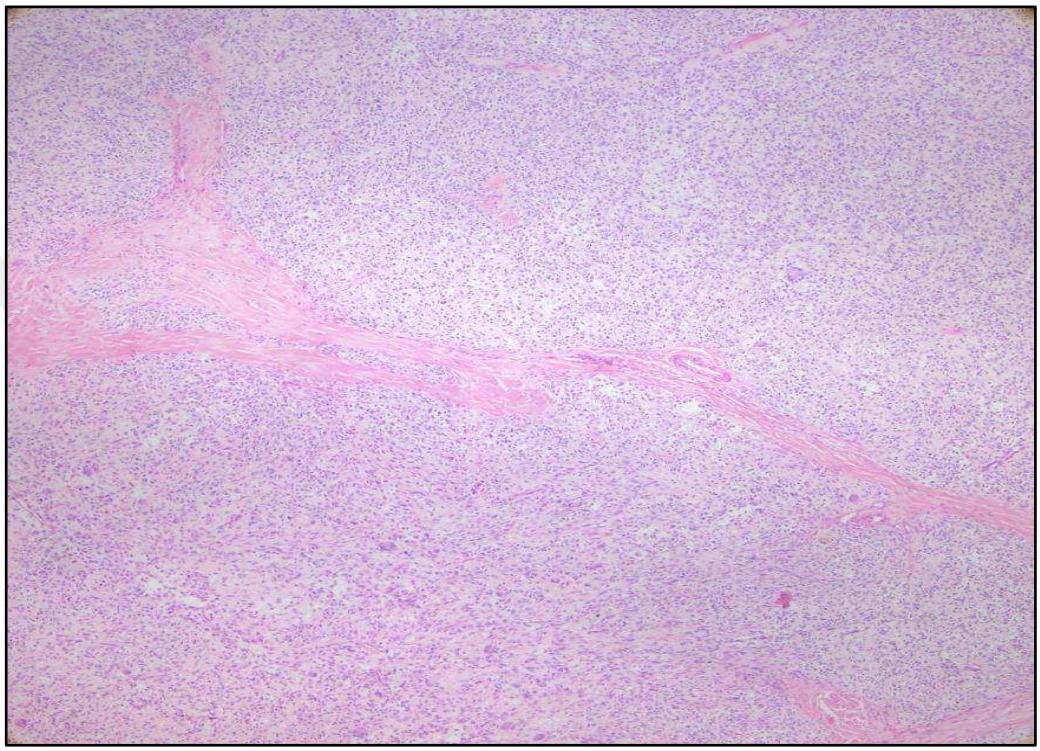
Çoğunluklu büyük çaplı (median çap 9-10 cm) ve iyi sınırlı yumuşak doku kitleleridir. Kesi yüzleri beyaz-krem renkli olup, kanama ve nekroz alanları içerirler (3, 49).

2.2.5. Histopatoloji

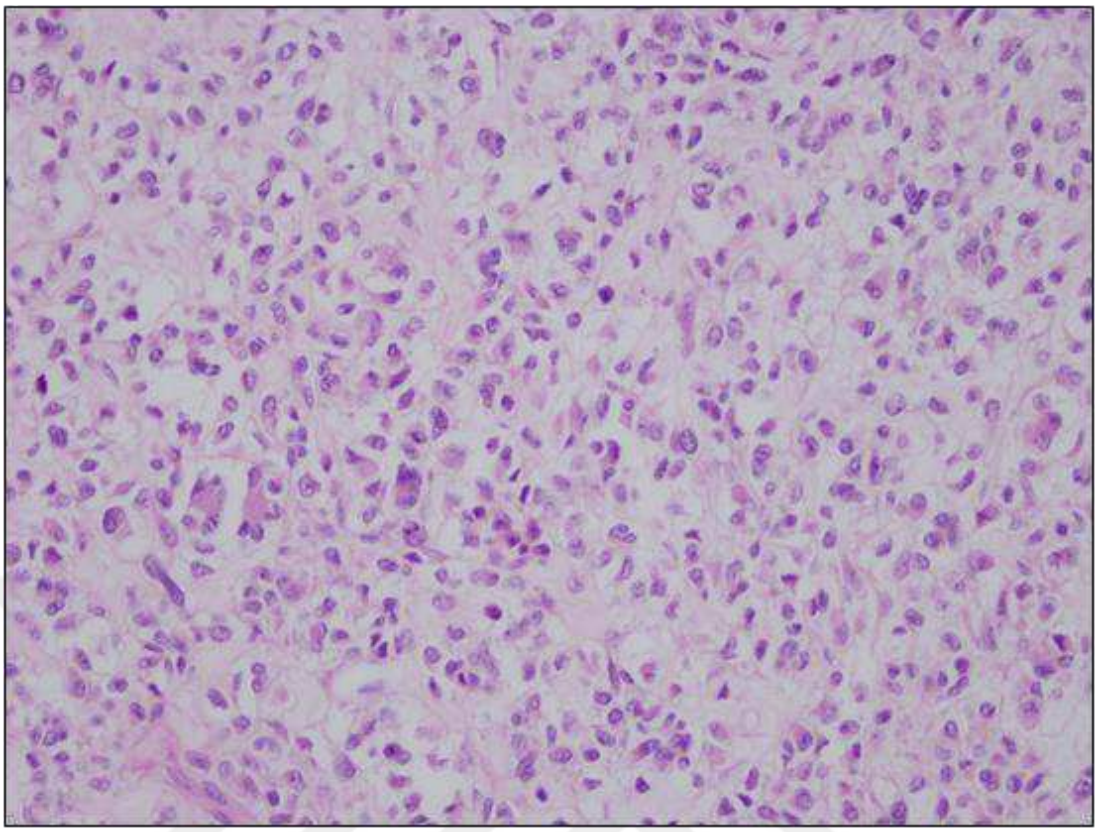
Olguların çoğu, diffüz tabakalar halinde, küçük ya da orta boyda farklılaşma göstermeyen yuvarlak/oval hücrelerden oluşmaktadır. Olguların yaklaşık 1/3'ünde kalın fibröz bantlarla ayrılan lobüler gelişim paterni dikkati çekmektedir (Şekil 6). Kısa fibröz bantlarla ayrılan tümör grupları ve retiküler gelişim paterni de görülebilmektedir. Tümör stromasında miksoid dejenerasyon izlenebilir, fokal desmoplazi ya da skleroz beklenen bulgulardandır; ancak belirgin kollajenizasyon beklenmez (9-10). CIC::FOXO4 sarkomlarda CIC::DUX4 sarkomlardan farklı olarak belirgin desmoplastik stroma vardır (50).

Hücreler çoğunlukla yuvarlak/oval morfolojide olmakla birlikte; iğsi hücreli, epiteloid, rabdoid/ plazmasitoid özellikte alanlar görülebilmektedir. Hücreler çoğunlukla dar sitoplazmalıdır, epiteloid/rabdoid morfolojideki alanlarda sitoplazmanın artığı izlenmiştir (Şekil 7). Sitoplazma soluk eozinofilik şeffaftır. Nükleer özellikleri ince kromatinli, hiperkromatik ve veziküler olabilmektedir. En azından fokal alanlarda nükleol belirginliği beklenen özelliklerindendir (Şekil 8). Monomorfik morfoloji sergilemekle birlikte ES olgularına göre pleomorfizm daha

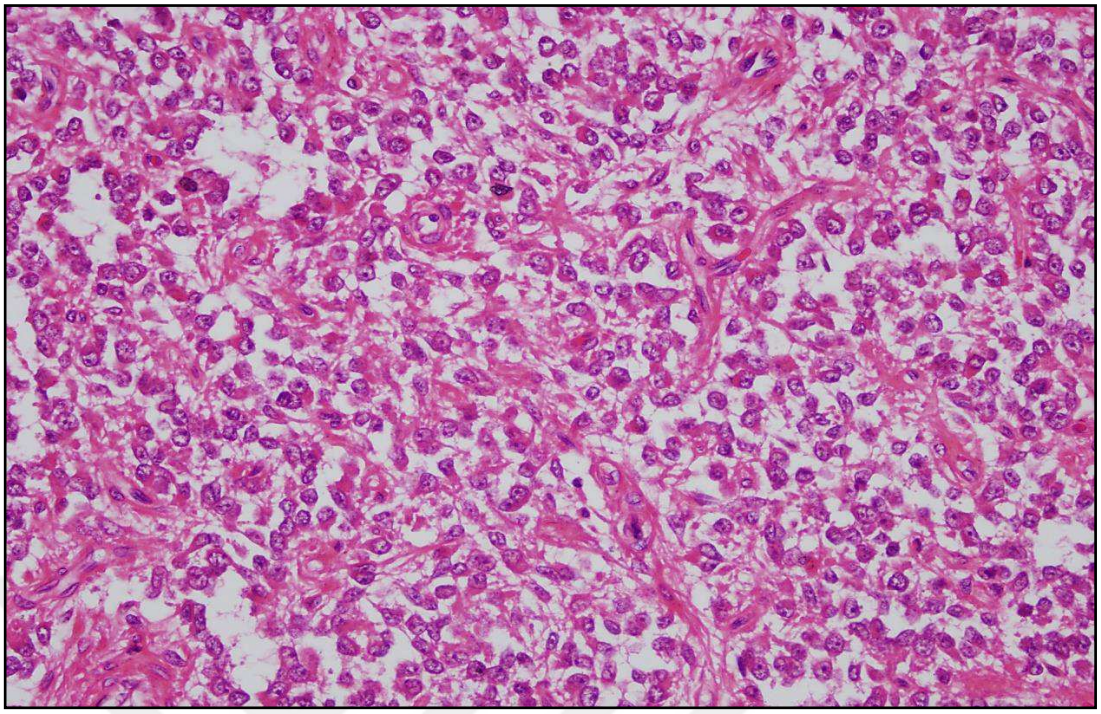
belirgindir. Çoğu tümörde geniş nekroz alanları izlenir (8–10). Mitoz ortalama 32/10 BBA olacak şekilde yüksektir (10). Tümör içi kanama odakları izlenebilir. Osteoklast benzeri dev hücreler, sitoplazmik hyalin globülleri, hemanjioperisitomatöz paternde vasküler yapılanma ve fokal hyalin kartilaj formasyonları ise nadir bildirilen morfolojik varyantlardandır (9).



Şekil 6. CIC rearanjman sarkomda lobüler gelişim paterni (Hematoksilen&Eozin, x40).



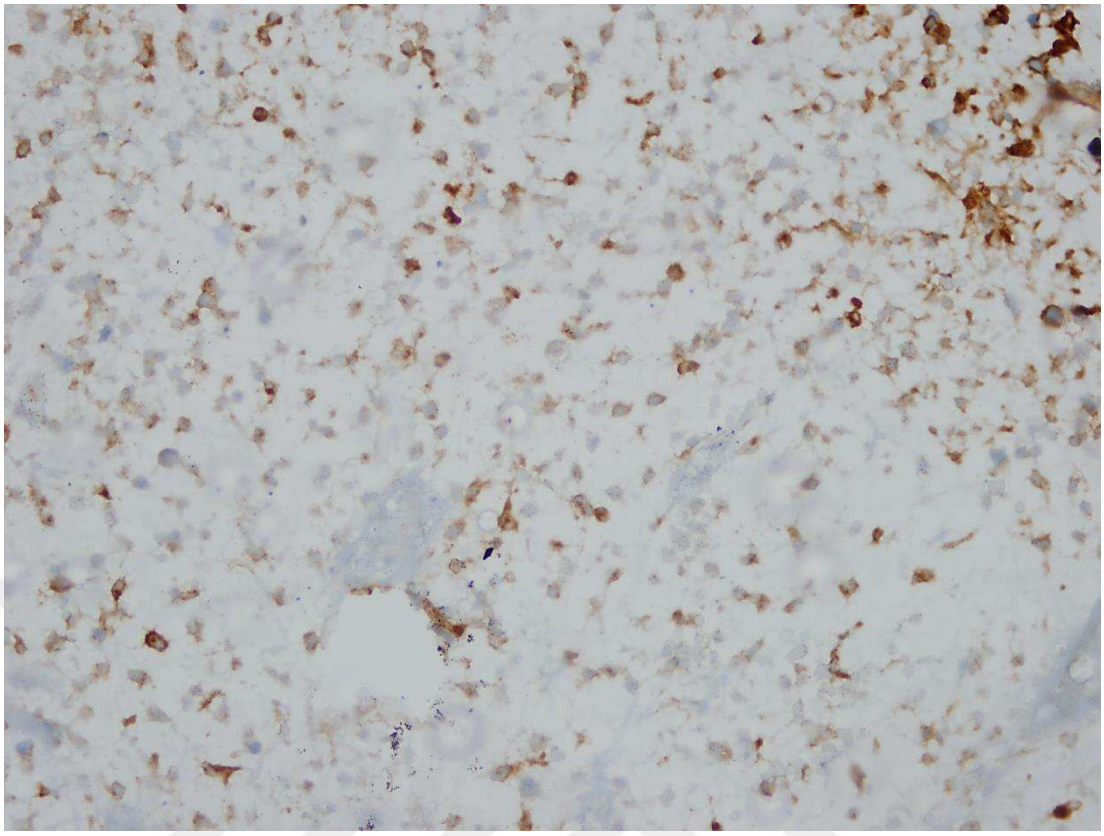
Şekil 7. CIC-rearanjman sarkomda dev hücre formasyonu ve rabdoid morfoloji (Hematoksilen&Eozin, x200).



Şekil 8. CIC rearanjman sarkom olgusunda nükleol belirginliği (Hematoksilen&Eozin, x400).

2.2.6. İmmünfenotipik Özellikler

CD99 sitoplazmik-membranöz ekspresyonu değişkendir, çoğunlukla fokal ya da yamasal izlenirken negatif olan olgular da mevcuttur (Şekil 9) (9-10). Diffüz ekspresyonu %20 civarında bildirilmiştir (10). Nükleer WT1 (C-terminal) ve nükleer ETV4 ekspresyonu CRS'yi ES'ten ayıran önemli bir özelliktir. Diffüz ETV4 ekspresyonu duyarlılığı %90 ve özgüllüğü %95 oranında bildirilmiştir. Nükleer WT1 ekspresyonunun duyarlılığı %95 ve özgüllüğü %81 olarak saptanmıştır (51). CRS'de sitoplazmik WT1 ekspresyonu görülmekle birlikte nükleer WT1 ekspresyonunun tanı koyduruculuğu daha yüksektir (9, 52). ERG, FLI1 ve Kalretinin pozitifliği görülebilir. Nadir olgularda S100, AE1/AE3 ve desmin pozitifliği bildirilmiştir (9, 52). CIC::NUTM1 sarkomlarında immünohistokimyasal NUT ekspresyonu saptanmıştır (53). NKX2.2 negatiftir (9).



Şekil 9. CRS olgusunda immünohistokimyasal CD99 ile yamasal ekspresyon paterni (x200).

Bazı tümör hücrelerinde sitoplazmik noktasal boyanma dikkati çekmektedir.

Yoshimoto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insanlarda görülen CRS'nin %70'inden fazlasında, siklin D2 ile değişken oranlarda nükleer-sitoplazmik ekspresyonu göstermişler. Olguların %80'inde ise sitoplazmik ve/veya ekstrasellüler MUC5AC ekspresyonu gözlemlemişler (54).

2.2.7. Moleküler Patoloji

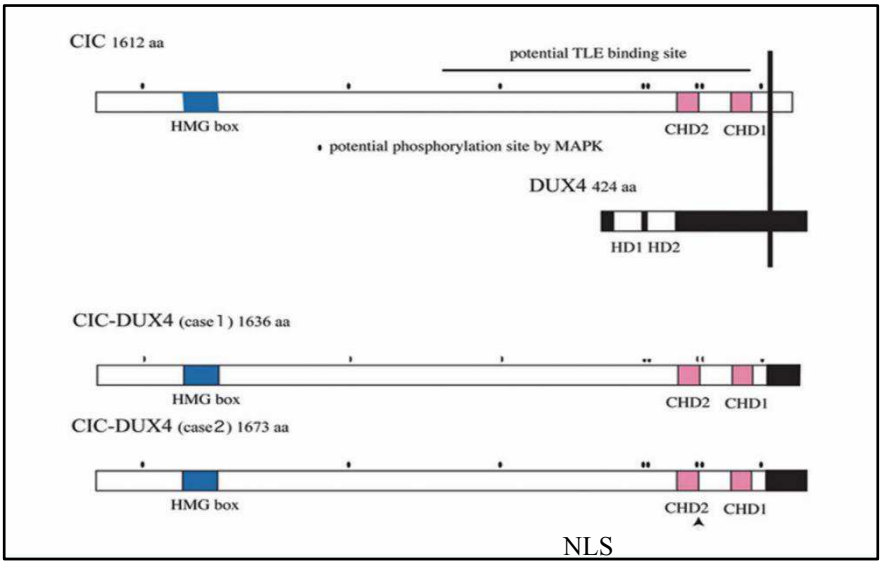
CRS'nin %95'inde 19. kromozom uzun kolunda (19q13) yerleşimli *CIC* geni ile *DUX4* geninin füzyonu sonucu oluşan *CIC::DUX4* rearranjmanı görülmektedir (55).

t(4;19)(q35;q13.1) translokasyonunu içeren ilk olgu Richkind ve arkadaşları tarafından 1996 yılında 12 yaşındaki bir çocukta ayak bileği yumuşak dokusunda saptanmıştır (56). 2006'da ise Kawamura-Saito ve arkadaşları, ES benzeri morfoloji gösteren ancak *EWSR1* gen translokasyonu içermeyen 2 hastada 19. kromozom uzun kolunda (19q13) yerleşimli *CIC* geni ve 4. kromozomun uzun kolunda (4q35) yerleşimli *DUX4* geninin füzyonunu göstermişlerdir (57). 2012 yılında *CIC::DUX4* füzyon geninin sadece t(4;19) (q35;q13)'den oluşmadığı ayrıca t(10;19)(q26;q13) translokasyonu sonucunda da oluşabildiği raporlanmıştır (8).

CIC geni Drosophila capicua gen ürünün insandaki analoğudur. *CIC* geni, transkripsiyonu baskılayan sekans spesifik HMG (Yüksek-mobility group) box proteinlerini üretir. Gelişmekte olan serebellar nöronlarda ekspresyonu ve ErbB sinyal yolağına dahil olduğu gösterilmiştir (3, 57).

DUX4 geni ise 4. ve 10. kromozomlarda subtelomerik yerleşim gösteren 3.3 kb uzunluğunda D4Z4 makrosatellit tekrar bölgesinde bulunan ve ikili homeodomain bölgesi (DNA bağlanma bölgesi) içeren gendir (57). Normalde insanda testisteki germ hücrelerinde bulunan *DUX4* geni Cpg adalarının metilasyonu ile susturulmuştur (58).

CIC ve *DUX4* genlerinin füzyonunda CIC geninin büyük bir kısmının korunduğu görülürken; *DUX4* geninin N terminalinde yer alan homeodomain bölgeleri de dahil büyük bir kısmı kaybolur. *CIC* geninde korunan kısımlar; HMB box, TLE proteinlerinin bağlandığı bölge ve MAPK fosforilasyon bölgeleridir (Şekil 10) (57).



Şekil 10. CIC::DUX4 sarkomda gen rearanjmanının basitleştirilmiş şematik görünümü (57). (CHD:Capicua Homeodomain; NLS: Nükleer lokalizasyon sinyali, MAPK fosforilasyon bölgeleri noktalarla belirtilmiştir).

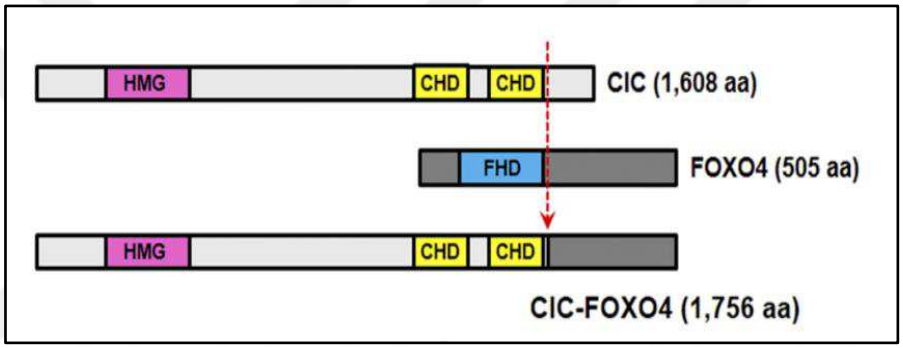
CIC::DUX4 sarkomlarda regülasyonu artan genler arasında CRF (Corticotrophin releasing hormone), VGF (VGF nerve growth factor inducible), ETS transkripsiyon faktörlerinden *PEA3* gen ailesi üyeleri (*ETV4, ETV1 ve ETV5*), Siklin D2, MUC5AC ve sarkom gelişiminde rolü olan *ZIC1, HEY1* ve WT1 genleri gösterilmiştir (54-55).

CIC::DUX4 sarkomda saptanmış olan bir diğer genetik değişiklik ise trizomi 8'dir. Bu olgularda 8. Kromozom üzerinde bulunan *MYC* geninde amplifikasyon ve immünohistokimyasal MYC ekspresyonu gözlenmiştir. *MYC* geninin hedeflerinden biri olan p21 proteinin ES olgularına göre yüksek oranda eksprese olduğu saptanmıştır (59).

CIC geni transkripsiyon baskılayıcı gen iken CIC::DUX4 sarkomların tümörogenezde rolü olan çok sayıda geni aktive etmelerinin arkasında DUX4 proteininin karboksi terminalinde yer alan aktivatör alanından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (57). Ancak olguların bir kısmında, *CIC::DUX4* füzyonunda kırılma noktasından sonra sonlanma kodonunun gelmesi nedeni ile transkript proteininde *DUX4* geni sekansının bulunmadığı gösterilmiştir. Bu olgularda PEA3 ailesi

üyelerinden ETV1/ETV4/ETV5 proteinlerinin ekspresyonlarının artması CIC proteininin onkogenezde yeterli olabileceğini düşündürmüştür (60).

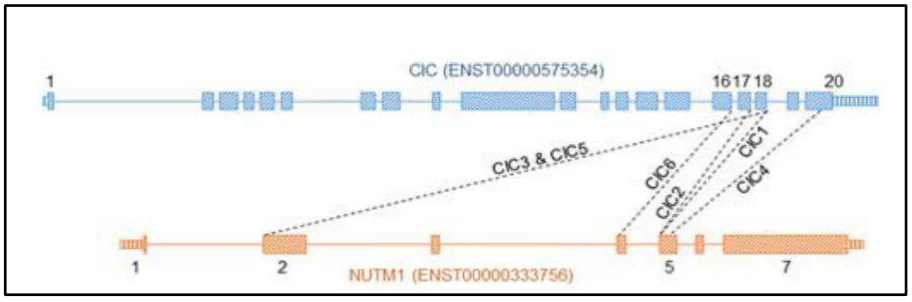
CIC geninin *DUX4* dışında *FOXO4, LEUTX, NUTM1* ve *NTM2A* ile bildirilen nadir füzyon partnerleri bulunmaktadır (50, 53, 61-62). *FOXO4*, X kromozomu üzerinde bulunan forkhead gen ailesi olarak adlandırılan transkripsiyon faktör ailesinin üyesidir. *CIC::FOXO4* füzyonlarında *CIC* ekzon 19 ve *FOXO4* ekzon 2 füzyonları görülür. *CIC::DUX4*'e benzer şekilde *CIC* geninin HMG box kısmı ve Capicua homeodomain kısmını da içeren büyük bir kısmı korunmuş olarak izlenmektedir (Şekil 11) (50).



Şekil 11. *CIC::FOXO4* rearanjmanının [t(X;19)(q13;q13.3)] basitleştirilmiş şematik görünümü (CHD: Capicua homedomain, FHD: Forkhead homedomain) (50).

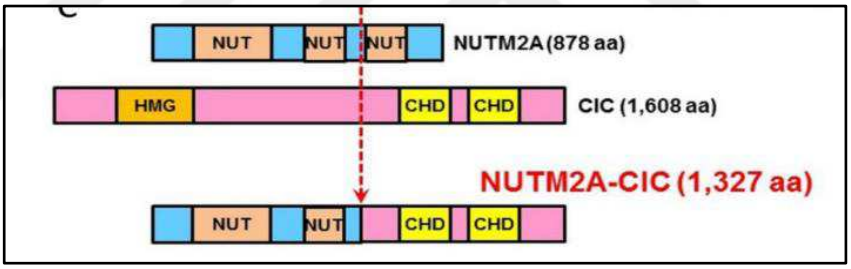
Anjiosarkom olgularında yapılan bir çalışmada, *CIC-LEUTX* füzyon geni saptanmıştır. *CIC* ve *LEUTX* genlerinin her iki de 19. kromozomun kısa kolunda yer alır ve aralarında 2.5 Mb uzaklık bulunmaktadır. Bu füzyonda *CIC* geni ekzon 20 ve *LEUTX* geni ekzon 3 bölgelerinden birleşir (61).

CIC geninin bir diğer füzyon partneri ise 15. kromozomun uzun kolunda yer alan (15q14) *NUTM1* (NUT midline carcinoma family member 1) genidir. *NUT* geni normalde orta hatta bulunan andiferansiye epitelyal karsinomlarda tarif edilmişken *CIC::NUTM1* füzyonunda bu özellik görülmemiştir. *CIC* ve *NUTM1* genlerinin füzyonları farklı kırılma noktalarında olabilmektedir (Şekil 12) (53).



Şekil 12. *CIC::NUTM1* gen rearanjmanında olası kırılma noktaları (53).

10. kromozomda yer alan (10q23) *NUTM2A* geni ekzon 7 hizasından ve *CIC* geni ekzon 12 hizasında füzyona uğraması ile *NUTM2A::CIC* füzyonu gösterilmiştir. *NUTM2A* daha önce ait yüksek dereceli uterin endometrial stromal sarkomlarda tanımlanmış olan *NUT* gen ailesinin üyesidir. Bildirilmiş olan olgu raporunda bir çok klinik özelliğinin *CIC::DUX4* füzyonu sarkomları ile benzer olduğu raporlanmıştır (62).



Şekil 13. *NUTM2A::CIC* gen rearanjmanının şematik görünümü (CHD: Capicua homedomain) (62).

2.2.8. Prognoz ve Tedavi

Çoğu tümör agresif gidişlidir ve tanı anında sıklıkla metastaz bildirilmiştir. Antonescu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada 57 hastada 2 yıllık ortalama sağ kalımı %53 ve 5 yıllık ortalama sağ kalımı %43 olarak saptamışlardır (10). Yüzeyel yerleşimli olan olgularda sağ kalımın daha yüksek olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (9, 42). Bunun aksine Jennifer Ko ve arkadaşlarının yayınladığı 8 olguluk yüzeyel yerleşimli CRS serisinde, takip edilen 5 hastanın 3'ünde 2 sene

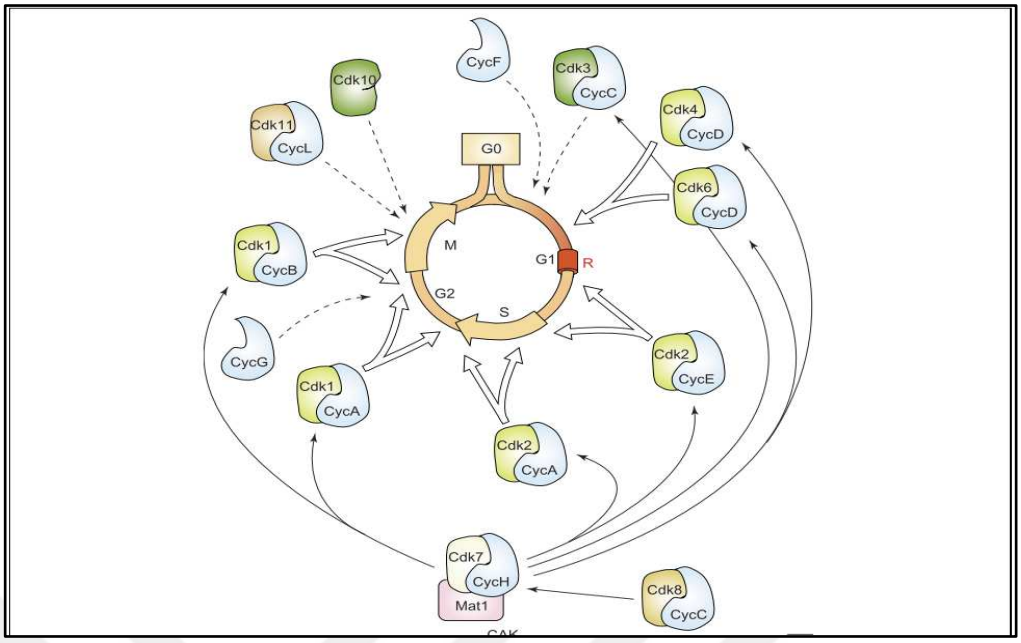
içerisinde eksitus bildirilmiştir (44). Metastaz odakları arasında en sık akciğer bulunmaktadır. Karaciğer, beyin ve lenf nodu metastazları da bildirilmiştir.

Tedavide henüz görüş birliği olmasa da ES protokülü gibi ya da yüksek dereceli yumuşak doku tümörü gibi tedavi edilmektedirler. Antrasiklin ve alkilleyici ajanları içeren kombinasyon tedavileri önerilmektedir (40).

2.3. SİKLİN E1

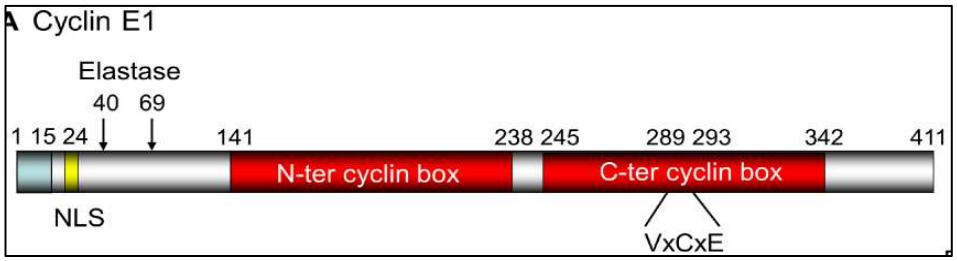
Hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki dengesizlikler insanlarda görülen kanserlerin en önemli sebebidir. Bu dengeyi sağlamada görevli olan proteinlerin başında hücre siklusunda yer alan siklinler, siklin bağımlı kinazlar (cyclin-dependent kinase- CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri yer almaktadır (63). Hücre siklusunun regülasyonundaki bozukluklar programlanmamış proliferasyon, genomik instabilite ve koromozomal instabiliteye yol açarak kanserleşmeye neden olmaktadır (64).

Hücre siklusu DNA sentezini içeren sentez (S) fazı ve mitoz bölünmenin gerçekleştiği M fazı başta olmak üzere 4 fazdan oluşur. Bu S ve M fazlarının arasında ise gerekli hazırlıkların yapıldığı ara faz olarak adlandırılan G1 ve G2 fazları bulunur (65). Hücre bölünmesi için gereken sinyallerin yokluğunda hücre G0 olarak adlandırılan sessiz faza geçer (66). Hücre siklusunun denetleyicilerinden olan CDK proteinleri heterodimerik serin/treonin kinazların katalitik bölgelerdir. Siklinler ise CDK proteinlerinin düzenleyici alt birimlerini oluşturur. İnsanlarda 13 adet CDK proteini ve en az 29 adet siklin ve siklin benzeri protein tanımlanmakla birlikte; hücre siklusuna direkt etkisi olan CDK ve siklin proteinleri belirlidir. İnterfaz aşamasında CDK2, CDK4 ve CDK6 proteinleri önemli rol oynar iken metafaz aşamasını CDK1 proteini kontrol etmektedir. Aktifleştirici alt birimleri olan siklinler ise siklin D, siklin E, siklin A ve siklin B'den oluşur (Şekil 14) (67).

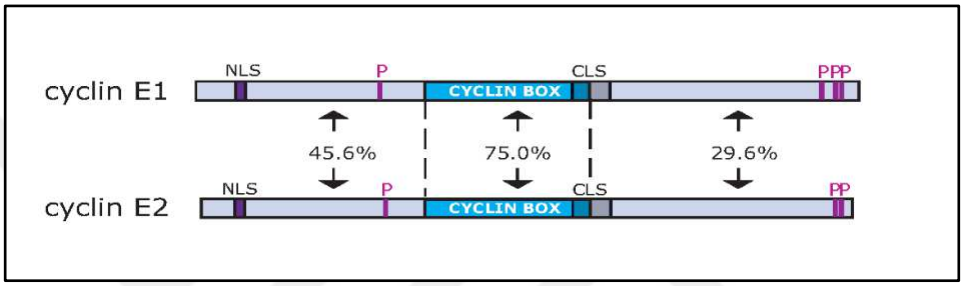


Şekil 14. Hücre siklusu ve düzenleyici proteinlerini içeren şema (Cyc:Siklin, CDK: Siklin Bağımlı Kinaz) (67)

Siklin E1 proteini, ilk kez 1991 yılında çoğalma defekti olan maya hücrelerinde tariflenen Siklin E proteininin prototipidir. Nükleer ve sitoplazmik bir protein olan Siklin E1, 19. kromozomun uzun kolunda yer alan (19q12-q13) *CCNE1* geninin geni ürünüdür. Protein ürünü ise tam uzunlukta 411 aminoasitten oluşmaktadır (68). Tam uzunluktaki formunda nükleusta lokalize bölgesi 24-28. aminoasitler arasında yer alır. 141-238. aminoasitler arasında amino terminali siklin kutusu ve 245-342. aminoasitler arasında ise karboksi terminali siklin kutusu bulunmaktadır. Retinoblastom (Rb) proteini bağlanan bölgesi ikinci siklin kutusunun tam ortasındadır ve 289-293. aminoasitler arasındadır (Şekil 15) (69). 1998 yılında ise 8. kromozomun uzun kolunda yer alan siklin E2 proteinini kodlayan *CCNE2* geni bulunmuştur. Protein ürünü 404 aminoasitten oluşmaktadır. İnsanlarda siklin E2 proteini, siklin E1 ile %69,3 oranında yapısal benzerlik gösterir (70-71). Siklin E1 ve siklin E2 proteinlerinin karşılaştırılmalı yapıları Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 15. Siklin E1 proteininin şematik yapısı (69) (NLS: Nuclear localization signal-Nükleer lokalizasyon bölgesi, CLS: Sentrosome localisation sequence-Sentrozomda lokalize sekans, p: Fosforilasyon bölgeleri)

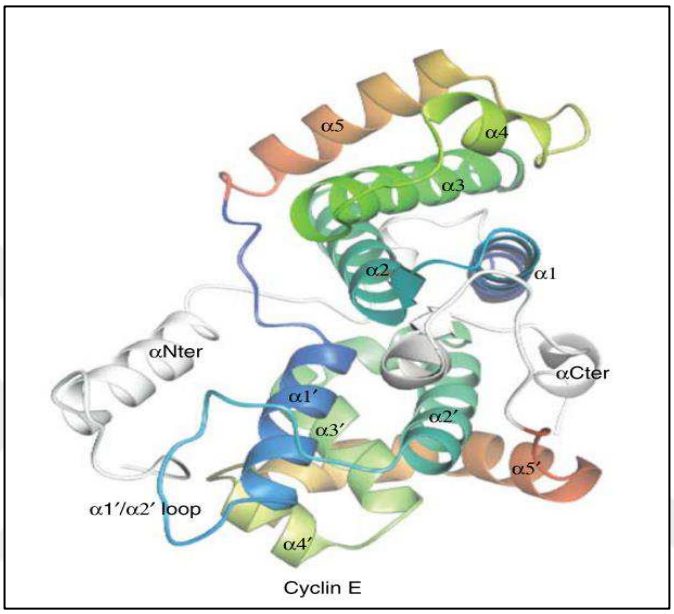


Şekil 16. Siklin E1 ve Siklin E2 proteinlerinin karşılaştırmalı yapısal şemaları (71).

Siklin E1 ve siklin E2 proteinlerinin hücre siklusundaki görevleri benzerdir. Son yıllarda organdan organa değişen işlevsel bazı farkları ortaya konmuştur. Karaciğer rejenerasyonunda siklin E1'in aktive edici etkisi gözlenirken siklin E2'nin etkisinin inhibe edici olduğu gözlenmiştir. Bunun aksine testislerde 2 protein de eksprese edilmekte iken siklin E2'nin inhibisyonunun erkeklerde infertilite ve testiküler atrofiye yol açabileceği gösterilmiştir. Trofoblastik hücrelerde her iki proteininin de yüksek olduğu gösterilmiştir. Siklin E1 proteininin onkogenezdeki rolleri siklin E2'den daha ayrıntılı olarak tariflenmiştir (71).

Siklin E1 ve siklin E2 genlerindeki defektlerin, trofoblastik hücrelerin çoğalmasını engellediği ve ölümcül sonuçlara sebep olduğu saptanmıştır. Siklin E1'in artan aktivasyonu CDK2 aktivasyonunu artırdığı bildirilmekle birlikte CDK2 genindeki defektin plasental gelişim üzerine negatif etkisinin görülmemesi siklin proteinlerinin CDK2'den bağımsız fonksiyonlarının olduğunu göstermiştir (64, 72-73).

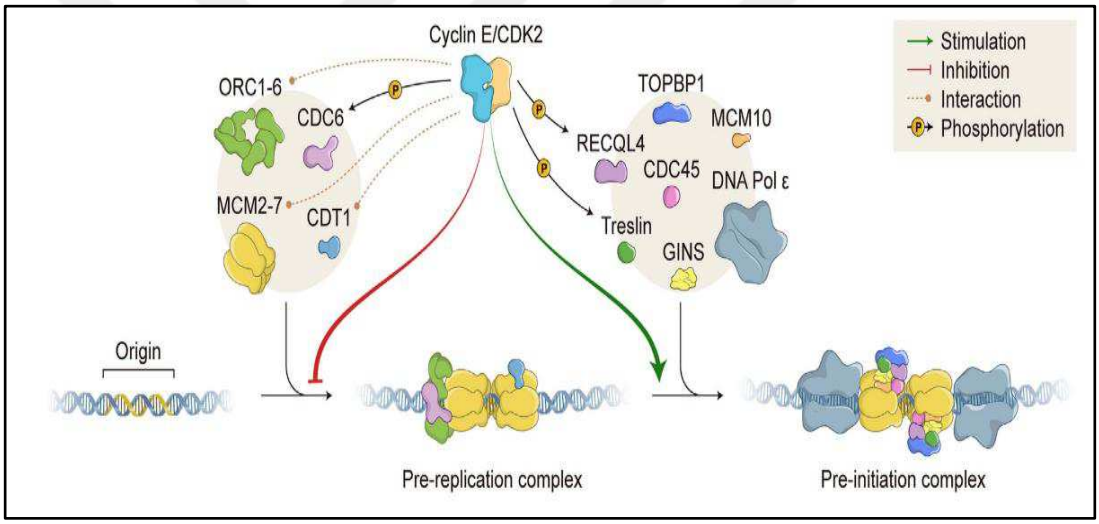
Siklin E proteini, α-heliks yapısından oluşan amino terminali siklin kutusu ve karboksi terminali siklin kutusundan oluşmaktadır. N terminali siklin kutusunu α heliks yapısından oluşan 5 adet protein (α1, α2, α3, α4 ve α5) takip eder. α3 proteini bu yapılanmanın santralinde hidrofobik çekirdek olarak yer alır. α5 proteini devamlılığında α-heliks yapısından oluşan α1',α2', α3', α4' ve α5' bulunur ve karboksi terminali siklin kutusu yer alır (Şekil 17) (74).



Şekil 17. Siklin E1 proteininin şematik yapısı (74).

Siklin E proteini CDK2 proteini ile kompleks oluşturarak hücre siklusunun G1-S geçişini düzenler (75). Siklin E- CDK2 kompleksi ve siklin D-CDK4/6 kompleksi birlikte Rb proteininin fosforilasyonunda rol oynar. Rb proteini, G1-S geçişinin negatif düzenleyicilerden birisidir ve Rb tümör baskılayıcı geninin ürünüdür (76-77). Rb proteini hipofosforile iken aktiftir ve transkripsiyon faktörü ailesinden E2F'ye bağlanır. E2F'nin işlevini inhibe ederek G1-S geçişini durdurur ve hücre proliferasyonunu inhibe eder (75). Rb proteinin fosforilasyonu E2F transkripsiyon ailesi üzerindeki inhibisyonun ortadan kalkmasını sağlar. E2F transkripsiyon ailesinin aktivasyonu, siklin E'nin geninin transkripsiyonunu artırır ve hücre siklusunun S fazına girişini sağlar (78). Artan E2F proteini ve Siklin E/CDK2 kompleksi, S fazına giriş ve devamlılığı için gereken CDC6, CDT1, MCM kompleksi, Siklin A ve EMI1 gibi proteinlerinin gen ekspresyonunu indükler (11, 79).

CDC6, ORC1-6, MCM2-7, CDT1 proteinleri, mitozun geç döneminde ve G1 fazının başında, CDK aktivitesi düşük iken DNA replikasyonun başlayacağı orijin bölgesinde toplanarak prereplikasyon kompleksini oluştururlar. Prereplikasyon kompleksi bu aşamada inaktiftir. Tek bir DNA sarmalının replikasyonu için G1-S fazında artan siklin E-CDK kompleks aktivitesi daha fazla prereplikasyon komplekslerinin oluşumunu engeller. G1-S fazında Siklin E/CDK2 kompleksinin Treslin ve RECQL4 proteinlerini fosforile etmesi sonucu, DNA replikasyonu için gereken TOPBP1 (DNA topoisomerase II binding protein 1), CDC45 ve GINS (Go-ich-ni-san) proteinlerinin de prereplikasyon kompleksine eklenerek preinisiasyon kompleksini oluşturmalarını sağlar (Şekil 18) (11, 80-81).



Şekil 18. Siklin E/CDK2 kompleksinin DNA replikasyonundaki işlevleri. ORC: Origin recognisation complex- Orijin tanıma bölgesi, MCM: Minichromose maintenance-Minikromozom korunumu, CDT1: Chromatin licensing and DNA replication factor 1-Kromatin lisanslama ve DNA replikasyon faktör; CDK, Cyclin dependent kinase; TOPBP1, DNA topoisomerase II binding protein 1-DNA topoizomeraz II bağlayıcı protein; RECQL4, RecQ like helicase 4- RecQ benzeri helikaz 4; GINS, Go-ich-ni-san. (11)

E2F transkripsiyon ailesi üyelerinden biri olan E2F-5, siklin E-CDK2 kompleksi tarafından fosforile edilerek aktive edilir. E2F-5'in aktivasyonu transkripsiyonun ve hücre siklusunun devamlılığını sağlaması yanı sıra CBP/p360

koaktivatör kompleksi ile ilişkisi olduğu kanıtlanmıştır (82). CBP/p360 kompleksinin E2F-5 ile aktivasyonu ve siklin E/CDK2 ile fosforilasyonu histon deasetiltransferaz fonksiyonunu ortaya çıkararak kromatin modifikasyonuna katkı sağlar (83-84).

Siklin E-CDK2'nin başka bir fonksiyonu ise CDK inhibitörleri olan $p27^{kip1}$ proteinini G1 fazında ve $p21^{Cip1}$proteinini ise S fazında fosforile etmektir. Fosforile olan $p27^{kip1}$ ve $p21^{Cip1}$proteinleri Ubikutin aracılı proteolizis ile parçalanır. Bu sayede $p27^{kip1}$ ve $p21^{Cip1}$proteinlerinin G1-S fazı geçişinde inhibitör etkisi ortadan kalkar (85-86).

Siklin E-CDK2 kompleksinin önemli substratların birisi de nükleer yerleşimli NPAT/p220 proteinidir. NPAT/p220 proteini subnükleer Cajal cisimcikleri ile ilişkilidir. Siklin E/CDK2 kompleksi NPAT/p220 proteinini fosforilleyerek aktive eder. NPAT/p220 aktivasyonu kromozom 1 ve 6'da yer alan histon genleri ile ilişkili olan Cajal cisimcikleri üzerinden histon gen transkripsiyonunu artırır (87-88).

Siklin E-CDK2 kompleksinin aktivasyonu belirli bir eşik değeri aşması, G1 fazında sentrozom dublikasyonunun başlaması için gerekli olan Nükleofosmin proteinini fosforiller. Normalde sentrozoma bağlı olan Nükleofosmin, fosforile edildikten sonra sentrozomdan ayrılarak dublikasyonun başlamasını sağlar (89).

2.3.1. Siklin E aktivasyonunun Replikasyon Stresi, Kromozomal ve Genomik İnstabilite ile İlişkisi

Siklin E'nin hücrelerde yüksek düzeyde eksprese edilmesi bir takım replikasyon streslerine neden olabilmektedir. Replikasyon streslerinden biri replikasyonun çatalının erken sonlanması, bunun sonucunda da replikasyon çatalının çökmesi ve DNA çift zincir kırıklarının oluşmasıdır (90). Ayrıca normal hücrelerde artmış siklin E/CDK2 aktivitesi replikasyon stresine yol açar. Bu duruma hücre siklusunda duraklama, hücre ölümü ya da hücre yaşlanması gibi yanıt mekanizmaları ile müdahale edilir. Bu yanıt mekanizmalarının hücrelerde düzenli bir şekilde işlemeyişi tümör gelişiminde önemli rol oynamaktadır (11).

Siklin E'nin regülasyonundaki bozukluk ve CDK2'nin aktivitesinin artması MCM proteinlerinin prereplikasyon kompleksine yüklenmesini önleyerek prereplikasyon kompleksinin oluşumunda aksamalara neden olduğu gözlenmiştir (91).

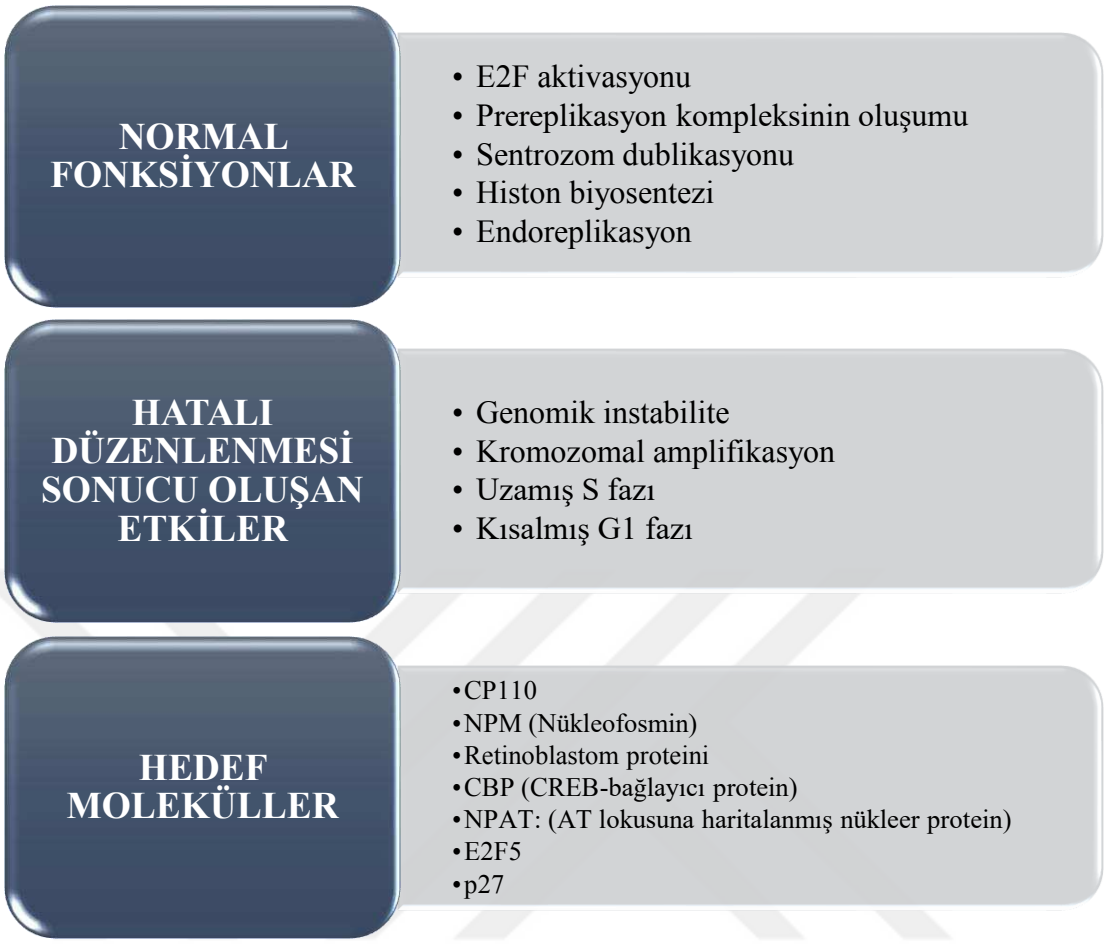
Siklin E'nin ekspresyonunun artışı Rb proteinini fosforilleyerek E2F'nin ve dolayısı ile çok sayıda genin transkripsiyonunun artışına neden olarak onkogen etkisi göstermektedir. Ancak E2F'nin DNA replikasyonu için gereken nükleotid üretimi için gerekli gen bölgesinin aktivasyonunda tek başına sağlayamaması artmış DNA replikasyonu karşısında nükleotid havuzunda yetersizliğe ve replikasyon stresine neden olduğu gösterilmiştir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada ortama eksojen nükleotid eklenmesi ya da nükleotid biyosentezinde rolü olan c-Myc proteininin aynı anda ekspresyonunun artmasının replikasyon stresini ortadan kaldırdığını göstermiştir (92).

Siklin E ve CDK2 proteinlerinin ayrı ayrı veya kompleks halinde aktivasyonlarının artışı çeşitli mekanizmalarla kromozomal instabilite ve genomik instabiliteye sebep olabilmektedir (93). Charles H. Spruck ve arkadaşlarının 1999'da fare embriyolarındaki fibroblastlarda ve insan meme epiteli hücrelerinde yapmış oldukları çalışmada; anöploidi gösteren hücrelerde siklin E1 aktivitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Artmış siklin E1 aktivitesinin hücre bölünmesi sırasında kromozomal dağılımda etkisi olduğunu saptamışlar (94).

Siklin E aktivasyonunun düzenlenmesindeki bozukluklar G1 fazında kısalma ve uzamış S fazına neden olduğu gösterilmiştir. Tüm bunların sonucunda DNA replikasyonunun yavaşlamasına ve tamamlanmamış inkomplet kromozomların oluşumuna yol açar. Hücre mitoza girdiğinde kromozomlardaki replikasyon hataları kromozomal ayrışmalarda hataya ve karyotip anomalilerine yol açacaktır. Yeterli oranda replike olmamış genom ile mitoza giren hücrelerde kromozomal dağılımda hata oluştuğu ve sonuç olarak kopya sayısı kaybı ve genomik instabiliteye sebep olduğunu göstermişler (91, 95).

Siklin E aktivasyonunun neden olduğu G1 fazında kısalma ve replikasyonun olduğu S fazına hızlı girişin ardından replikasyon çatalındaki yavaş ilermenin aynı anda artan transkripsiyon nedeni ile olduğu ortaya konmuştur. Artan siklin E aktivitesinin siklin E/CDK2 yolağının aktive ettiği E2F geninin proteininin eş zamanlı transkripsiyonu uyarması replikasyon çatalının yavaş ilerlemesine ve replikasyon-transkripsiyon yolaklarındaki çakışmaların DNA hasarına sebep olduğu gözlenmiştir. Artan siklin E aktivitesinin eş zamanlı olarak DNA'nın farklı bölgelerindeki orijin ateşlenmesine neden olmaktadır. Her iki durumun bir arada görülmesi çift zincir kırıkları, replikasyon çatalında çökme ve kromozomal rearranjman kırılma noktalarının oluşumuna neden olmaktadır (96-97).

2020 yılında yayınlanan farklı bir çalışmada ise artan siklin E1 aktivitesinin fokal kopya sayısı değişikliklerinde artma, kromatin köprülerinin oluşumu ve kardeş kromatidlerde düzgün ayrışmamaya neden olduğu saptanmıştır (72). Siklin E'nin normal fonksiyonları ve hatalı düzenlenmesi sonucu oluşan etkiler Şekil 19'te verilmiştir.



Şekil 19. Normal ve neoplastik Siklin E fonksiyonları (93).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK KURUL

Bu çalışma T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2020-09/819 karar numaralı etik kurul onayıyla gerçekleştirildi.

3.2. OLGU SEÇİMİ

Çalışmamıza, Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Hastanesi ve Tıbbi Patoloji Kliniği'ne 01.01.2012-01.06.2021 tarihleri arasında raporlandırılan, insizyonel ve eksizyonel biyopsi materyallerinde, küçük yuvarlak hücreli malign tümör ya da atipik ES tanısı almış ve ES benzeri sarkom veya ES olarak yorumlanmış 63 hasta ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne kabul edilen FISH ile EWSR1 gen rearanjmanı saptanmayan 2 hasta dahil edildi. Dahil edilen hastaların hiçbirinde daha önceden spesifik gen rearanjmanı saptanmamıştı.

İnsizyonel biyopsi veya eksizyonuna ait parafin blokları arşivimizde bulunmayan, bloklarında yeteri kadar doku içermeyen ve dekalsifikasyon işlemine uğramış olgular çalışmamıza dahil edilmedi. FISH işlemi sonrası değerlendirmek için yeterli ışıma elde edilemeyen 25 olgu çalışmamızdan çıkarıldı.

Toplamda 40 hastaya ait histopatolojik, immünohistokimyasal ve klinik veriler kaydedildi. Hastaya ait arşiv materyalini oluşturan tüm preparatlar yeniden değerlendirildi. Neoadjuvan tedavi sonrası alınan biyopsi dokuları ilk tanı materyalinde yeterli doku var ise kullanılmadı; ancak kemoterapi öncesindeki biyopsilere ait parafin bloklarda yeterli doku bulunmadığı zaman tercih edildi. Olguların değerlendirilmesinde, 2020 basım tarihli, Yumuşak Doku ve Kemik Tümörleri DSÖ sınıflaması (2020, 5. Basım) kitabında belirtilen kriterler kullanıldı.

3.3. İNCELENEN PARAMETRELER

Çalışmamızda değerlendirilecek klinik parametreler yaş, cinsiyet, tümör yerleşim yeri ve tanı anında metastaz varlığı olarak belirlendi. Histopatolojik parametrelerde hücresel pleomorfizm, atipi, nükleol belirginliği, desmoplazi ve miksoid stroma varlığı değerlendirildi. İmmünhistokimyasal parametreler ise CD99, FLI1 ve ERG sonuçları olarak belirlendi.

İstatistiksel analizler yapılırken FISH değerlendirme sonuçları öncelikle EWSR1 (+), EWSR1 (-) / CIC (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) olarak 3 gruba ayrıldı. Sonrasında EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) olarak 2 ayrı grupta da değerlendirildi.

Histopatolojik bulgular yeniden değerlendirildi. Olgular iki gruba ayrıldı:

- ❖ Grup 1: Klasik ES'te görülen histomorfolojik bulguları içeren olgular bu gruba dahil edildi.
- ❖ Grup 2: Nükleer irileşme ve vezikülerleşme, sık belirgin nükleol varlığı, epiteloid/rabdoid veya iğsi morfolojide hücreler ve atipinin görüldüğü olgular ise bu gruba dahil edildi.

CD99 immünohistokimyasal ekspresyon paternleri yeniden değerlendirildi. Boyanma paternine göre olgular iki gruba ayrıldı:

- Pozitif: Yaygın ya da diffüz sitoplazmik-membranöz ekspresyon gösteren olgular.
- Negatif: Fokal ya da yamasal, sadece sitoplazmik ekspresyon gibi ekspresyon paternlerini gösteren olgular.

FLI1 ve ERG immünohistokimyasal çalışma sonuçları pozitif ve negatif olarak gruplandı.

3.4. BLOK HAZIRLANMASI

Uygun doku tespit ve takibi yapılmış yeterli tümör dokusu içeren bloklar seçildi. Doku mikroarray (DMA) yöntemi uygulanmak üzere, immünohistokimya ve FISH incelemesi için uygun, kanama ve nekroz alanları ile vasküler yapıları içermeyen özellikte 3 mm çaplı tümör alanları preparatlar üzerinde işaretlendi. Preparatlar üzerinde işaretlenmiş olan tümör alanlarına parafin bloklarda karşılık gelen bölgeler belirlendi. Bu alanlar 3 mm çaplı punch biyopsi aparatı (Kai Medical) ile bloklardan ayrıldı. Aynı punch aparatı ile 24 adet 3 mm çaplı kuyucuk içeren 3 ayrı blok oluşturuldu. 59 hastaya ait birer doku ve 6 hastaya ait ikişer tümör dokusu hazırlanmış olan 3 bloğa haritalanarak gömüldü.

3.5. İMMÜNOHİSTOKİMYA ÇALIŞMALARI

Siklin E1 için nekroz, kanama ve müsin alanları içermeyen kolon adenokarsinomu dokusu kontrol bloğu olarak seçildi. Kontrol bloklarından hazırlanan kesitlerde antikorlar için ideal yöntem ile dilüsyon oranları ve inkübasyon süreleri ayarlandı.

DMA yöntemi ile hazırlanmış parafin bloklardan pozitif yüklü Poli-L-lizinli lamlara 3-5 µm kalınlıkta tam yüz kesitler alındı. Hazırlanmış kesitler daha önceden ayarlanmış 72°C etüvde 15 dakika bekletildi. Daha sonra bu lamlara, rekombinant fare monoklonal Siklin E1 antikoru (Anti-Cyclin E1 antibody [CCNE1/2460], Abcam Inc.); Ventana Benchmark XT IHC/ISH tam otomatik boyama platformunda Roche Diagnostics Ultraview Universal DAB Detection kiti kullanılarak uygulandı. Antikor 1/50 oranında dilüe edilerek kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyanmanın basamakları Tablo 1'da gösterilmiştir.

Tablo 1. İmmünohistokimyasal boyamada otomatik cihaz içi basamaklar

1	Deparafinizasyon
2	Antijen "retrieval" (EDTA "Cell Conditioning 1 (CC1) ile 64 dakika inkübasyon
3	Primer antikor (Anti-Cyclin E1) ile 32 dakika inkübasyon
4	Zemin boyaması için H&E ile 12 dakika inkübasyon
5	Zıt boyama için "Bluing Reagent" ile 4 dakika inkübasyon

3.6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Siklin E1 antikoru için nükleer ekspresyon dikkate alındı. Kolon adenokarsinomunda tümör hücrelerinde görülen nükleer ekspresyon pozitif dış kontrol olarak kullanıldı. Tümör hücrelerinde, Wei ve arkadaşlarının osteosarkom ve kordoma olgularında yapmış oldukları çalışmalardaki değerlendirme paternine benzer şekilde ekspresyon şiddeti 4 grupta skorlandı:

- Skor 0: Ekpresyon yok.
- Skor 1: Zayıf ekspresyon.
- Skor 2: Orta şiddette ekspresyon.
- Skor 3: Güçlü ekspresyon.

Ekspresyon düzeyleri ise Skor 0 ve Skor 1 kategorisi düşük ekspresyon, Skor 2 ve Skor 3 kategorisi ise yüksek ekspresyon olarak iki ayrı grup halinde değerlendirildi (98).

3.7. FLORESAN IN-SITU HİBRİDİZASYON

Ayrılma ("break-apart") FISH analizleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. *EWSR1* gen rearanjmanını değerlendirmek için SPEC dual color break apart prob (Chr22q12 sentromerik proksimalturuncu, Chr22q12 telomerik distal yeşil, ZytoLight, Zytovision), *CIC* rearanjmanını değerlendirmek için ise SPEC dual color break apart prob (Chr19q13.2 sentromerik

proksimal turuncu, Chr19q13.2 telomerik distal yeşil, ZytoLight, Zytovision) kullanıldı.

FISH protokolü basamakları:

1. 4 µm kalınlığındaki kesitler daha önceden ayarlanmış 56°C etüvde bir gece bekletildi.
2. Deparafinizasyon işlemi: Ksilende 2 kez 5 dakika ve alkolde 2 kez 5 dakika bekletildi.
3. Lamlar distile su ile yıkandı.
4. Antijen retrival işlemi: Sitrat buffer içinde 3 dakika kaynatıldı.
5. Lamlar distile su ile yıkandı.
6. Pepsin solüsyonu içinde 37°C'de ve 20 dakika bekletildi.
7. Lamlar 2 kez 5 dakika süresince PBS solüsyonunda yıkandı ve havada kurutuldu.
8. Fiksasyon: %10 nötralize tamponlu formaldehit solüsyonunda 10 dakika fikse edildi.
9. Lamlar PBS solüsyonu ile 2 kez 5 dakika yıkandı ve havada kurutuldu.
10. FISH probu damlatıldı, üzeri lamel ve rubber sement ile kapatıldı.
11. İnkübasyon: 80°C'de 10 dakika ve 38°C'de 72 saat boyunca inkübe edildi.
12. İnkübasyon sonrasında lamel ve rubber sement kaldırıldı.
13. Lamlar 72°C'de %0,3'lük NP40 içeren 2xSSC solüsyonunda yıkandı.
14. Lamlar kuruduktan sonra Dapi damlatıldı ve lamel ile kapatıldı.

3.8. FISH SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

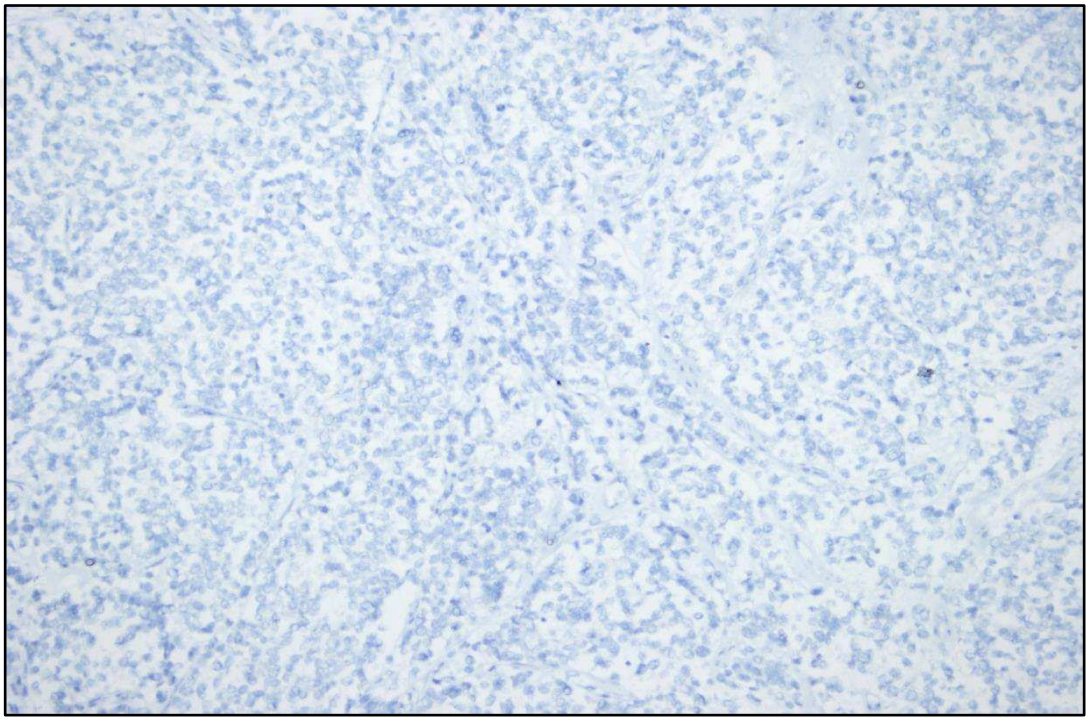
Floresan mikroskopta üst üste gelmeyen 100 tümör hücresi sayıldı. *EWSR1* gen rearanjmanı için 1 adet sarı sinyalin yanında aralarında iki sinyal ve daha fazla mesafe bulunan 1 adet turuncu ve 1 adet yeşil sinyal içeren %10'dan fazla hücre varlığı pozitif kabul edildi (41). *CIC* rearanjmanı için ise Antonescu ve arkadaşları ile Yoshida ve arkadaşlarının kullanmış oldukları %20 sınırı kabul edildi (9-10).

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

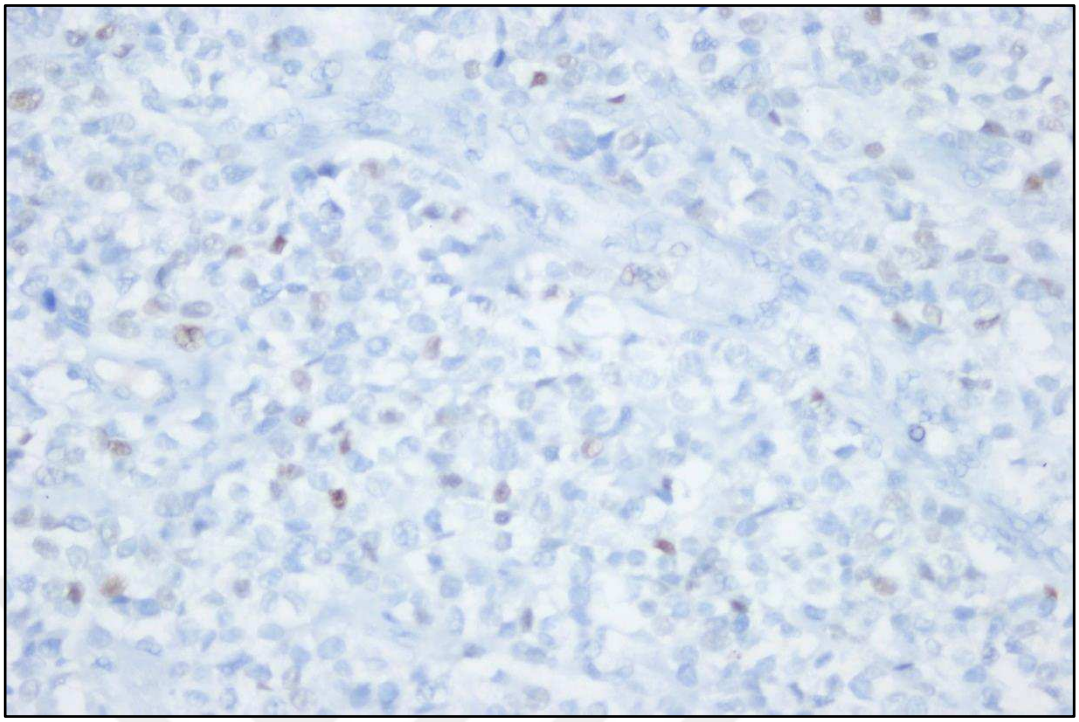
İstatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics, Version 23.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) programı ile gerçekleştirildi. Gruplara ait tanımlayıcı istatistikler, sayı (n), yüzde (%), ortalama (SS), medyan (min- maks) şeklinde raporlandı. Sürekli sayısal değişkenlerin gruplar arasındaki ilişkisi analiz edilmeden önce gruplardaki örnek sayısı göz önünde bulundurularak normallik analizlerine tabi tutuldu. Bunun için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri'nin yanı sıra basıklık ve çarpıklık, %CV değerleri ve histogram grafikleri incelendi. Buna göre normal dağılım gösteren değişkenler ortalama±standart sapma olarak, normal dağılım göstermeyen değişkenler ise medyan (min-max) olarak raporlandı. İki grup arasında sayısal değişkenler açısından fark analizi normal dağılım gösterenler için ortalamaların karşılaştırıldığı *Student's t-testi*, normal dağılım göstermeyenler için ise medyan değerlerinin karşılaştırıldığı *Mann-Whitney U testi* kullanılarak değerlendirildi. İkiden fazla grubun bulunduğu bağımlı değişkenlerdeki sayısal fark analizlerinde normal dağılım gösterenler için *One-way Anova testi*, normal dağılım göstermeyenler için ise *Kruskal-Wallis testi* kullanıldı. Anlamlılık tespit edilmemesi durumunda bu analizlerden elde edilen *p* değerleri raporlandı. Anlamlılık tespit edilmesi durumunda ise *post-hoc* Bonferroni düzeltmesi yapılarak ikili gruplar halinde karşılaştırıldı. Gruplar arasında kategorik verilerin dağılımındaki fark, *Ki-kare testi* ile değerlendirildi. Anlamlılık için kategorilerdeki hasta sayısı göz önünde bulundurularak *Pearson Ki-Kare* ya da *Fisher's Exact Test p* değerleri kullanıldı. Değişkenlerin sağkalım üzerine etkileri *Kaplan meier* grafiği ve *log rank* testi ile değerlendirildi. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

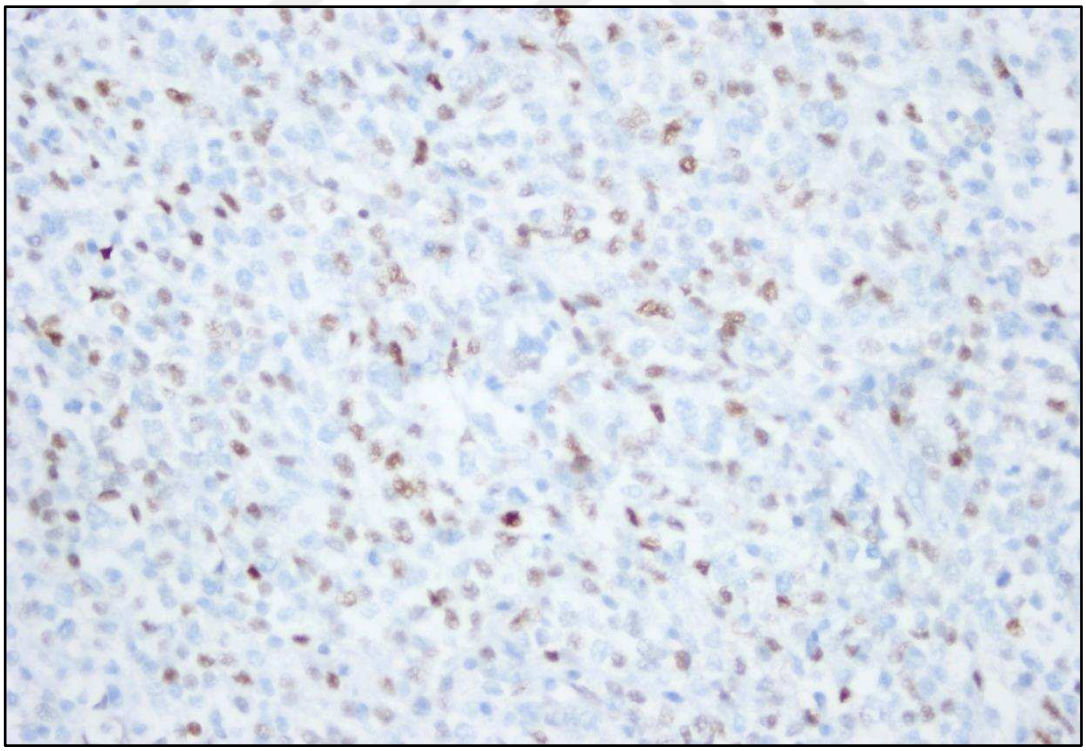
Çalışmaya dahil edilen olguların yaş aralığı 4 ile 63 arasında değişmekteydi ve ortanca yaş 22,5 olarak hesaplandı. Olguların 14'ü kadın (%35), 26'sı erkek hastaydı (%65). Olguların 22 tanesinde (%55) EWSR1 ve 5 tanesinde (%12,5) CIC gen rearanjmanları görüldü. Her iki gen rearanjmanını içermeyen olgu sayısı 13 (%32,5) idi. Çalışmamızdaki FISH değerlendirme sonuçları ve siklin E1 skorlarına ait resimler Şekil 20-27'de gösterilmektedir.



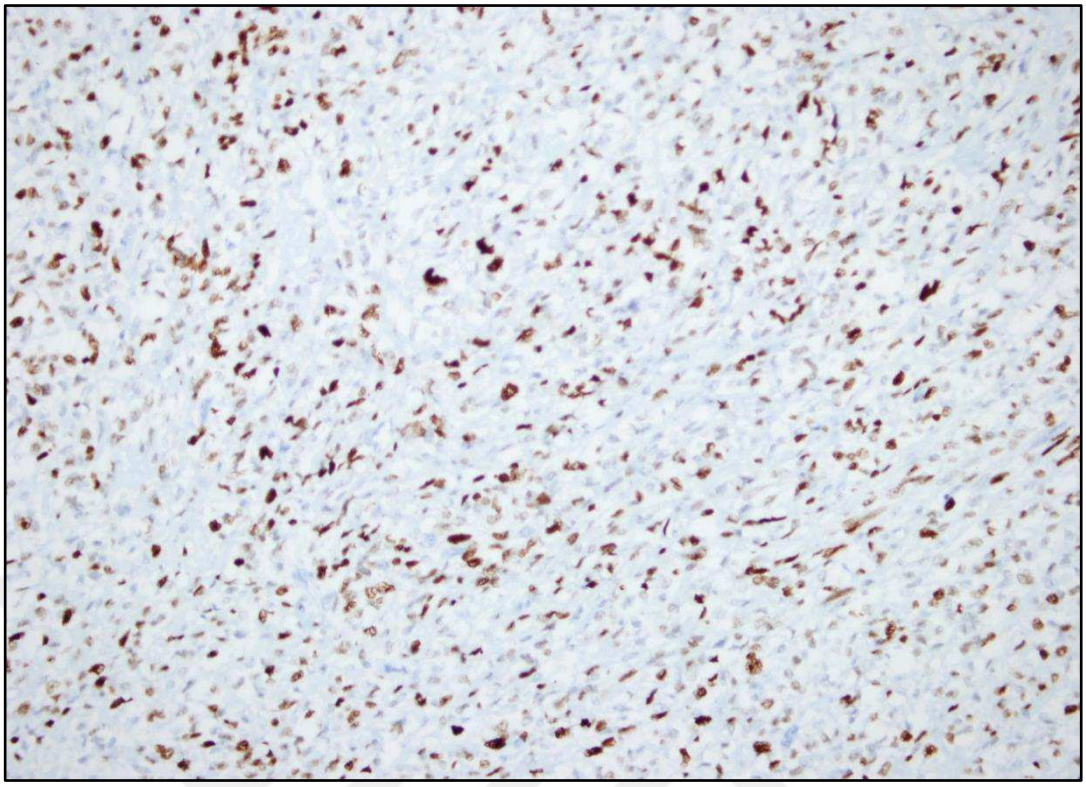
Şekil 20. EWSR1 gen rearanjmanı gösteren bir olguda siklin E1 negatifliği (Skor 0) (x200).



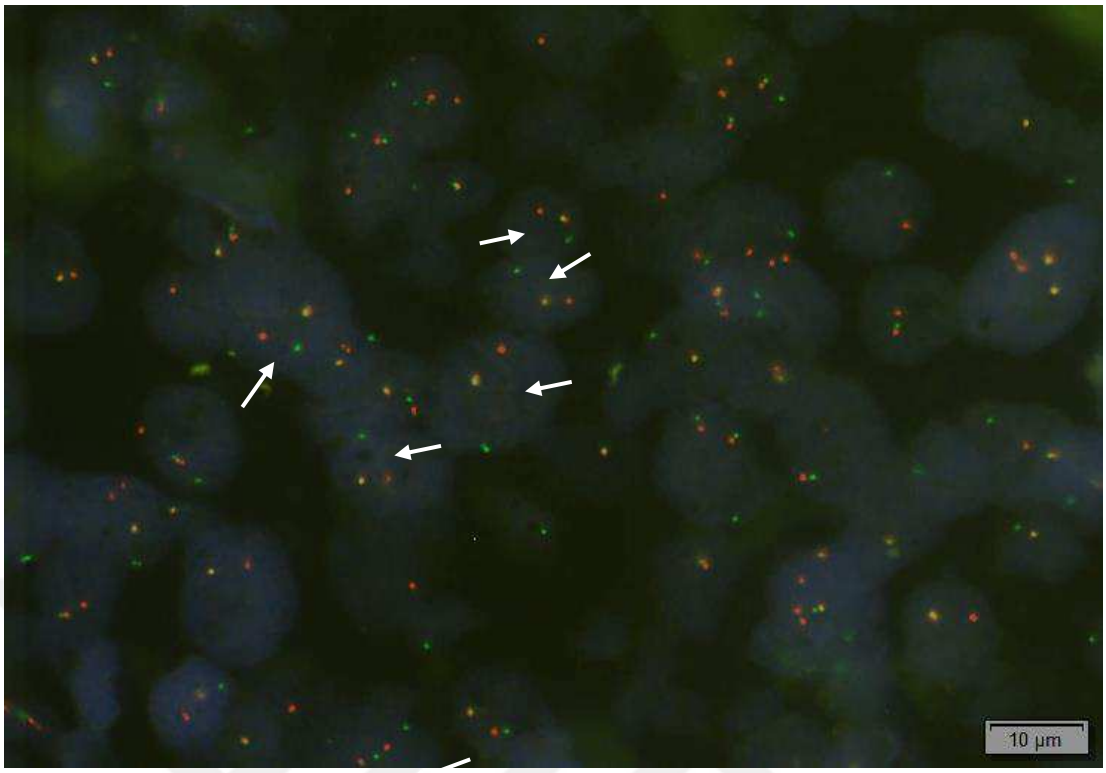
Şekil 21. EWSR1 (+) bir olguda siklin E1 ile skor 1 ekspresyon (x400).



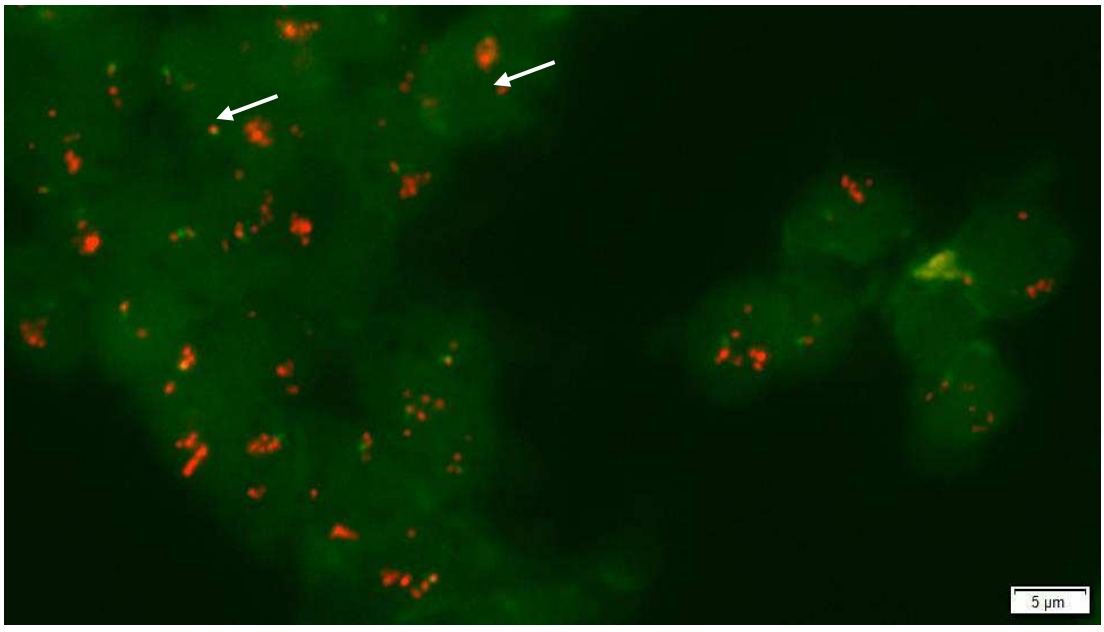
Şekil 22. EWSR1 (-) / CIC (-) bir olguda siklin E1 ile skor 2 ekspresyon (x400).



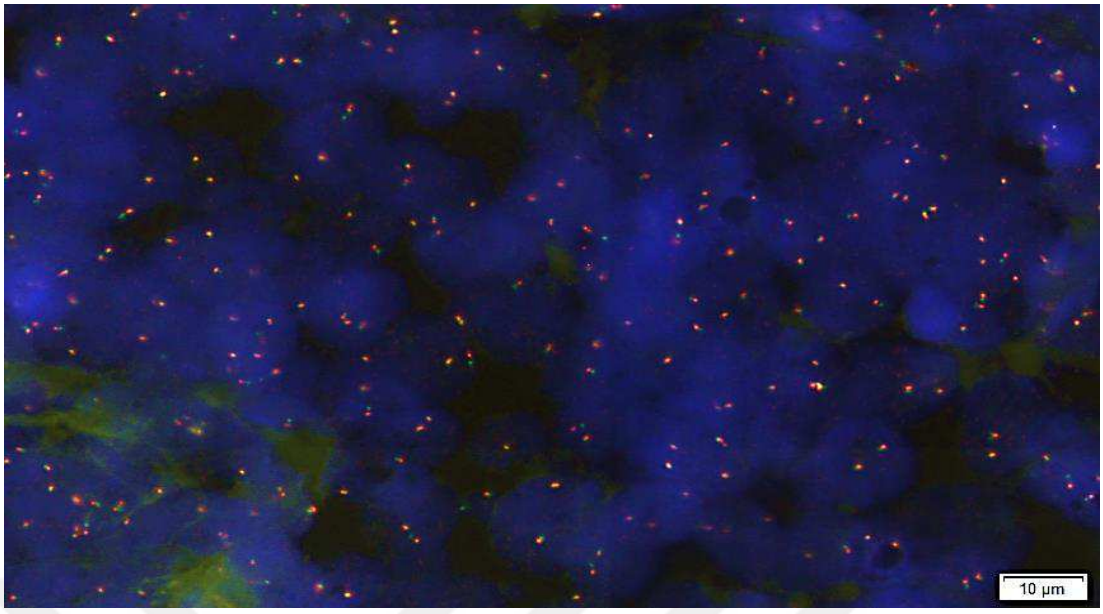
Şekil 23. CIC (+) bir olguda siklin E1 ile skor 3 ekspresyon (x200).



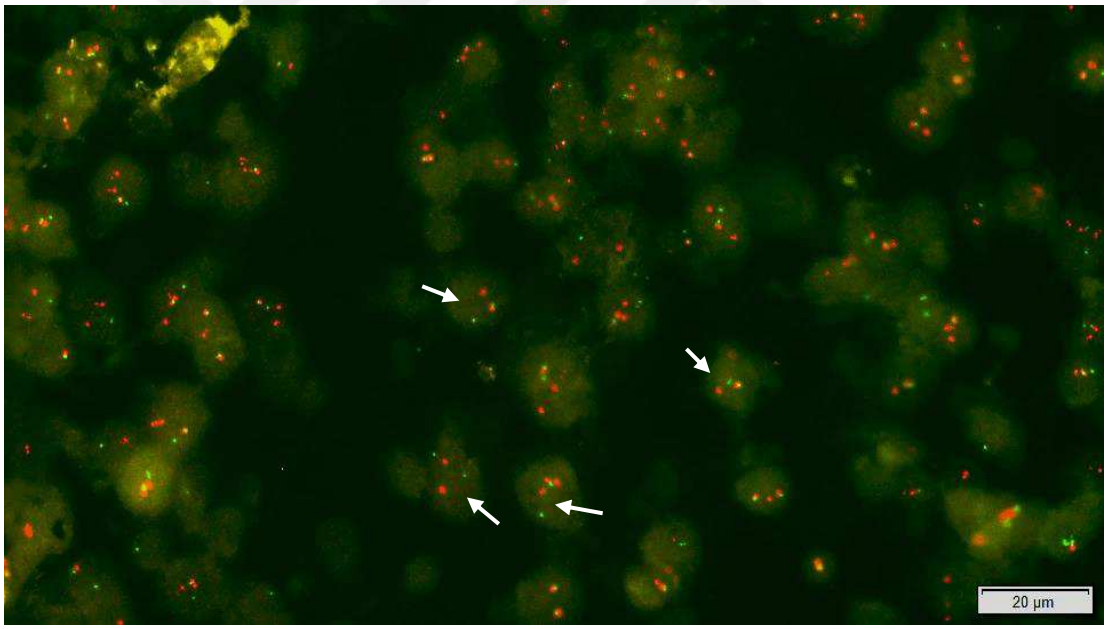
Şekil 24. *EWSR1* gen rearanjmanı içeren bir olgu. Bir sarı sinyal ile birbirinden ayrı bir turuncu ve bir yeşil sinyal görülmektedir (40x, Olympus OlyVIA).



Şekil 25. *EWSR1* gen amplifikasyonu içeren bir olgu, hücrelerin içinde ikiden fazla turuncu sinyaller görülmektedir (80x, Olympus OlyVIA).



Şekil 26. *EWSR1* gen rearanjmanı bulunmayan bir olgu (40x, Olympus OlyVIA)



Şekil 27. *CIC* gen rearanjmanı içeren bir olgu (30x, Olympus OlyVIA)

Çalışmaya dahil edilen olguların yaş, cinsiyet, yerleşim yeri, histopatoloji, miksoid stroma, metastaz, tanı, Siklin E1 skoru, Siklin E1 ekspresyon düzeyi, CD99, FLI1 ve ERG ekspresyon durumlarına ilişkin ortanca (min-maks) değerleri ile frekansları tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve patolojik verileri

		Sayı	Yüzde
Yaş (Ortanca (min-maks))		22,5 (4- 63)	
Cinsiyet	Kadın	14	35,0
	Erkek	26	65,0
Yerleşim yeri	Yumuşak Doku	18	45,0
	Kemik	22	55,0
Histopatoloji	Grup 1	22	55,0
	Grup 2	18	45,0
MiksoidStroma	Yok	29	72,5
	Var	11	27,5
Metastaz	Yok	26	66,7
	Var	13	33,3
Tanı	EWSR1 (+)	22	55,0
	EWSR1 (-) / CIC (-)	13	32,5
	EWSR 1 (-) / CIC (+)	5	12,5
Tanı	EWSR1 (-)	18	45,0
	EWSR1 (+)	22	55,0
Siklin E1 Skoru	0	19	47,5
	1	8	20,0
	2	5	12,5
	3	8	20,0
Siklin E1	Düşük	27	67,5
	Yüksek	13	32,5
CD99	Negatif	17	42,5
	Pozitif	23	57,5
FLI1	Negatif	9	22,5
	Pozitif	31	77,5
ERG	Negatif	24	60,0
	Pozitif	16	40,0

min:minimum, maks: maksimum

Siklin E1 ekspresyon şiddetleri skor 0-3 arasında olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Siklin E1 ekspresyon düzeyleri düşük ve yüksek olmak üzere 2 gruba ayrıldı. FISH sonucu ile siklin E1 ekspresyon skorları arasında anlamlı ilişki saptandı (p:0.004). CIC

(+) olan olgularda skor 2 ve 3 ekspresyon EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) tümörlere göre daha çok görülmekteydi (Tablo 3).

Tablo 3. Siklin E1 skoru ile FISH tanısı arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR1 (+)	EWSR1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	p
Siklin E1	Skor 0	14 (63,6)	4 (30,8)	1 (20)	**0.004 ***
	Skor 1	7 (31,8)	1 (7,7)	0 (0)	
	Skor 2	1 (4,5)	3 (23,1)	1 (20)	
	Skor 3	0 (0)	5 (38,5)	3 (60)	

*Pearson Ki-kare testi

FISH sonucu ile siklin E1 ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptandı (p<0.001). EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) olan tümörlerde siklin E1 ile yüksek ekspresyon düzeyleri daha çok görülmekteydi (Tablo 4).

Tablo 4. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile FISH tanısı arasındaki ilişki

		FISH						
		EWSR1 (+)		EWSR1 (-) / CIC (-)		ESWR-1 (-) / CIC (+)		
		n	%	n	%	n	%	p
Siklin E1	Düşük	21	95,5	5	38,5	1	20,0	**<0.001***
	Yüksek	1	4,5	8	61,5	4	80,0	

*Pearson Ki-kare testi

Çalışma grubunda siklin E1 skoru ile FISH sonuçları arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı. Siklin E1 skoru düşük olan olgularda EWSR1 pozitifliği anlamlı derecede daha yüksektir (p <0.001) (Tablo 5).

Tablo 5. Siklin E1 skoru ile FISH sonucu arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR 1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
Siklin E1 skoru	Skor 0	5 (27,8)	14 (63,6)	**<0.001***
	Skor 1	1 (5,6)	7 (31,8)	
	Skor 2	4 (22,2)	1 (4,5)	
	Skor 3	8 (44,4)	0 (0)	

*Pearson Ki-kare testi

Çalışma grubunda siklin E1 ekspresyon düzeyi ile FISH sonucu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptandı. Siklin E1 ekspresyon düzeyi düşük olan olgularda daha yüksek oranda EWSR1 rearranjmanı görüldü (p <0.001) (Tablo 6).

Tablo 6. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile tanı arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
Siklin E1	Düşük	6 (33,3)	21 (95,5)	**< 0.001**
	Yüksek	12 (66,7)	1 (4,5)	

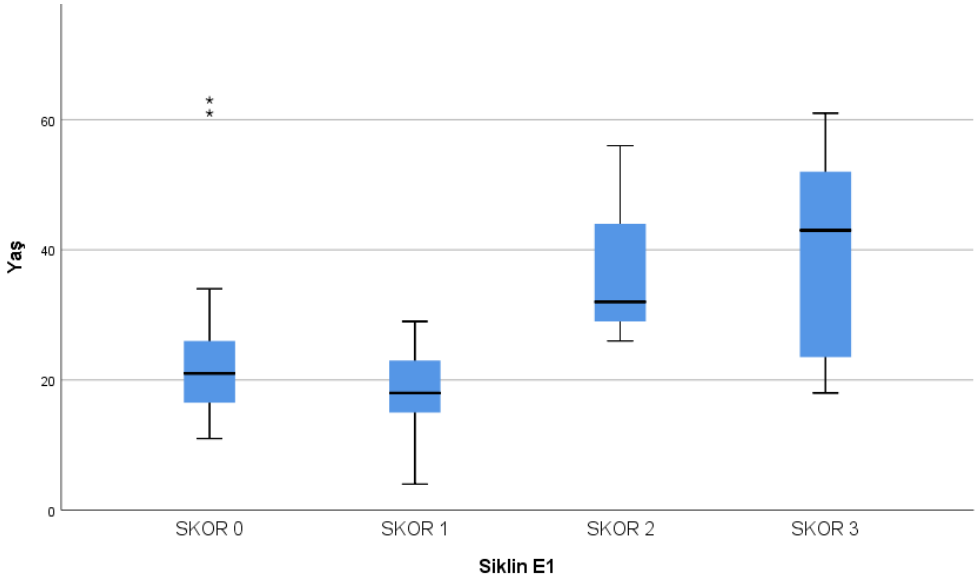
*Pearson Ki-kare testi

Çalışma grubunda Siklin E1 skoru ile yaş arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı (p: 0.012). Skor 0 ve 1 arasında ve skor 2 ile 3 arasında yaş açısından anlamlı ilişki yok iken; skor 2 ve 3 grubunun yaş ortalama ve ortanca değerleri, skor 0 ve skor 1 grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. Siklin E1 ekpresyon düzeyi yüksek olan grubun yaş ortalaması ekspresyon düzeyi düşük olan gruba göre anlamlı olarak daha yüksekti (p: 0.002) (Tablo 9, Şekil 28-29).

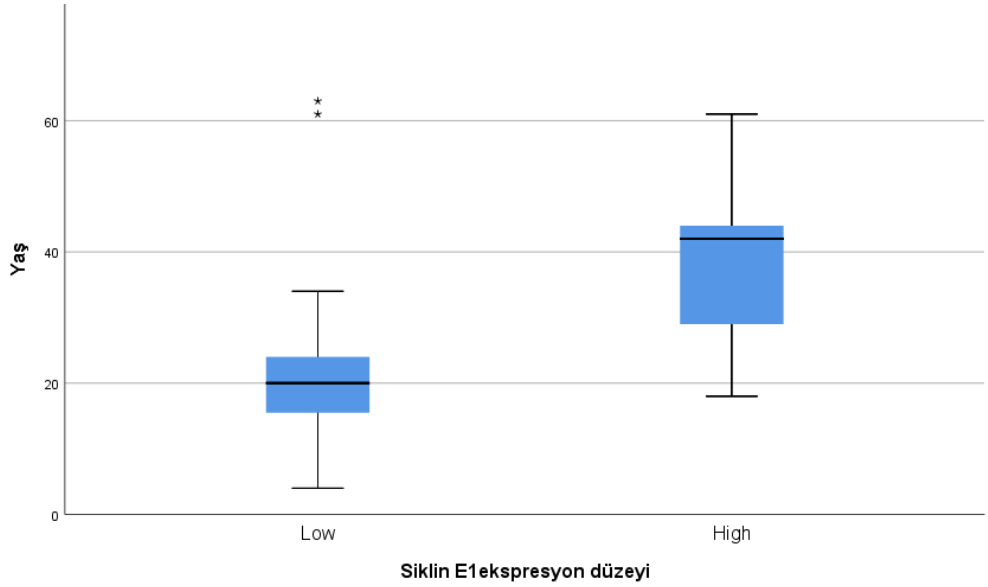
Tablo 7. Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyi ile yaş arasındaki ilişki

		Yaş		
		Ortalama (SS)	Ortanca (min-maks)	p
Siklin E1	Skor 0	24,7 (14,5)	21 (11- 63)	**0.012***
	Skor 1	18,1 (7,52)	18 (4- 29)	
	Skor 2	37,4 (12,4)	32 (26- 56)	
	Skor 3	39,5(16,75)	43 (18- 61)	
Siklin E1	Düşük	22,8 (13)	20 (4- 63)	**0.002****
	Yüksek	38,7 (15,7)	42 (18- 61)	

*Kruskal-Wallis testi, **Mann-Whitney U testi, SS: Standart sapma, min: minimum, maks: maksimum



Şekil 28. Siklin E1 skoru ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal-Wallis testi)



Şekil 29. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal-Wallis testi)

Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyleri ile tümör lokalizasyonları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyleri yüksek olan olgular daha yüksek oranda yumuşak doku yerleşimi göstermekteydi (sırası ile p: 0.003 ve p: 0.005).

Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyleri ile tümör histomorfolojisi belirlenen hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı (sırası ile p:0.002 ve p<0.001). Siklin E1 skoru 2 ve 3 olan ve ekspresyon düzeyi yüksek olan gruplardaki olgular morfolojik olarak grup 2'de olma eğilimindeydi. Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan olguların 11'i (%84,6) ve ekspresyon düzeyi düşük olan gruptaki olguların 7'si (%25,9) histomorfolojik olarak grup 2'de yer almaktaydı.

Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan gruptaki olguların 7'si (%53,8) miksoid stroma içerirken, ekspresyon düzeyi düşük olan gruptaki olguların 4'ünde (%14,8) miksoid stroma görüldü. Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan grupta olgular anlamlı olarak daha yüksek oranda miksoid stroma içermekteydi (p: 0.02).

Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyi ile tanı anında metastaz varlığı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. Siklin E1 skoru 2 olan gruptaki olguların %60'ında

ve skor 3 olan gruptaki olguların ise %71,4'ünde tanı anında metastaz görüldü. Buna karşın skor 0 olan olguların %26,3'ünde tanı anında metastaz bulunmakta iken skor 1 olan olgularda tanı anında metastaz saptanmamıştı. Siklin E1 skoru 2 ve 3 olan olgularda tanı anında metastaz anlamlı olarak daha yüksekti (p: 0.014). Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan gruptaki olguların tanı anında daha yüksek oranda metastaz yaptığı görüldü (p: 0.008).

Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyleri ile CD99 pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı (sırası ile p:0.012 ve p:0.002). Siklin E1 skoru 2 ve 3 olan ve ekspresyon düzeyi yüksek olan gruplardaki olgularda daha düşük oranda CD99 pozitifliği saptandı.

Siklin E1 skorunun klinik ve patolojik verilerle ilişkisi Tablo 8'de; ekspresyon düzeyinin klinik ve patolojik verilerle ilişkisi ise Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 8. Siklin E1 skorunun klinik ve patolojik verilerle ilişkisi

		SİKLİN E1				
		Skor 0	**Skor 1**	**Skor 2**	**Skor 3**	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	**p***
Cinsiyet	Kadın	7 (36,8)	2 (25)	2 (40)	3 (37,5)	0.928
	Erkek	12 (63,2)	6 (75)	3 (60)	5 (62,5)	
Lokalizasyon	Yumuşak doku	7 (36,8)	1 (12,5)	2 (40)	8 (100)	**0.003**
	Kemik	12 (63,2)	7 (87,5)	3 (60)	0	
Tümör Morfolojisi	Grup 1	12 (63,2)	8 (100)	1 (20)	1 (12,5)	**0.002**
	Grup 2	7 (36,8)	0	4 (80)	7 (87,5)	
Miksoid Stroma	Yok	16 (84,2)	7 (87,5)	2 (40)	4 (50)	0.075
	Var	3 (15,8)	1 (12,5)	3 (60)	4 (50)	
Metastaz	Yok	14 (73,7)	8 (100)	2 (40)	2 (28,6)	**0.014**
	Var	5 (26,3)	0	3 (60)	5 (71,4)	
CD99	Negatif	4 (21,1)	3 (37,5)	3 (60)	7 (87,5)	**0.012**
	Pozitif	15 (78,9)	5 (62,5)	2 (40)	1 (12,5)	

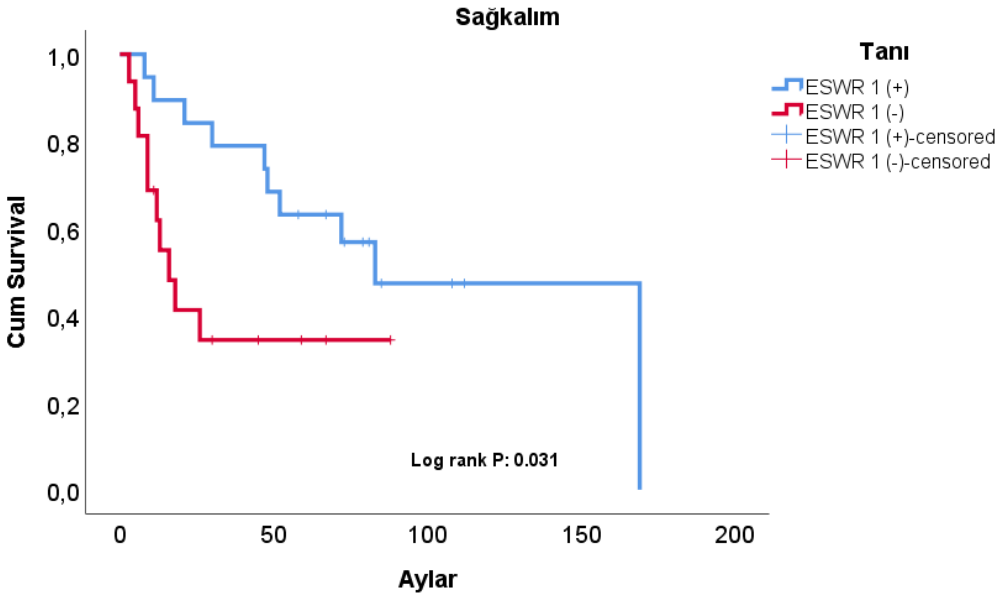
*Pearson Ki-kare testi

Tablo 9. Siklin E1 ekspresyon düzeyinin klinik ve patolojik verilerle ilişkisi

		Siklin E1 ekspresyon düzeyi		
		Düşük	**Yüksek**	
		n (%)	n (%)	P
Cinsiyet	Kadın	9 (33,3)	5 (38,5)	1.000¶
	Erkek	18 (66,7)	8 (61,5)	
Lokalizasyon	Yumuşak doku	8 (29,6)	10 (76,9)	**0.005***
	Kemik	19 (70,4)	3 (23,1)	
Tümör Morfolojisi	Grup 1	20 (74,1)	2 (15,4)	**<0.001***
	Grup 2	7 (25,9)	11 (84,6)	
Miksoid Stroma	Yok	23 (85,2)	6 (46,2)	**0.02¶**
	Var	4 (14,8)	7 (53,8)	
Metastaz	Yok	22 (81,5)	4 (33,3)	**0.008¶**
	Var	5 (18,5)	8 (66,7)	
CD99	Negatif	7 (25,9)	10 (76,9)	**0.002***
	Pozitif	20 (74,1)	3 (23,1)	

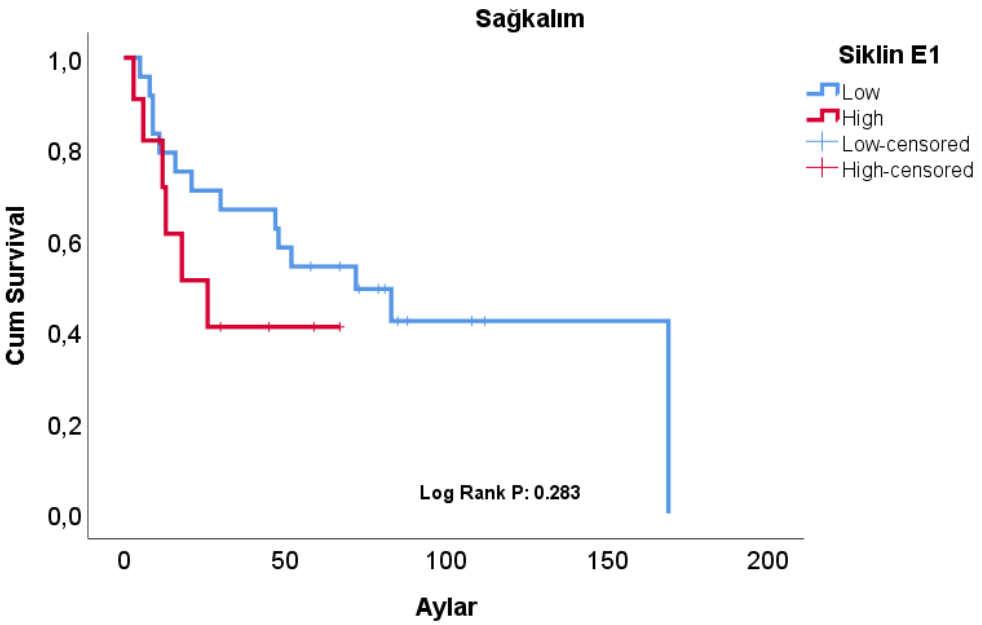
*Pearson Ki-kare testi ¶ Fisher'in kesin olasılık testi

Sağ kalım analizi, verilerine ulaşılan 35 hastada bakıldı. EWSR1 (+) 19 olgunun 10'unda (%52,6) ve EWSR1 (-) 16 olgunun 10'unda (%62,5) eksitus bildirilmişti. EWSR1 (-) olan grupta ortalama yaşam süresi daha kısadır (Log rank P: 0.031) (Şekil 30).



Şekil 30. EWSR1 gen rearanjmanı varlığı ve sağ kalım süresi arasındaki ilişki

Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile sağkalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (p: 0.283) (Şekil 31).



Şekil 31. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ve sağ kalım süresi arasındaki ilişki

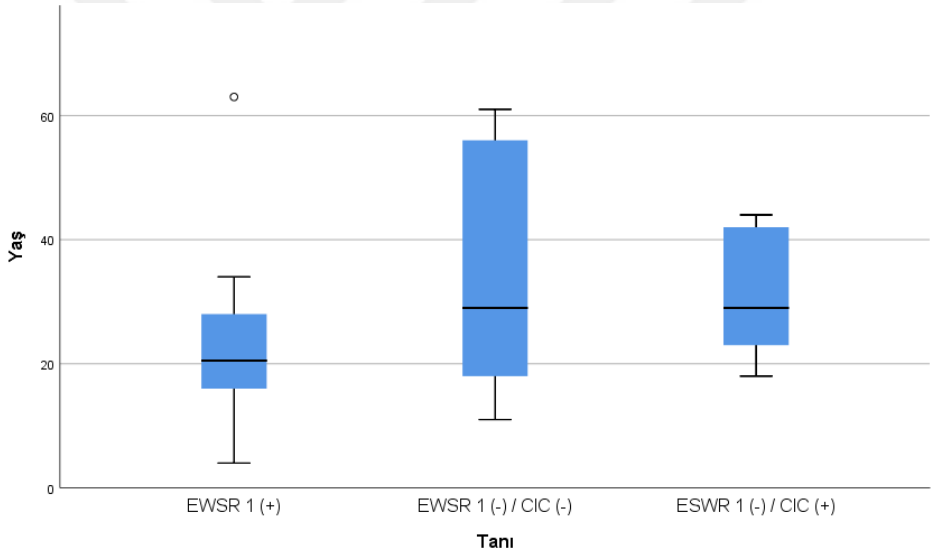
Hastalar FISH sonuçlarına göre 3 ayrı grupta değerlendirildiğinde FISH sonucu ile yaş arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p: 0.127). EWSR1 (+) olan

grupta ortalama ve ortanca yaş EWSR1 (-) gruba kıyasla istatistiksel anlamlı olarak daha düşük saptandı (p: 0.043). Bulgular tablo 10 ve şekil 32-33'te verilmiştir.

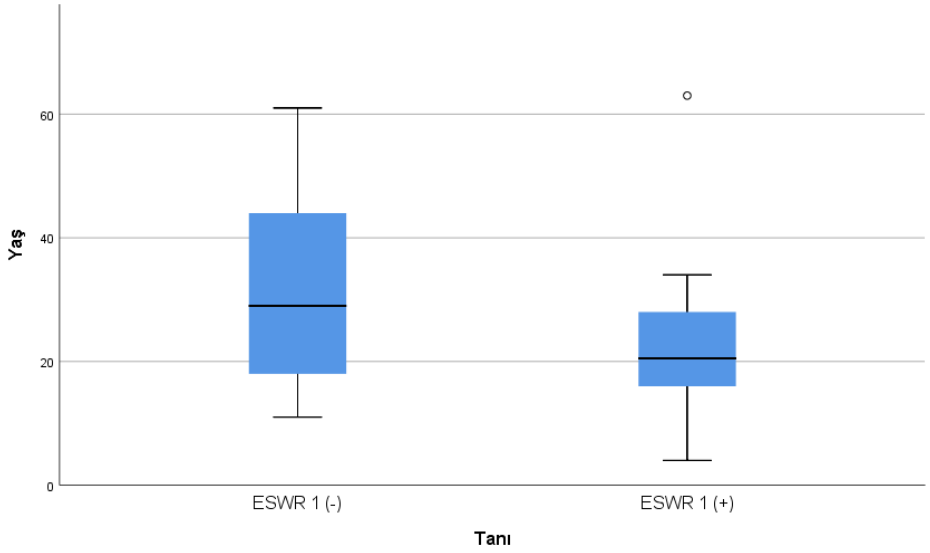
Tablo 10. FISH sonucu ile yaş arasındaki ilişki

		Yaş		
		Ortalama (SD)	Ortanca (min - maks)	p
FISH	EWSR 1 (+)	22,68 (11,5)	20,5 (4-63)	0.127*
	EWSR 1 (-) / CIC (-)	35,69 (19,3)	29 (11- 61	
	EWSR1 (-) / CIC (+)	31,2 (11,5)	29 (18-44)	
FISH	EWSR1 (-)	34,4 (17,3)	29 (11-61)	**0.043****
	EWSR1 (+)	22,68 (11,5)	20,5 (4-63)	

*Kruskal-Wallis testi, ** Mann-Whitney U testi, SS: Standart sapma, min: minimum, maks: maksimum



Şekil 32. FISH sonucu (Tanı) ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal Wallis testi)



Şekil 33. FISH sonucu (tanı) ile yaş arasındaki ilişki (Kruskal-Wallis testi)

Çalışma grubumuzda Cinsiyet ile FISH sonucu arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (p:0.455 ve p:0.641) (Tablo 11-12).

Tablo 11. FISH sonucu ile Cinsiyet arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	p
Cinsiyet	Kadın	7 (31,8)	4 (30,8)	3 (60)	0.455*
	Erkek	15 (68,2)	9 (69,2)	2 (40)	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 12. FISH sonucu ile Cinsiyet arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	P
Cinsiyet	Kadın	7 (38,9)	7 (31,8)	0.641*
	Erkek	11 (61,1)	15 (68,2)	

*Pearson Ki-kare testi

FISH sonucu ile tümör yerleşimi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı (p:0,003 ve p:0.002). ESWR1 (+) olan grupta tümör dokusu daha çok kemik yerleşimli olma eğilimindeydi (Tablo 13-14).

Tablo 13. FISH sonucu ile tümör lokalizasyonları arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	p
Lokalizasyon	Yumuşak doku	5 (22,7)	8 (61,5)	5 (100)	**0.003***
	Kemik	17 (77,3)	5 (38,5)	0	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 14. FISH sonucu ile tümör lokalizasyonları arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
Lokalizasyon	Yumuşak doku	13 (72,2)	5 (22,7)	**0.002***
	Kemik	5 (27,8)	17 (77,3)	

*Pearson Ki-kare testi

FISH sonucu ile tümör morfolojisi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. ESWR (+) olan grupta tümör morfolojisi açısından olgular daha yüksek oranda grup 1'de yer almaktaydı. EWSR1 (-) / CIC (+) grubundaki bütün hastalar morfolojik olarak grup 2 içinde yer almaktaydı (Tablo 15-16).

Tablo 15. FISH sonucu ile tümör morfolojisi arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	p
Tümör Morfolojisi	Grup 1	18 (81,8)	4 (30,8)	0	**<0.001***
	Grup 2	4 (18,2)	9 (69,2)	5 (100)	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 16. FISH sonucu ile tümör morfolojisi arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
Tümör Morfolojisi	Grup 1	4 (22,2)	18 (81,8)	**<0.001***
	Grup 2	14 (77,8)	4 (18,2)	

*Pearson Ki-kare testi

FISH sonucu ile miksoid stroma varlığı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (p:0.159 ve p:0.173) (Tablo 17-18).

Tablo 17. FISH sonucu ile miksoid stroma varlığı arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	p
Miksoid Stroma	Yok	18 (81,8)	9 (69,2)	2 (40)	0.159*
	Var	4 (18,2)	4 (30,8)	3 (60)	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 18. FISH sonucu ile miksoid stroma varlığı arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
Miksoid Stroma	Yok	11 (61,1)	18 (81,8)	0.173*
	Var	7 (38,9)	4 (18,2)	

*Fisher'in kesin olasılık testi

FISH sonucu ile tanı anında metastaz varlığı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. ESWR1 (-) olan grupta olgular daha yüksek oranda metastaz yapmıştır (Tablo 19-20).

Tablo 19. FISH sonucu ile metastaz varlığı arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	P
Metastaz	Yok	20 (90,9)	4 (33,3)	2 (40)	**0.001***
	Var	2 (9,1)	8 (66,7)	3 (60)	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 20. FISH sonucu ile metastaz varlığı arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
Metastaz	Yok	6 (35,3)	20 (90,9)	**<0.001***
	Var	11 (64,7)	2 (9,1)	

*Pearson Ki-kare testi

FISH sonucu ile CD99 pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. EWSR1 (+) olan gruptaki olgularda daha yüksek oranda CD99 pozitifliği saptandı (p<0,001) (Tablo 21-22).

Tablo 21. FISH sonucu ile CD99 pozitifliği arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	p
CD99	Negatif	3 (13,6)	9 (69,2)	5 (100)	**<0.001***
	Pozitif	19 (86,4)	4 (30,8)	0 (0)	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 22. FISH sonucu ile CD99 pozitifliği arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
CD99	Negatif	14 (77,8)	3 (13,6)	**<0.001***
	Pozitif	4 (22,2)	19 (86,4)	

*Pearson Ki-kare testi

EWSR1 gen rearanjmanı varlığı ile FLI1 pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı (p:0.711 ve p:0.476) (Tablo 23-24).

Tablo 23. FISH sonucu ile FLI pozitifliği arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	p
FLI1	Negatif	6 (27,3)	2 (15,4)	1 (20)	0.711*
	Pozitif	16 (72,7)	11 (84,6)	4 (80)	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 24. FISH sonucu ile FLI pozitifliği arasındaki ilişki

		FISH		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
FLI1	Negatif	3 (16,7)	6 (27,3)	0.476*
	Pozitif	15 (83,3)	16 (72,7)	

*Fisher'in kesin olasılık testi

FISH sonucunu EWSR1 (+), EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) olarak üç gruba ayırdığımızda, tanı grubu ile ERG pozitifliği arasında istatistiksek anlamlı ilişki saptanmadı (Tablo 18). İncelemeyi EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) olgu grupları arasında yaptığımızda ise tanı grubu ile ERG pozitifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. EWSR1 (+) olan grupta olgularda daha yüksek oranda ERG pozitifliği saptandı (p: 0.038) (Tablo 25-26).

Tablo 25. FISH sonucu ile ERG pozitifliği arasındaki ilişki

		FISH			
		EWSR 1 (+)	EWSR 1 (-) / CIC (-)	EWSR1 (-) / CIC (+)	
		n (%)	n (%)	n (%)	P
ERG	Negatif	10 (45,5)	11 (84,6)	3 (60)	0.073*
	Pozitif	12 (54,5)	2 (15,4)	2 (40)	

*Pearson Ki-kare testi

Tablo 26. FISH sonucu ile ERG pozitifliği arasındaki ilişki

		Tanı		
		EWSR1 (-)	EWSR1 (+)	
		n (%)	n (%)	p
ERG	Negatif	14 (77,8)	10 (45,5)	**0.038***
	Pozitif	4 (22,2)	12 (54,5)	

*Pearson Ki-kare testi

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda immünohistokimyasal siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyinin; CRS, EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) sarkomlar, histopatolojik, immünohistokimyasal ve prognostik bulgularla ilişkisini inceledik.

CRS'ler, EWSR1 gen rearanjmanı içermeyen farklılaşma göstermeyen küçük yuvarlak hücreli sarkomlar grubunda yer almaktadır. Bu grupta tanımlanmış olan sarkomlar arasında en sık görülen sarkom olan CRS olgularına sıklıkla genç erişkinlerde karşılaşılmaktadır. Farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücreli sarkomların prototipi olan ES'ten klinik, histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak bir takım farklı özellikleri olsa da kesin tanı için gen rearanjmanının gösterilmesi gerekmektedir. Bunların yanı sıra CRS'lerin tümöral patogenezinde yer alan proteinler araştırılmaya devam edilmektedir. Hastalar ES tedavisine benzer tedavi protokolleri ile tedavi edilmekle birlikte tedaviye direnç oldukça yüksektir ve agresif gidişat gösterir (9-10, 12, 41).

Çeşitli kanserlerde artmış siklin E1 ekspresyonu düzeyinin kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (11). Sarkom grubunda osteosarkom ve kordomada yapılmış çalışmalar bulunmakla birlikte, farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücreli sarkom grubunda yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız bu konuda yapılmış olan ilk çalışmadır.

Çalışmamıza dahil edilen 40 olgunun yaş aralığı 4-63 (ortanca:22,5) olarak bulundu. Olguların 22'si (%55) EWSR1 (+) iken, 5'i (%12,5) CRS ve 13'ü EWSR1 (-) / CIC (-) olarak bulundu. *EWSR1* gen rearanjmanı içermeyen 18 olgu arasında CRS oranı %28 olarak bulduk. Italiano ve arkadaşları 22 EWSR1 (-) olgunun 15 tanesinde (%68) *CIC* gen rearanjmanını göstermişlerdir. Ancak yapmış oldukları çalışmada, daha önceden saptanmış çocukluk çağı ve genç erişkinlerde görülen sinovial sarkom ve diğer EWSR1 (-) tümörlere ait gen füzyonu saptanmış olan tümörleri çalışmaya dahil etmemişlerdir (8). Specht ve arkadaşları, *EWSR1* gen rearanjmanı ve sık görülen gen rearanjmanlarının içermeyen 33 olgunun 21'inde (%63) *CIC* rearanjmanını

saptamışladır (55). Çalışmamızdaki bu oranın daha düşük olmasının nedeninin, çocukluk çağı ve genç erişkinlerde görülen diğer gen rearanjmanlarını dışlamadan küçük yuvarlak hücreli sarkom tanısını almış olan tüm olguları dahil etmemizden kaynaklandığını düşündük.

Çalışmamızda, CIC (+) olan hastalarda siklin E1 skor 3 olan olguların yüzdesinin EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) grubuna göre daha yüksek olduğunu saptadık (p:0.004). Yine CIC (+) olan hastalarda siklin E1 yüksek ekspresyon gösteren olgu yüzdesini kalan iki gruba göre anlamlı olarak yüksek bulduk ($p<0.001$). Olguları EWSR1(+) ve EWSR1 (-) şeklinde iki ayrı grupta yeniden değerlendirdik. Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan grupta daha yüksek oranda EWSR1 negatifliği saptadık ($p<0.001$). Ayrıca siklin E1 skoru yüksek olan (Skor 2 ve Skor 3) olgularda EWSR1 negatifliğini anlamlı oranda yüksek bulduk ($p<0.001$). Siklin E1 proteini, hücre siklusunda G1/S fazı geçişinden sorumlu olan siklin E/ CDK2 kompleksindeki siklin E proteininin prototipidir (67, 68). Siklin E gen amplifikasyonu ve artmış protein ekspresyonu çeşitli mekanizmalarla replikasyon stresi, kromozomal instabilite ve genomik instabiliteye neden olarak tümörogenezde rol oynamaktadır (84). Okimoto ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, CIC::DUX4 sarkomlarda siklin E1 geninin upregüle olduğu gösterilmiştir. Ayrıca deneysel modellemelerde CIC::DUX4 sarkomlarda *CCNE1* geninin susturulması sonucu tümör büyümesinin yavaşladığı gözlenmiştir. Bu bulgular ile Siklin E1-CDK2 kompleksinin tedavide hedef olabileceği gösterilmiştir (12). Sonntag ve arkadaşlarının hepatosellüler karsinom ile ilgili yaptıkları deneysel çalışmada da *CCNE1* delesyonu sonucu tümör hücre sayısı ve kümülatif tümör çapında azalma saptamışlardır. Ancak ortalama ve ortanca tümör çaplarına etkisini gözlememişlerdir. Hepatosellüler karsinomda yüksek siklin E1 ekspresyonunun MYC, NRAS, AKT, ERBB2, MET, CDK1 gibi proliferatif yolakta yer alan belirteçlerle ilişkisi olduğunu göstermişler (99). Nakayama ve arkadaşları, 88 over karsinomunun 18'inde siklin E1 amplifikasyonu saptamışlardır. Bu çalışmada siklin E1 kopya sayısının immünohistokimyasal protein ekspresyonu ile anlamlı ilişkisi olduğunu göstermişlerdir (100). Literatürde CIC::DUX4 sarkomlarla birlikte CIC::FOXO4 ve CIC::NUTM1 sarkomların da transkripsiyonel yolakta ortak hedef genleri olduğu saptanmış ve bu nedenle siklin E1 ekspresyonunun tüm CIC-

rearranjman sarkomlarda genetik patogenezde rol oynadığı öne sürülmüştür (12). Ayrıca EWSR1 negatif ES benzeri tümörlerde ve CRS'lerde immünohistokimyasal siklin E1 ekspresyon durumunu gösteren çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız CRS'de ve EWSR1 negatif Ewing benzeri tümörlerde yüksek siklin E1 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak gösteren ilk çalışma olması nedeni ile önem teşkil etmektedir.

Hastaların siklin E1 skoru ve siklin E1 ekspresyon düzeyi ile cinsiyetleri arasında istatiksel anlamlı ilişki saptamadık (Sırası ile p:0.928 ve p:1.000). Bu bulgu Wei ve arkadaşlarının osteosarkom tanılı hastalarda yapmış oldukları çalışma sonucu ile uyumludur (98).

Çalışma grubunda siklin E1 skoru ile tanı anındaki yaş arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı (p: 0.012). Skor 0 ve 1 arasında ve skor 2 ile 3 arasında yaş açısından anlamlı fark yok iken; skor 2 ve 3 grubunun yaş ortalama ve ortanca değerleri, skor 0 ve skor 1 grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulduk. Siklin E1 ekpresyon düzeyi yüksek olan gruptaki olguların yaş ortalaması 38,7 ve ortanca yaş 42 iken ekspresyon düzeyi düşük olan gruptaki olguların ortalama yaşını 22,8 ve ortanca yaşını 20 olarak bulduk. Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan gruptaki olguların yaşlarının ortalama ve ortanca değerleri, düşük olan gruba göre anlamlı olarak daha yüksekti (p: 0.002). Rosen ve arkadaşlarının over karsinomlarında yapmış oldukları çalışmada, siklin E ekspresyonu ve tanı anındaki yaş arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmış. Siklin E ekspresyonu yüksek olan hastaların daha çok 60 yaşından büyük oldukları gözlenmiş (101). Wei ve arkadaşlarının osteosarkom olgularında yaptıkları çalışmada ise siklin E1 ekspresyon düzeyi ve yaş arasında istatistiksel anlamlı ilişki görülmemiş (98). Çalışmamızda siklin E1 ekspresyonu ve yüksek yaş arasındaki ilişkinin, yüksek siklin E1 ekspresyonu görülen olguların EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) gruplarda görülmesi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyi ile tümör lokalizasyonları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptadık (sırası ile p:0.003 ve p:0.005). Siklin E1 skoru 3

olan olguların hepsinin ve siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olguların %76,9'unun yumuşak dokuda yerleşimli olduğunu gözlemledik. Wei ve arkadaşları osteosarkom olgularının aksiyal iskelet ve apendiküler iskelet yerleşimi ile siklin E1 ekspresyonunu değerlendirmiş; ancak istatistiksel anlamlılık saptamamışlardır (98). Siklin E1 ekspresyon düzeyi tümör lokalizasyonları arasındaki ilişkinin nedeninin, yaş ile olan ilişkisinde olduğu gibi yüksek siklin E1 ekspresyonu görülen olguların EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) gruplarda görülmesi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Siklin E1 skoru 2 ve 3 olan yani ekspresyon düzeyi yüksek olan olguların %84,6'sı histomorfolojik olarak grup 2'de olma eğilimindeydi (Skor karşılaştırmasında anlamlılık değeri p:0.002 ve ekspresyon düzeyi karşılaştırmasında anlamlılık değeri <0.001). Siklin E1 skoru 2 ve 3 olan grupta olgular daha yüksek oranda miksoid stroma içermekle birlikte istatistiksel anlamlı ilişki tespit edilemedi (p:0.075). Ancak ekspresyon düzeyi yüksek olan 13 olgunun 7'sinde (%53,8) miksoid stroma saptadık. Siklin E1 ekspresyonu yüksek olan olgularda bir miktar daha fazla sıklıkta miksoid stroma gözlemledik ve bulgular istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,02). Tümör morfolojisi ve farklılaşma derecesi ile siklin E1 proteininin ekspresyon düzeyi arasında literatürde çelişkili sonuçlar yer almaktadır. Mishina ve arkadaşları küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında siklin E düzeyinin orta derecede ya da kötü diferansiye tümörlerde yüksek olma eğiliminde olduğunu göstermişlerdir; ancak bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildir (102). Pereira ve arkadaşlarının menenjiomlarda yaptıkları çalışmada; derece 2 olan tümörlerde, derece 1 tümörlere göre siklin E1 düzeyinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (103). Sonntag ve arkadaşları siklin E1 ekspresyon düzeyinin hepatosellüler karsinomların farklılaşma derecesi ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Derece 1 tümörlerde daha düşük siklin E1 ekspresyonu izlenirken, derece 2 tümörlerde orta düzeyde ve derece 3 tümörlerde daha yüksek siklin E1 ekspresyonu gözlemlemişlerdir. Bu ilişki derece 1 ve 2 tümörlerde CDK2'den bağımsız iken, derece 3 tümörlerde CDK2 ekspresyonunun da arttığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada siklin E1 ekspresyonunda azalma ile immünosupresyon gibi immün düzenleyici etkileri, kanser mikroçevresinde yer alan myeloid hücrelerin gelişiminde ve kanser ilişkili myofibroblastların sayısında ve aktivitesinde düşüş saptamışlardır (99). Özetle artmış siklin E1 aktivitesinin tümör

farklılaşmasında ve mikroçevresinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle çalışmamızdaki CIC (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) sarkomlarda, ES'te görülmesi beklenen klasik morfolojik bulgulardan farklı bulguların görülmesinin nedenlerinden birinin yüksek siklin E1 ekspresyon düzeyi olabileceğini düşündük.

Siklin E ekspresyon düzeyinin tümör gelişiminde ve farklılaşma derecesindeki rolü ile ilişkisini saptamak için yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmekle birlikte, çoğunlukla farklılaşma derecesi azaldıkça ekspresyon düzeyinin arttığı görülmüştür. Li ve arkadaşları kolorektal karsinomların gelişim basamağındaki siklin E rolü ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, siklin E ve CDK2 ekspresyonunu normal kolon mukozası, hiperplastik polip, adenom ve adenokarsinomda incelemişlerdir. Siklin E ekspresyonunun azalması ile büyük tümör çapı, müsinöz farklılaşma, artmış invazyon yeteneği ve malignite, yüksek hastalık evresi, venöz invazyon ve lenf nodu metastazının arttığını saptamışlardır. Ancak bu çalışmada siklin E ekspresyonunun karaciğer metastazı ile ilişkisi olmadığı görülmüştür (104). Del Pizzo ve arkadaşları ise ürotelyal karsinomlu hastalarda siklin E ekspresyonu azaldıkça histolojik agresifliğin ve tümör evresinin arttığını göstermişlerdir (105). Bunun aksine meme ve over karsinomlarında yapılmış olan çalışmalarda siklin E düzeyinin artması, yüksek tümör derecesi, artmış metastaz riski ve ileri hastalık evresi gibi kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (101, 106-107). Bu durum da bize siklin E ekspresyonunun prognoz ile ilişkisinin organdan organa değişebildiğini göstermektedir. Ayrıca yapılan tüm çalışmalarda kullanılan siklin E antikorunun klonalitesi ve immünohistokimyasal yorumlama kriterleri ile ilgili uzlaşı bulunmamaktadır. Lockwood ve arkadaşları osteosarkomun genetik patogenezinde siklin E1 ekspresyonu artışını gözlemlemişlerdir. İmmünohistokimyasal olarak %50 kriterini kullanarak tümör hücrelerinde boyanma skorlarını tanımlamışlardır (108). Wei ve arkadaşlarının osteosarkomda yapmış oldukları çalışmada, siklin E1'in tavşan poliklonal antikorunu ve nükleer-sitoplazmik ekspresyonunu değerlendirmişlerdir (98). Nakayama ve arkadaşları over karsinomlarında fare monoklonal antikorunu kullanarak boyanma şiddetlerini H-skor saptayarak yorumlamışlardır (100). Özetle siklin E1 immünohistokimyasal ekspresyonu ve tümörogenez arasındaki ilişkideki farklılıkların

nedenlerinden birinin de yorumlama kritelerindeki farklılıklardan da kaynaklanıyor olabileceğini düşündük.

Siklin E1 skoru ve ekspresyon düzeyi ile CD99 immünreaktivitesi arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptadık. Siklin E1 skoru 2 ve 3 olan gruptaki olgularda CD99 ile diffüz/yaygın ekspresyonu daha düşük oranda görülmekteydi (p: 0.012). Yine aynı şekilde siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan gruptaki olgularda, CD99 ile fokal ya da yamasal ekspresyon ile ekspresyon görülmemesi daha sık rastlanmaktaydı (p: 0.002). Siklin E1 ekspresyonunun EWSR1 (-) olguları saptamada duyarlılık ve özgüllüğünü hesapladığımızda; özgüllüğü %95,45 ve duyarlılığı %66,67 oranında bulduk. Siklin E1 ekspresyon düzeyinin CD99 ile birlikte kullanılmasının, farklılaşma göstermeyen küçük kuvarlak hücreli tümör grubunun tanı aşamasında, EWSR1 (-) sarkomları saptamada yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Siklin E1 skoru ile tanı anındaki metastaz varlığı arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptadık. Siklin E1 skoru 2 ve skor 3 olan gruptaki olgularda daha yüksek oranda metastaz gözlemledik (p:0.014). Karşılaştırmayı ekspresyon düzeyine göre yaptığımızda ise; ekspresyon düzeyi yüksek olan grupta tanı anında %66,7 oranında metastaz görülürken düşük olan grupta %18,5 oranında metastaz görüldü. Siklin E1 ekspresyonu yüksek olan grupta tanı anında metastaz oranı anlamlı olarak yüksek olarak bulundu (p:0.008). Sonntag ve arkadaşlarının, hepatosellüler karsinomda in vitro ve in vivo modellemelerinde, siklin E1 ekspresyonu baskılandığında, tümör hücrelerinde ve tümör çevresi stromada metastaz ile ilişkili belirteç olan Snai (snail family transcriptional repressor 1)'nin ekspresyonunun azaldığını saptamışlar (99). Kim ve arkadaşları ise p53 mutant gastrik adenokarsinomlarda artan siklin E1 ekspresyonunun karaciğer metastazı ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca NGS (Next Generation Sequencing) ile ekspresyon artışını gösterdikleri ve immünohistokimya uygulayabildikleri 14 olgunun 11 tanesinde skor 3, 1 tanesinde ise skor 2 ekspresyon tespit etmişlerdir (109). Siklin E1 ekspresyon düzeyi, tümör proliferasyonu ve tanı anındaki metastaz varlığı ile doğrusal ilişki göstermektedir. Bu nedenle, ulaşılması daha kolay bir yöntem olan immünohistokimyasal inceleme ile

yüksek siklin E1 ekspresyonunun gösterilmesinin, hastalığın prognozu ile ilgili önemli bilgi vereceğini düşünmekteyiz.

Sağ kalım analizi eksitus durumu ve eksitus tarihlerine ulaşılan 35 hasta için yapıldı. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ve sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (p: 0.283). Artmış siklin E1 immünohistokimyasal ekspresyonunun; overin şeffaf hücreli karsinomlarında, osteosarkomda, meme karsinomunda, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu ve kordomada kötü prognoz ve azalmış sağ kalım süreleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (98, 102, 106-107, 110). Nakayama ve arkadaşlarının seröz, müsinöz, şeffaf hücreli ve endometrioid karsinomu içeren olgu grubunda, FISH ile artmış siklin E1 ekspresyonu içeren olgularda yüksek siklin E1 ekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğunu göstermişlerdir. Ancak immünohistokimyasal yüksek siklin E1 ekspresyonunun görüldüğü olgularda sağ kalımda azalma gözlemlemekle birlikte istatistiksel anlamlı ilişki saptamamışlardır (100). Çalışmamızda klinik verilerine ulaşılabilen olgularda ölüm nedenlerinin başında enfeksiyon gelmekteydi. Ancak klinik verilerin yetersiz olması ve Covid-19 pandemisi gibi bağımsız risk faktörleri sağlıklı bir karşılaştırma yapmamıza engel oldu. Daha çok olgu sayısı ve uzun süreli takip sonucunda, siklin E1 ekspresyon düzeyinin sağ kalım ilişkisini değerlendirmek daha doğru olacaktır.

Siklin E1 gen amplifikasyonunun çeşitli organlarda kemoterapi rezistansı ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Liang ve arkadaşları, glioblastoma multiforme (GBM) tanılı hastalarda siklin E1'in Temozolomid (TMZ) direncinden rol oynadığını göstermişlerdir. Hücre kültüründe TMZ direnci olan GBM olgularında siklin E1 ekspresyonunu kemoterapiye duyarlı olan hücrelerden daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca siklin E1'in antiapopitotik bir protein olan Mcl-1 proteinininin yıkımını önleyerek TMZ tedavisinin antitümör etkisini engellediğini saptamışlardır (111). Hsu ve arkadaşlarının hepatosellüler karsinomda Sorafenib direnci ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, siklin E1'in gen ifadesinin susturulması ile Sorafenib'in tümör hücrelerini apoptozise yönlendirme etkisinin arttığı gözlemlemişlerdir. Siklin E1'in supresyonunun Sorafenib direncini azaltma üzerine etkisinin aynı zamanda Mcl-1 ile ilişkili olduğunu saptanmışlardır (112). Taylor-Harding ve arkadaşlarının hücre

kültüründe yapmış oldukları çalışmada ise yüksek dereceli seröz over karsinomlarında, yüksek Siklin E1 ekspresyonunun CDK4/6 inhibitörü olan Pablociclib direncine yol açtığını saptanmışlardır. Siklin E1 ekspresyonunun baskılandığı tümör hücrelerinde Paclociclib duyarlılığı gözlemlemişlerdir (113). CRS'lerde ve EWSR1 (-) farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücreli sarkomların büyük bir kısmının hala ES protokolleri ile tedavi edilmesi ve çoğu olguda kemoterapiye yanıtsızlık görülmesi bu grup tümörlerin en büyük problemlerinden biridir. Çalışmamızda her iki grupta da artmış siklin E1 ekspresyonunun, tedavi sonuçları hakkında fikir verebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki EWSR1 (+) grupta yer alan olgularda ES'te görülen klinik ve patolojik bulguları gördüğümüz için bu gruptaki olguları ES olarak değerlendirdik.

Çalışmamızdaki CRS olgularını 3 tanesini kadın, 2 tanesini ise erkek hasta oluşturmaktaydı. Literatürdeki en fazla olgu sayısına sahip olan çalışmada CRS'ın erkeklerde hafif derecede daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (10). Gambarotti ve arkadaşları ise E:K oranını ¾ olarak bildirmiştir (41). Yoshida ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da 14 erkek 6 kadın hastada CRS bildirilmiştir. Ancak CRS ve ES olguları arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark görülmemiştir (9). Çalışmamızda CRS (+) ve EWSR1 (+) sarkomlar arasında cinsiyet dağılımı istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p:0.455). CRS ve ES olgularının klinik ve histopatolojik bulgularını karşılaştıran çalışma sayısı sınırlı olduğu için bulgularımız küçük bir örneklemi temsil etmektedir.

Çalışmamızda *EWSR1* gen rearranjmanı gösteren olguların sadece bir tanesi 63 yaşında olup yaş aralığı 4-63 (median:20,5) ve ortalama yaş 22,68 (±11.5) olarak bulduk. Olguların 17 tanesi kemik, 5 tanesi (%23) ise yumuşak doku yerleşimliydi. Kemik lokalizasyonları ekstremitelerin uzun kemikleri, skapula ve klavikula iken; yumuşak doku yerleşim yerleri uyluk ve omuzun derin yumuşak dokuları olduğu gözlemlendi. Literatürde ES olgularının ilk 20 yılda görüldüğü bildirilmiştir. 30 yaşından sonra nadir görülmektedir ve görüldüğü zaman çoğunlukla yumuşak doku yerleşimli olduğu bildirilmiştir. Kemikte en sık ekstremitelerin uzun kemiklerinde

görülürler. Yumuşak doku yerleşimi %20-30 oranında bildirilmiştir (3, 33). EWSR1 (+) sarkomların klinik ve patolojik bulguları ES ile uyumluydu. Bu olgularda yaş dağılımı ve yerleşim yerine ait verileri literatürdeki çalışma sonuçları ile uyumlu olarak bulduk.

EWSR1 gen rearanjmanı içermeyen olgularımızda yaş aralığı 11-61 (median:29) arasında ortalama yaş 34,4 (±17.3) olarak bulundu. Olguların 13 tanesi yumuşak doku yerleşimli iken 5 tanesi kemik yerleşimliydi. CRS olgularının yaş aralığı 18-44, median yaş 29 ve ortalama yaş 31,2 ±11,5 olarak saptadık. Olguların 4 tanesi ekstremitelerin derin yumuşak dokusu ve 1 tanesi ise aksillada yerleşim göstermekteydi. CRS, geniş bir yaş aralığında görülebilmekle birlikte 4. dekatta pik yapmaktadır. Literatürde median yaş 25-35 olarak bildirilmiştir. (9-10, 41). Çalışmamızdaki olguların yaş aralığı ve yerleşim yeri literatürde bildirilmiş geniş olgu serileri ile benzerlik göstermektedir.

CRS'nin ortanca ve ortalama yaşlarının EWSR1 (+) tümörlere göre daha yüksek saptamamıza rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlemedik (p:0.127). Yoshida ve arkadaşlarının yapmış olduğu karşılaştırma çalışmasında, çalışmamızda olduğu gibi olguların yaşları ve tanı arasında anlamlı bir ilişki saptamamışlardır (9). Ancak olguları EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) olarak iki gruba ayırdığımızda, EWSR1 (+) tümörlerin ortanca ve ortalama yaşları EWSR1 (-) tümörlerden anlamlı olarak daha düşüktü (p: 0.043).

Tümörlerin histopatolojik bulguları ve tanı arasındaki ilişkiyi incelediğimizde, *EWSR1* gen rearanjmanı gösteren tümörler, ES'te ek sık görülen klasik morfolojik bulguları içermekteydi. CRS'lerin hepsinde ES'te görülen klasik morfolojik bulguların yanı sıra daha atipik ve pleomorfik alanlar izledik ve bulgular istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$). CRS olgularında, nükleuslarda vezikülerleşme, nükleer pleomorfizmde artış, daha sık nükleol belirginliği, epiteloid hücreler ve fokal alanlarda bizaar hücreler dikkati çekmekteydi. Grupları EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) olarak ayırdığımızda ise; EWSR1 (+) tümörlerin histomorfolojisi %81,8 oranında Grup 1'de yer alırken EWSR1 (-) tümörlerin %22,2'sinde Grup 1 histopatolojik bulgular tespit

edildi. EWSR1 (-) tümörler, EWSR1 (+) tümörlere göre daha agresif morfolojiler göstermekteydi (p<0.001). Yoshida ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, CRS'lerde klasik yuvarlak oval nükleuslu monoton hücreli alanlar görülmekle birlikte; tümör hücrelerinde fokal alanlarda nükleer boyutta artış ve belirgin nükleol tariflemişlerdir. Ayrıca stromadaki desmoplazinin fokal da olsa ES'ye göre daha belirgin olduğunu gözlemlemişlerdir (9). Antonescu ve arkadaşları da aynı şekilde klasik ve monoton görünümde histomorfolojik bulgular içeren olguların yanında, multifokal alanlarda nükleol belirginliği, epiteloid/rabdoid hücre morfolojisindeki tümör alanları ve tümör içerisinde hafif/orta derecede pleomorfizm tariflemişlerdir (10). Gambarotti ve arkadaşları da aynı şekilde CRS'nin ES'ye göre pleomorfizm ve atipinin daha sık görüldüğünü bildirmişlerdir (41).

EWSR1 (+) tümörlerin %18,2'sinde, CRS'lerin %60'ında ve EWSR1 (-) / CIC (-) tümörlerin %30,8'inde miksoid stroma saptadık. Miksoid stroma ve FISH sonucu arasında anlamlı ilişki gözlemlemedik (p:0.159). Karşılaştırmayı EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) gruplar arasında yaptığımızda da miksoid stroma ve tanı arasında anlamlı ilişki bulmadık (p: 0.173). Miksoid stroma CRS için karakteristik bulgudur (114). Alexiev ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları EWSR1/FLI1 füzyonunun görüldüğü ES olgusunda, tümörün yaklaşık %50'sinden fazlasında miksoid stroma gözlemlemişlerdir (115). EWSR1 gen rearanjmanı içeren tümörlerin büyük bir bölümünü ES oluştursa da miksoid stroma nadir görülen EWSR1-ETS dışı füzyonlarından EWSR1::NFATC2 sarkomların histopatolojik bir bulgusudur (36). Ayrıca çalışmamızda EWSR1 (+) tümör grubunda miksoid stromanın izlendiği 4 olguya ait dokular KT sonrası eksizyona ait dokulardı. KT'nin de etken olabileceğini düşünmekteyiz.

CRS'nin 3 tanesinde (%60), EWSR1(-) / CIC (-) sarkomların 8 tanesinde (%66,7) tanı anında metastaz izlenirken EWSR1 (+) tümörlerin 2 tanesinde (%2) tanı anında metastaz saptadık (p:0.001). Karşılaştırmayı EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) olarak iki ayrı grupta yaptığımızda ise EWSR1 (-) tümörler EWSR1 (+) tümörlere göre tanı anında metastaz oranının daha yüksek olduğunu bulduk (p<0.001). ES olgularında metastaz odakları sıklıkla akciğer, kemik ve kemik iliğidir. CRS'de ES'ye göre tanı

anında metastaz daha sık görülmektedir. En sık metastatik odak akciğer olmakla birlikte beyin, kemik ve lenf nodu metastazları da rapor edilmiştir (116). Çalışmamızda yer alan CRS'de tanı anındaki metastaz odakları 3 olguda da akciğerdi. Olguların birinde eş zamanlı kemik ve inguinal lenf nodu metastazı da bulunmaktaydı. EWSR1 (+) olguların 2 tanesinde metastatik odak akciğer ve humerustu.

Çalışmamızda yer alan CRS'nin hepsinde CD99 ile ekspresyon izledik; ancak ekspresyon paternleri yaygın sitoplazmik dot-like, yamasal ya da fokal membranöz ekspresyon şeklindeydi. Diffüz membranöz ekspresyon görülmedi. EWSR1 (+) tümörlerde CD99 ile yaygın ya da diffüz membranöz ekspresyon görülme oranını CRS'ye göre anlamlı olarak yüksek olarak bulduk ($p<0,001$). CRS'de diffüz membranöz ekspresyon görülebilir; ancak literatürde bildirilmiş olan olgu serilerinin büyük bir kısmında fokal ya da yamasal CD99 ekspresyon bildirilmiştir (9-10, 41, 54). ES olgularında ise sıklıkla CD99 ile diffüz membranöz ekspresyon görülmektedir (1).

EWSR1 gen rearanjmanı varlığı ile FLI1 immünohistokimyasal pozitifliği arasında, üçlü ve ikili değerlendirme grupları arasında istatistiksel anlamı ilişki görülmedi (Sırası ile p:0.711 ve p:0.476). Üçlü karşılaştırma grubunda ERG ile gen rearanjmanı arasında anlamlı ilişki saptamadık (0.073). Ancak ikili karşılaştırma grubunda EWSR1 (+) tümörlerde EWSR1 (-) olan gruba göre immünohistokimyasal ERG pozitifliğinin görülme sıklığı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (p:0.038). *EWSR1::ERG* füzyonu görülen ES olgularında, ERG immünohistokimyasal boyanmasının sensitif ve spesifik olduğu gösterilmiştir (29). ES olgularında FLI1 ekspresyonu da sık görülür; ancak CD99 ile birlikte tanı değeri artmaktadır (24). CRS'de de değişen sıklıklarda FLI1 ve ERG pozitifliği bildirilmiştir (9, 55). CRS olgularında FLI1 ve ERG pozitifliğinin tanıyı belirlemede yeri bulunmamaktadır.

Çalışmamızda olgu sayısının azlığı çalışmanın kısıtlılık faktörlerinden biridir. *EWSR1* gen rearanjmanını göstermede FISH ile incelemenin RT-PCR'a göre daha duyarlı olmakla birlikte FISH ile *EWSR1* gen rearanjmanı gösterilemeyen olgularda RT-PCR yönteminin yardımcı olabileceği gösterilmiştir. Dolayısı ile *EWSR1* gen aranjmanını göstermede birlikte kullanılmaları önerilmektedir (117). Ayrılma FISH

yöntemi CRS olgularının büyük bir çoğunluğunu tespit etmekle birlikte Miettinen ve arkadaşları, sitogenetik analiz ile tespit edilemeyen bazı CRS olgularının bu yöntemle kaçırılmış olabileceğini bildirmişlerdir (49). Yoshida ve arkadaşları ise ayrılma FISH yönteminin CRS olgularını saptamadaki yanlış negatiflik oranını %14 olarak raporlamışlardır (118). Bu nedenle olguları yalnızca ayrılma FISH ile değerlendirebilmiş olmamız çalışmanın ikinci kısıtlılığıdır. Ayrıca EWSR1 (-) / CIC (-) gruptaki tümörlerin moleküler düzeyde spesifiye edilememesi, siklin E1 ekspresyonunun görüldüğü diğer yuvarlak hücreli tümörleri tespit etmemizi önlemiştir. Tüm bunlara rağmen literatürde CRS'ler ile ilgili çalışma sayısı kısıtlıdır. Patogenezindeki belirsizlikler, agresif klinik gidişat, belirli tedavi protokolünün olmaması ve kemoterapiye yanıtsızlık nedeni ile halen aktif olarak araştırılmaktadır. Artmış siklin E1 ekspresyonu birçok organda tümöründe kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir. CIC::DUX4 sarkomlarda siklin E1 geni ekpresyonundaki artışı gösteren tek bir çalışma vardır; ancak immünohistokimyasal ekspresyonunu inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca siklin E1 ekspresyonu ile ilgili yapılan çalışmalardaki tümör grubunun büyük bir çoğunluğunu epitelyal tümörler oluşturmaktadır. Çalışmamızın zayıf yönlerine rağmen, EWSR1 (+), EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) sarkomlarda yapılmış olan ilk çalışma olması nedeni ile önemli bir yere sahip olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, yuvarlak hücreli sarkomlarda, CIC rearanjman sarkom (CRS) oranını ve Siklin E1 ile *EWSR1* gen rearanjmanı ilişkisini inceledik. Olgularımızda *EWSR1* ve *CIC* gen rearanjmanları araştırıldı. FISH sonuçlarına göre olgularımız *EWSR1* gen rearanjmanı saptanan olgular EWSR1 (+) ve *CIC* gen rearranjmanı saptanan olgular ise CIC (+) (CRS) olarak gruplandırıldı. *EWSR1* ve *CIC* gen rearanjmanı görülmeyen olgular ise EWSR1 (-) / CIC (-) olarak gruplandırıldı. Sonuçlar klinik ve patolojik verilerle birlikte değerlendirildi.

1. Çalışmamızda yer alan 40 olgunun %55'inde *EWSR1* gen rearranjmanı ve %12,5'inde *CIC* gen rearanjmanı saptadık; ancak olguların %32,5'inde EWSR1 ve CIC gen rearanjmanı görülmedi.

2. EWSR1 (+) olguların %4,5'inde, EWSR1 (-) ve CIC (-) olguların %61,5'inde ve CRS olgularının %80'inde siklin E1 ekspresyon düzeyini yüksek olarak saptadık. CRS olgularında, EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) olgularına göre siklin E1 ekspresyon düzeyi anlamlı olarak daha yüksekti.

3. Karşılaştırmayı EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) sarkomlar arasında yaptığımızda; EWSR1 (-) olguların %66,7'sında ve EWSR1 (+) olguların ise %4,5'inde Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksekti. Siklin E1 ekspresyon düzeyi düşük olan olgularda EWSR1 pozitifliği, ekspresyon düzeyi yüksek olan olgulara göre anlamlı olarak daha yüksekti.

4. Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan olguların, ekspresyon düzeyi düşük olan olgulara göre yaş ortalaması anlamlı olarak daha yüksekti.

5. Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan olguların yumuşak doku yerleşimli, Siklin E1 ekspresyon düzeyi düşük olanların ise daha çok kemik yerleşimli olma eğiliminde olduğu saptandı.

6. Siklin E1 ekspresyon düzeyi düşük olan gruptaki olgularda daha çok klasik ES histopatolojisi izlenirken, ekspresyon düzeyi yüksek olan olgularda daha atipik histolojik bulgular izlendi ve bulgular istatistiksel olarak anlamlıydı.

7. Siklin E1 skor 2 ve 3 olan olgular daha yüksek oranda miksoid stroma içerme eğilimindeydi; ancak miksoid stroma ve Siklin E1 skoru arasında anlamlı ilişki

saptanmadı. Karşılaştırma Siklin E1 ekspresyon düzeyi açısından yapıldığında; Siklin E1 ekpsresyon düzeyi yüksek olan gruptaki olgularda miksoid stroma varlığı anlamlı olarak daha yüksekti.

8. Siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan olgularda, Siklin E1 ekspresyon düzeyi düşük olan olgulara göre tanı anında metastaz varlığı anlamlı ölçüde daha yüksekti.

9. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile CD99 boyanma paterni arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. Siklin E1 ekspresyon düzeyi düşük olan olgularda, CD99 ile yaygın ya da diffüz sitoplazmik-membranöz ekspresyon görülme oranı, siklin E1 ekspresyon düzeyi yüksek olan olgulara göre anlamlı oranda daha fazlaydı.

10. Siklin E1 ekspresyon düzeyi ve sağ kalım arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. Daha geniş olgu serilerinde yeniden çalışılması önerilir.

11. Yüksek siklin E1 ekspresyonunun *EWSR1* gen rearanjmanı içermeyen farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücreli sarkomları saptamada duyarlılığını %66,67 ve özgüllüğünü %95,45 oranında bulduk.

12. *EWSR1* gen rearanjmanı göstermeyen sarkomlar arasında CRS oranını %28 olarak bulduk. Bu oran, literatürdeki çalışmalarda bildirilmiş olan %60 oranından daha düşüktü.

13. Çalışmamızdaki EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) sarkomlarda erkek cinsiyet baskın iken CRS olgularında E:K oranı 2:3 idi. Cinsiyet dağılımları açısından her üç EWSR1 (+), EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) grupları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı.

14. CRS olgularının yaş ortalaması *EWSR1* gen rearanjmanı görülen olgulara göre daha yüksekti ancak istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı.

15. CRS olgularında EWSR (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) olgularına göre yumuşak doku yerleşimi anlamlı oranda daha yüksekti.

16. CRS olgularında, EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) olgulara göre pleomorfizm ve atipi bulgularının görülme oranı anlamlı derecede yüksekti.

17. EWSR1 (+), EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) gruplar arasında miksoid stroma görülme oranı açısından anlamlı fark saptanmadı.

18. CRS olguların 3 tanesinde tanı anında metastaz görüldü. Metastaz odaklarının hepsi akciğerdi ve bulgular literatürdeki çalışmalar ile uyumluydu.

19. EWSR1 (-) tümörlerde EWSR1 (+) tümörlere göre tanı anında metastaz görülme oranı anlamlı oranda yüksekti.

20. CRS'lerin hepsinde CD99 ile fokal ya da yamasal membranöz ekspresyon gözledik. EWSR1 (+) sarkomların ise %13,6'sında ve EWSR1 (-) / CIC (-) sarkomların %69,2'sinde CD99 ile boyanma paterni negatif grupta yer alıyordu. CRS'lerde görülen CD99 immünohistokimyasal ekspresyon paterni EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) / CIC (-) tümörlere göre anlamlı oranda farklılık göstermekteydi ($p<0.001$).

21. EWSR1 (+), EWSR1 (-) / CIC (-) ve CIC (+) sarkomlar arasında FLI1 ve ERG ekspresyonu açısından istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi. Karşılaştırmayı EWSR1 (+) ve EWSR1 (-) gruplarında yaptığımızda; EWSR1 (+) tümörlerde EWSR1 (-) tümörlere göre ERG pozitifliği anlamlı oranda yüksekti. Ancak FLI1 ekspresyonu ile istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

22. Özet olarak çalışmamızda yüksek Siklin E1 ekspresyon düzeyi ile *EWSR1* gen rearanjmanı negatifliği arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı. Ayrıca siklin E1 ekspresyon düzeyi ile hastanın yaşı, tümör lokalizasyonu, tümörün histopatolojik bulguları ve tanı anında metastaz varlığı ile doğrusal ilişkiyi de göstermiş olduk. Yüksek immünohistokimyasal siklin E1 ekspresyonunun *EWSR1* gen rearanjmanı görülmeyen farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücreli sarkomları tespit etmede yardımcı olacağını ve kötü prognostik belirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. D'Cruze, Lawrence, Dutta, Ruma, Rao S et al. The Role of Immunohistochemistry in the Analysis of the Spectrum of Small Round Cell Tumours at a Tertiary Care Centre. J Clin Diagnostic Res [Internet]. 2013 [cited 2020 Dec 1];7(7):1377–82. Available from: www.jcdr.net
2. Seningen JL, Inwards CY. Small Round Cell Tumors of Bone. Surg Pathol Clin [Internet]. 2012;5(1):231–56. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2011.10.003
3. Board WC of TE. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and Bone Tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. 2020. 322–332 p.
4. Kallen ME, Hornick JL. The 2020 WHO Classification What ' s New in Soft Tissue Tumor Pathology ? 2020;00(00):1–23.
5. Davis JL, Rudzinski ER. Small Round Blue Cell Sarcoma Other Than Ewing Sarcoma: What Should an Oncologist Know? Curr Treat Options Oncol. 2020;21(11):1–10.
6. Ozaki T. Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article. J Orthop Sci. 2015;20(2):250–63.
7. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors - 7th Edition [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 27]. 1175–1194 p. Available from: https://www.elsevier.com/books/enzinger-and-weisss-soft-tissue-tumors/goldblum/978-0-323-61096-4
8. Italiano A, Sung YS, Zhang L, Singer S, Maki RG, Coindre J-M, et al. High prevalence of CIC fusion with double-homeobox (DUX4) transcription factors in EWSR1-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. Genes, Chromosom Cancer [Internet]. 2012 Mar;51(3):207–18. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gcc.20945
9. Yoshida A, Goto K, Kodaira M, Kobayashi E, Kawamoto H, Mori T, et al. CIC-rearranged Sarcomas A Study of 20 Cases and Comparisons with Ewing Sarcomas. Am J Surg Pathol [Internet]. 2016 Mar;40(3):313–23. Available from: https://journals.lww.com/00000478-201603000-00003

10. Antonescu CR, Owosho AA, Zhang L, Chen S, Deniz K, Huryn JM, et al. Sarcomas With CIC-rearrangements are a distinct pathologic entity with aggressive outcome: A clinicopathologic and molecular study of 115 cases. Am J Surg Pathol [Internet]. 2017;41(7):941–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28346326%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5468475
11. Fagundes R, Teixeira LK. Cyclin E/CDK2: DNA Replication, Replication Stress and Genomic Instability. Front Cell Dev Biol. 2021;9(November):1–11.
12. Okimoto RA, Wu W, Nanjo S, Olivas V, Lin YK, Ponce RK, et al. CIC-DUX4 oncoprotein drives sarcoma metastasis and tumorigenesis via distinct regulatory programs. J Clin Invest. 2019;129(8):3401–6.
13. Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. Proc New York Pathol Soc 1921 CA Cancer J Clin. 1972;22:95–8.
14. Jaffe R, Santamaria M, Yunis EY, Tannery NH, Agostini Jr RM, Medina J, et al. The neuroectodermal tumor of bone. 1984;8(12):885–98.
15. Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, et al. Ewing's Sarcoma Family of Tumors: Current Management. Oncologist. 2006;11(5):503–19.
16. Cash T, Mcllvaine E, Krailo MD, Lessnick SL, Lawlor ER, Laack N, et al. Comparison of Clinical Features and Outcomes in Patients with Extraskeletal Versus Skeletal Localized Ewing Sarcoma: Report from the Children ' s Oncology Group. Pediatr Blood Cancer. 2016;63(10):1771–9.
17. Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Soft Tissue Tumors. 2021 [cited 2022 Jan 19]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
18. Protocol for the Examination of Biopsy Specimens From Patients With Soft Tissue Tumors. 2021 [cited 2022 Jan 19]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
19. Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Primary Tumors of Bone. 2021 [cited 2022 Jan 19]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols

20. Protocol for the Examination of Biopsy Specimens From Patients With Primary Tumors of Bone. 2021 [cited 2022 Jan 19]; Available from: www.cap.org/cancerprotocols
21. Kemik ve Eklem Patolojisi [Internet]. [cited 2020 Dec 11]. Available from: https://www.kongrekitabevi.com/kemik-ve-eklem-patolojisi-multidisipliner-yaklasim
22. Alava E De. Ewing Sarcoma, an Update on Molecular Pathology with Therapeutic Implications. Surg Pathol [Internet]. 2017;10:575–85. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2017.04.001
23. Yumuşak Doku Tümörleri [Internet]. [cited 2020 Dec 11]. Available from: https://www.kongrekitabevi.com/yumusak-doku-tumorleri
24. Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P, Alberghini M, et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: An immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. Virchows Arch. 2009;455(5):397–411.
25. Kikuchi Y, Kishimoto T, Ota S, Kambe M, Yonemori Y, Chazono H, et al. Adamantinoma-like ewing family tumor of soft tissue associated with the vagus nerve: A case report and review of the literature. Am J Surg Pathol. 2013;37(5):772–9.
26. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 Is a Specific Marker for Ewing's Sarcoma and Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumors. Cancer. 1991;67:1886–93.
27. Pasello M, Manara MC, Scotlandi K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology. J Cell Commun Signal. 2018;12(1):55–68.
28. Llombart-Bosch A, Navarro S. Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteins in ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumors: Comparative analysis with CD99 (MIC-2) expression. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2001;9(3):255–60.
29. Wang WL, Patel NR, Caragea M, Hogendoorn PCW, López-Terrada D, Hornick JL, et al. Expression of ERG, an Ets family transcription factor, identifies ERG-rearranged Ewing sarcoma. Mod Pathol. 2012;25(10):1378–83.

30. Yoshida A, Sekine S, Tsuta K, Fukayama M, Furuta K, Tsuda H. NKX2.2 is a useful immunohistochemical marker for ewing sarcoma. Am J Surg Pathol. 2012;36(7):993–9.
31. Lessnick SL, Ladanyi M. Molecular Pathogenesis of Ewing Sarcoma: New Therapeutic and Transcriptional Targets Stephen. Annu Rev Pathol. 2012;7:145–59.
32. Hung YP, Fletcher CDM, Hornick JL. Evaluation of NKX2-2 expression in round cell sarcomas and other tumors with EWSR1 rearrangement: Imperfect specificity for Ewing sarcoma. Mod Pathol. 2016;29(4):370–80.
33. Sbaraglia M, Righi A, Gambarotti M, Dei Tos AP. Ewing sarcoma and Ewing-like tumors. Virchows Arch. 2020;476(1):109–19.
34. Delattre, O.; Zucman, J.; Plougastel, B.; Desmaze, C.; Melot, T.; Peter, M.; Kovar, H.; Joubert, I.; de Jong, P.; Rouleau G. Gene Fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocaton in human tumours. Nature. 1992;359:162–5.
35. Delattre O, Zucman J, Melot T, Sastre GX, Zucker J-M, Lenoir GM, et al. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. N Engl J Med. 1994;331(5):294–9.
36. Antonescu C. Round cell sarcomas beyond Ewing : emerging entities. Histopathology. 2014;64:26–37.
37. Romeo S, Dei Tos AP. Soft tissue tumors associated with EWSR1 translocation. Virchows Arch. 2010;456:219–34.
38. Sorensen PHB, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. Nat Genet. 1994;6(2):146–51.
39. Ginsberg BJP, Alava E De, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, et al. EWS-FLI1 and EWS-ERG Gene Fusions Are Associated With Similar Clinical Phenotype Similiar Ewing's Sarcoma. J Clin Oncol. 1999;17(6):1809–14.

40. Strauss SJ, Frezza AM, Abecassis N, Bajpai J, Bauer S, Biagini R, et al. Bone sarcomas: ESMO–EURACAN–GENTURIS–ERN PaedCan Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2021;32(12):1520–36.
41. Gambarotti M, Benini S, Gamberi G, Cocchi S, Palmerini E, Sbaraglia M, et al. CIC–DUX4 fusion-positive round-cell sarcomas of soft tissue and bone: a single-institution morphological and molecular analysis of seven cases. Histopathology. 2016;69(4):624–34.
42. Brčić I, Brodowicz T, Cerroni L, Kashofer K, Serbanescu GL, Kasseroler MT, et al. Undifferentiated round cell sarcomas with CIC-DUX4 gene fusion: expanding the clinical spectrum. Pathology. 2020;52(2):236–42.
43. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D, et al. New Entities Emerging With Molecular Studies of CNS Embryonal Tumours. Cell. 2016;164(5):1060–72.
44. Ko JS, Marusic Z, Azzato EM, Farkas DH, Van Arnam J, Seiwerth S, et al. Superficial sarcomas with CIC rearrangement are aggressive neoplasms: A series of eight cases. J Cutan Pathol. 2020;47(6):509–16.
45. Owosho AA, Estilo CL, Huryn JM, Zhang L, Fletcher CDM, Antonescu CR. Head and Neck Round Cell Sarcomas: A Comparative Clinicopathologic Analysis of 2 Molecular Subsets: Ewing and CIC-Rearranged Sarcomas. Head Neck Pathol. 2017;11(4):450–9.
46. Vieira AC, Xavier CB, Vieira TD, Carvalho FM, Scaranti M, Munhoz RR, et al. CIC-DUX4 rearranged uterine cervix round-cell sarcoma exhibiting near-complete pathologic response following radiation and neoadjuvant chemotherapy: A case report. Gynecol Oncol Reports [Internet]. 2021;36:100745. Available from: https://doi.org/10.1016/j.gore.2021.100745
47. Sedighim S, Burke J, Schneider D, Kamdjou T, Diaz-Perez JA, Trent J, et al. CIC-rearranged round cell (Ewing-like) sarcoma of the uterus: Review of the literature. Gynecol Oncol Reports [Internet]. 2020;33(February):100592. Available from: https://doi.org/10.1016/j.gore.2020.100592

48. Maekawa A, Matsunobu T, Nabeshima A, Fukushima S, Makihara K, Hisaoka M, et al. Cardiac tamponade as an unusual initial clinical manifestation of cic-dux4 sarcoma. Am J Case Rep. 2021;22(1):1–5.
49. Miettinen M, Felisiak-Golabek A, Luiña Contreras A, Glod J, Kaplan RN, Killian JK, et al. New fusion sarcomas: histopathology and clinical significance of selected entities. Hum Pathol [Internet]. 2019;86:57–65. Available from: https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.12.006
50. Sugita S, Arai Y, Tonooka A, Hama N, Totoki Y, Fujii T, et al. A Novel CIC-FOXO4 Gene Fusion in Undifferentiated Small Round Cell Sarcoma. Am J Surg Pathol. 2014;38(11):1571–6.
51. Hung YP, Fletcher CDM, Hornick JL. Evaluation of ETV4 and WT1 expression in CIC-rearranged sarcomas and histologic mimics. Mod Pathol [Internet]. 2016;29(11):1324–34. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2016.140
52. Le Guellec S, Velasco V, Pérot G, Watson S, Tirode F, Coindre JM. ETV4 is a useful marker for the diagnosis of CIC-rearranged undifferentiated round-cell sarcomas: A study of 127 cases including mimicking lesions. Mod Pathol [Internet]. 2016;29(12):1523–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2016.155
53. Le Loarer F, Pissaloux D, Watson S, Godfraind C, Galmiche-Rolland L, Silva K, et al. Clinicopathologic features of CIC-NUTM1 sarcomas, a new molecular variant of the family of CIC-fused sarcomas. Am J Surg Pathol. 2019;43(2):268–76.
54. Yoshimoto T, Tanaka M, Homme M, Yamazaki Y, Takazawa Y, Antonescu CR, et al. CIC-DUX4 induces small round cell sarcomas distinct from Ewing sarcoma. Cancer Res. 2017;77(11):2927–37.
55. Specht K, Sung Y, Zhang L, Richter GHS, Fletcher CD, Antonescu CR. Distinct Transcriptional Signature and Immunoprofile of CIC- DUX4–Fusion Positive Round Cell Tumors Compared to EWSR1- Rearranged Ewing Sarcomas – Further Evidence Toward Distinct Pathologic Entities. Genes Chromosom Cancer. 2014;53(7):622–33.

56. Richkind KE, Romansky SG, Finklestein JZ. t(4;19)(q35;q13.1): A recurrent change in primitive mesenchymal tumors? Cancer Genet Cytogenet. 1996;87:71–4.
57. Kawamura-Saito M, Yamazaki Y, Kaneko K, Kawaguchi N, Kanda H, Mukai H, et al. Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. Hum Mol Genet. 2006;15(13):2125–37.
58. Krom YD, Thijssen PE, Young JM, den Hamer B, Balog J, Yao Z, et al. Intrinsic Epigenetic Regulation of the D4Z4 Macrosatellite Repeat in a Transgenic Mouse Model for FSHD. PLoS Genet. 2013;9(4):e1003415.
59. Smith SC, Buehler D, Choi EYK, McHugh JB, Rubin BP, Billings SD, et al. CIC-DUX sarcomas demonstrate frequent MYC amplification and ETS-family transcription factor expression. Mod Pathol [Internet]. 2015;28(1):57–68. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2014.83
60. Kao Y, Sung Y, Chen C, Zhang L, Dickson BC, Swanson D, et al. ETV transcriptional upregulation is more reliable than RNA sequencing algorithms and FISH in diagnosing round cell sarcomas with CIC gene rearrangements. Genes, Chromosom Cancer [Internet]. 2017 Jun;56(6):501–10. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/gcc.22454
61. Huang S, Zhang L, Sung Y, Chen C, Kao Y-C, Agaram NP, et al. Recurrent CIC Gene Abnormalities in Angiosarcomas: A Molecular Study of 120 Cases with Concurrent Investigastion of PLCG1, KDR, MYC, and FLT4 Gene Alterations. Am J Surg Pathol [Internet]. 2016 May;40(5):645–55. Available from: https://journals.lww.com/00000478-201605000-00009
62. Sugita S, Arai Y, Aoyama T, Asanuma H, Mukai W, Hama N, et al. NUTM2A-CIC fusion small round cell sarcoma: a genetically distinct variant of CIC-rearranged sarcoma. Hum Pathol [Internet]. 2017;65:225–30. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2017.01.012
63. Abukhdeir AM, Park BH. p21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. Expert Rev Mol Med [Internet]. 2008 Jul 1;10:e19. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2678956/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2678956/pdf/nihms-70444.pdf

64. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. Nat Rev Cancer. 2009;9(3):153–66.
65. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. Annu Rev Biochem. 1992;61:441–70.
66. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. Nat Rev Cancer. 2001;1(3):222–31.
67. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem Sci. 2005;30(11):630–41.
68. Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. Cell. 1991;66(6):1217–28.
69. Inoue K, Fry EA. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. Biomark Cancer. 2016;8:25–42.
70. Lauper N, Beck ARP, Cariou S, Richman L, Hofmann K, Reith W, et al. Cyclin E2: A novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. Oncogene. 1998;17(20):2637–43.
71. Caldon CE, Musgrove EA. Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer. Cell Div. 2010;5(2):1–13.
72. Kok YP, Guerrero Llobet S, Schoonen PM, Everts M, Bhattacharya A, Fehrmann RSN, et al. Overexpression of Cyclin E1 or Cdc25A leads to replication stress, mitotic aberrancies, and increased sensitivity to replication checkpoint inhibitors. Oncogenesis [Internet]. 2020;9(10). Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41389-020-00270-2
73. Geng Y, Lee YM, Welcker M, Swanger J, Zagozdzon A, Winer JD, et al. Kinase-Independent Function of Cyclin E. Mol Cell. 2007;25(1):127–39.
74. Honda R, Lowe ED, Dubinina E, Skamnaki V, Cook A, Brown NR, et al. The structure of cyclin E1/CDK2: Implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles. EMBO J. 2005;24(3):452–63.
75. Sherr CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. Cell. 1994;79(4):551–5.
76. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell. 1995;81(3):323–30.

77. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. Exp Cell Res. 1997;237(1):1–6.
78. Siu KT, Rosner MR, Minella AC. An integrated view of cyclin E function and regulation. Cell Cycle. 2012;January 1;(1):57–64.
79. Ribeiro ARG, Salvadori MM, De Brot L, Bovolin G, Mantoan H, Ilelis F, et al. Retrospective analysis of the role of cyclin E1 overexpression as a predictive marker for the efficacy of bevacizumab in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. Ecancermedicalscience. 2021;15:1–17.
80. Siddiqui K, On KF, Diffley JFX. Regulating DNA Replication in Eukarya. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(9):1–20.
81. Coverley D, Laman H, Laskey RA. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. Nat Cell Biol. 2002;4(7):523–8.
82. Morris L, Allen KE, La Thangue NB. Regulation of E2F transcription by cyclinE-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. Nat Cell Biol. 2000;2(4):232–9.
83. Ogryzko V V., Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell. 1996;87(5):953–9.
84. Chu C, Geng Y, Zhou Y, Sicinski P. Cyclin E in normal physiology and disease states. Trends Cell Biol [Internet]. 2021;31(9):732–46. Available from: https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.05.001
85. Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. J Biol Chem [Internet]. 2003;278(28):25752–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M301774200
86. Sheaff RJ, Groudine M, Roberts JM. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27 Kip1. 1997;11:1464–78.
87. Ma T, Van Tine BA, Wei Y, Garrett MD, Nelson D, Adams PD, et al. Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. Genes Dev. 2000;14(18):2298–313.

88. Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Gregory Matera A, Fletcher JA, et al. NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. Genes Dev. 2000;14(18):2283–97.
89. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. Cell. 2000;103(1):127–40.
90. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature. 2006;444(7119):633–7.
91. Ekholm-Reed S, Méndez J, Tedesco D, Zetterberg A, Stillman B, Reed SI. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. J Cell Biol [Internet]. 2004 [cited 2021 Dec 25];165(6):789–800. Available from: http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200404092
92. Bester AC, Roniger M, Oren YS, Im MM, Sarni D, Chaoat M, et al. Nucleotide Deficiency Promotes Genomic Instability in Early Stages of Cancer Development. Cell [Internet]. 2011 Apr 29 [cited 2021 Dec 26];145(3):435. Available from: /pmc/articles/PMC3740329/
93. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. Oncogene. 2005;24(17):2776–86.
94. Spruck CH, Won KA, Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. Nature. 1999;401(6750):297–300.
95. Teixeira LK, Wang X, Li Y, Ekholm-Reed S, Wu X, Wang P, et al. Cyclin e deregulation promotes loss of specific genomic regions. Curr Biol [Internet]. 2015;25(10):1327–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.022
96. Jones RM, Mortusewicz O, Afzal I, Lorvellec M, García P, Helleday T, et al. Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. Oncogene. 2013;32(32):3744–53.
97. Macheret M, Halazonetis TD. Intragenic origins due to short G1 phases underlie oncogene-induced DNA replication stress. Nature. 2018;555(7694):112–6.

98. Wei R, Thanindratarn P, Dean DC, Hornicek FJ, Guo W, Duan Z. Cyclin E1 is a prognostic biomarker and potential therapeutic target in osteosarcoma. J Orthop Res. 2020;38(9):1952–64.
99. Sonntag R, Penners C, Kohlhepp M, Haas U, Lambertz D, Kroh A, et al. Cyclin E1 in murine and human liver cancer: A promising target for therapeutic intervention during tumour progression. Cancers (Basel). 2021;13(22).
100. Nakayama N, Nakayama K, Shamima Y, Ishikawa M, Katagiri A, Iida K, et al. Gene amplification CCNE1 is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer. Cancer. 2010;116(11):2621–34.
101. Rosen DG, Yang G, Deavers MT, Malpica A, Kavanagh JJ, Mills GB, et al. Cyclin E expression is correlated with tumor progression and predicts a poor prognosis in patients with ovarian carcinoma. Cancer. 2006;106(9):1925–32.
102. Mishina T, Dosaka-Akita H, Hommura F, Nishi M, Kojima T, Ogura S, et al. Cyclin E expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. Clin Cancer Res. 2000;6(1):11–6.
103. Pereira BJA, Santana Júnior PA de, de Almeida AN, Cavalcante SG, de Melo KCM, de Aguiar PHP, et al. Cyclin E1 expression and malignancy in meningiomas. Clin Neurol Neurosurg [Internet]. 2020;190(December 2019):105647. Available from: https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2019.105647
104. Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y. Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. Hum Pathol. 2001;32(9):945–53.
105. Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC, Kyprianou N. Loss of cell cycle regulators p27(Kip1) and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. Am J Pathol. 1999;155(4):1129–36.
106. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, et al. Cyclin E and Survival in Patients with Breast Cancer. N Engl J Med [Internet]. 2002 Nov 14;347(20):1566–75. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021153

107. Ayhan A, Kuhn E, Wu RC, Ogawa H, Bahadirli-Talbott A, Mao TL, et al. CCNE1 copy-number gain and overexpression identify ovarian clear cell carcinoma with a poor prognosis. Mod Pathol. 2017;30(2):297–303.
108. Lockwood WW, Stack D, Morris T, Grehan D, O'Keane C, Stewart GL, et al. Cyclin E1 is amplified and overexpressed in osteosarcoma. J Mol Diagnostics [Internet]. 2011;13(3):289–96. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.020
109. Kim B, Shin HC, Heo YJ, Ha SY, Jang KT, Kim ST, et al. CCNE1 amplification is associated with liver metastasis in gastric carcinoma. Pathol Res Pract [Internet]. 2019;215(8):152434. Available from: https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152434
110. Wei R, Dean DC, Thanindratarn P, Hornicek FJ, Guo W, Duan Z. Prognostic Significance of Cyclin E1 Expression in Patients With Chordoma: A Clinicopathological and Immunohistochemical Study. Front Oncol. 2020;10(November).
111. Liang H, Chen Z, Sun L. Inhibition of cyclin E1 overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by Mcl-1 degradation. Mol Carcinog [Internet]. 2019;58(8):1502–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/mc.23034
112. Hsu C, Lin LI, Cheng YC, Feng ZR, Shao YY, Cheng AL, et al. Cyclin E1 inhibition can overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma cells through Mcl-1 suppression. Clin Cancer Res. 2016;22(10):2555–64.
113. Taylor-Harding B, Aspuria PJ, Agadjanian H, Cheon DJ, Mizuno T, Greenberg D, et al. Cyclin E1 and RTK/RAS signaling drive CDK inhibitor resistance via activation of E2F and ETS. Oncotarget. 2015;6(2):696–714.
114. Carter CS, Patel RM. Important Recently Characterized Non-Ewing Small Round Cell Tumors. Surg Pathol Clin [Internet]. 2019;12(1):191–215. Available from: https://doi.org/10.1016/j.path.2018.10.008
115. Alexiev BA, Obeidin F, Jennings LJ. Ewing sarcoma with myxoid stroma: Case report of an unusual histological variant. Pathol - Res Pract [Internet]. 2019 Dec;215(12):152665. Available from: https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152665

116. Lewis TB, Coffin CM, Bernard PS. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Mod Pathol. 2007;20(3):397–404.
117. Noujaim J, Jones RL, Swansbury J, Gonzalez D, Benson C, Judson I, et al. The spectrum of EWSR1-rearranged neoplasms at a tertiary sarcoma centre; Assessing 772 tumour specimens and the value of current ancillary molecular diagnostic modalities. Br J Cancer [Internet]. 2017;116(5):669–78. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.4
118. Yoshida A, Arai Y, Kobayashi E, Yonemori K, Ogura K, Hama N, et al. CIC break-apart fluorescence in-situ hybridization misses a subset of CIC-DUX4 sarcomas: a clinicopathological and molecular study. Histopathology [Internet]. 2017 Sep;71(3):461–9. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/his.13252

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Berna KARABULUT

Doğum yeri ve tarihi :

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu : Bekar

E-mail- Telefon :

Yabancı dili : İngilizce

II- Eğitimi

2017-2022	Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi
2015-2017	İç Hastalıkları Uzmanlık Eğitimi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi
2007-2014	Tıp Fakültesi Eğitimi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
	Üniversite İngilizce Hazırlık Eğitimi: Ankara Ünivesitesi Yabancı Diller Yüksekokulu
2004-2007	Orta Öğretim: Eskişehir Fatih Fen Lisesi
1996-2004	İlköğretim: Türközü İlköğretim Okulu
	Gazipaşa İlköğretim Okulu
	Bisaş İlköğretim Okulu
	Ahmet Uyar İlköğretim Okulu
	Özel Yeni Kültür İlköğretim Okulu

III- Ünvanları

- Tıp Doktoru (2014).

IV- Mesleki Deneyimi

Tıbbi Patoloji Uzmanlık Eğitimi: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji Bölümü- Araştırma Görevlisi (07.10.2017- Devam ediyor)

İç Hastalıkları Uzmanlık Eğitimi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı- Araştırma Görevlisi (21.01.2015-06.10.2017)

T.C Sağlık Bakanlığı Oltu Devlet Hastanesi-Acil Servis-Tabip (23.09.2014-20.01.2015)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Ankara Patoloji Derneği
- Patoloji Dernekleri Federasyonu
- Avrupa Patoloji Derneği

VI- Bilimsel Çalışmalar

1-**Karabulut B**: Röportaj, Prof.Dr.Yücel Kanpolat. Cerrahpaşa Öğrenci Bilimsel Dergisi Güz sayısı: 77-81, 2009.

2- **B.Karabulut**, A.M. Sonmez, D.Turan, N.Kursun, A. Ensari: Updates of TNM classification: for the better or worse? Intercongress Meeting of the European Society of Pathology, Poster Session. Virchows Arch (2010) 457:270.

Bildiri:

1- Midede Nadir Bir Tümör: Mikropapiller Karsinom, Olgu Sunumu, 2018 Ulusal Patoloji Kongresi

Berna KARABULUT, Nazan BOZDOĞAN

2- İzole Klavikula Metastazı Yapan Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom, Olgu Sunumu, 2018 Ulusal Patoloji Kongresi

Berna KARABULUT, Fatma MARKOÇ

3- Tümöral Kalsinozis: Olgu Sunumu, Olgu Sunumu, 2018 Ulusal Patoloji Kongresi

Berna KARABULUT, Fisun ARDIÇ YÜKRÜK

VII- Diğer Bilgiler Sertifikalar ve Yeterlilik Belgeleri: -

EKLER

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Berna KARABULUT
Uzmanlık Dalı:	Tıbbi Patoloji
Eğitim Kurumu:	SBÜ Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi:	09.10.2017
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi:	09.10.2021
Program Yöneticisinin Adı Soyadı:	Prof. Dr. Sibel YENİDÜNYA
Tez Danışmanının Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Prof. Dr. Olçay KANDEMİR
Tez Danışmanının Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Uzm. Dr. Fisun ARDIÇ YÜKRÜK
Tez Danışmanının Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU

EK 1. TEZ KONUSU ONAY FORMU

*Araştırma/Tez Konusu (StudyTitle) CIC-rearanjman Sarkomlarda Siklin-E1 ekspresyonunun Ewing Sarkomlar ile Ayırıcı Tanısındaki Önemi, Klinik, Histomorfolojik ve İmmünhistokimyasal Parametrelerle İlişkisi
1-Araştırma Sorusu (Research problem) CIC-rearanjman Sarkomlarda Siklin-E1 immünohistokimyasal ekspresyonunun sıklığı nedir? Siklin- E1 ekspresyonunun CIC-rearanjman Sarkomlar ve Ewing Sarkomların ayırıcı tanısında önemi var mıdır? Siklin-E1 ekspresyonun klinik ve patolojik verilerle ilişkisi nedir?
2-Arka Plan ve Gerekçe (Background/rationale) Ewing Sarkomu değişik derecelerde nöroektodermal farklılaşma gösteren yuvarlak hücreli sarkomdur. Genetik olarak kromozom 22 üzerinde yerleşimli EWSR1 geninin kromozom 11 üzerinde yerleşim gösteren ETS transkripsiyon faktör ailesindeki genler (Çoğunlukla FLI-1 olmak üzere) ile resiprokal translokasyonu sonucu oluşur. ETS ailesine ait ERG (%10), ETV1 (<%1) ve ETV4 (<%1) gibi diğer transkripsiyon genleri de mevcuttur ancak bu genler ile füzyon genellikle az oranda görülmektedir (Sırası ile %10, <%1 ve <%1). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2013 baskısında Andiferansiye Yuvarlak Hücreli Sarkomlar, belirli yönde farklılaşmanın olmadığı ve genetik anomalinin belirlenmediği; nispeten monoton görünümde yuvarlak/oval sitomorfolojide yüksek nükleer: sitoplazmik orana sahip sarkom grubudur. Yine bu sarkom grubu çoğunlukla Ewing Sarkomu'na benzediği için rutin pratikte ve tedavi amaçlı olarak Andiferansiye Yuvarlak Hücreli Sarkomlar Ewing-benzeri Sarkomlar olarak düşünülüp o şekilde tedavi edilmektedir. Bu sarkom grubunda klasik Ewing Sarkom'da görülen moleküler belirteç olan EWSR1-ETS füzyonu görülmemektedir. Bu sarkomlarla ilgili çok fazla bilgiye sahip olunmasa da yuvarlak hücreli sarkomların ikinci ek sık görülen varyantıdır ve vakaların %11 ini oluşturur. Bu sebeple Ewing benzeri sarkomların CIC-rearanjman Sarkomlar, BCOR-rearanjman sarkomlar, EWSR1 geni ve ETS ailesine ait olmayan gen ailesinin füzyonu ile oluşan sarkomlar ve Andiferansiye Yuvarlak Hücreli Sarkomlar olmak üzere 4 ana sınıfı belirlenmiştir. CIC-rearanjman sarkomlar içerisinde en sık görülen gen transfüzyonu CIC::DUX4'tür. CIC::DUX4 transfüzyon geni t(4;19)(q35;q13) ya da t(10;19)(q26;q13) transloklasyonları sonucu oluşur (2). CIC geni Drosophila capicua'nın insandaki homogudur. CIC geni, reseptör tirozin kinaz sinyal yolağının down-regülasyonuna sebep olan Yüksek Mobility Group (HMG) -box proteinlerini içeren transkripsiyon baskılayıcı proteinleri kodlar. DUX4 geni ise double-homeobox transkripsiyon faktörünü kodlar. Genellikle germ-line

hücrelerde ekspresyonunun izlendiği DUX4 geninin ekspresyonu somatik hücrelerde baskılanır.

(4;19)(q35;q13.1) translokasyonunu içeren ilk vaka 1996 yılında ayrı bir sitogenetik anomali olarak Richkind ve arkadaşları tarafından 12 yaşındaki erkek çocukta ayak bileğindeki yumuşak doku kitlesinde saptanmıştır. Aynı anda akciğer metastazının görüldüğü hasta 10 ay içerisinde vefat etmiştir (4). 2012 yılında Italiano A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CIC::DUX4 geninin sadece t(4;19)(q35;q13) translokasyonundan oluşmadığı ayrıca t(10;19)(q26;q13) translokasyonu sonucunda da oluştuğu gösterilmiştir. Ardından 2014 yılında ise Sugita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CIC-rearanjman sarkom ailesine t(X;19)(q13;q13.3) translokasyonu sonucu oluşan CIC-FOXO4 füzyon sarkomu dahil edilmiş. Yine Sugita S. ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınlanan çalışmalarında, 10.kromozomda yerleşimli (10q23) NUTM2A ekzon 7 bölgesi ile 19. Kromozomda (19q13) yerleşim gösteren CIC geninin ekzon 12 bölgesinin füzyonu sonucu oluşan NUTM2A-CIC füzyon sarkomu gösterilmiş. Bu sarkomların benzer histomorfolojik ve immünohistokimyasal profil sergilediği saptanmış.

DSÖ'nün 2013 baskına göre Ewing sarkomu ailesindeki tümörler içerisinde sınıflandırılan CIC-rearanjman sarkomlar güncel baskıda ayrı bir kategoride değerlendirilmektedir. Gelişmekte olan klinik, patolojik ve genetik kanıtlar bu sarkom grubunun Ewing Sarkomu'ndan önemli farklılıklarının olduğunu işaret etmektedir. CIC-rearanjman sarkomlar geniş bir yaş grubunu etkiler (6-81) ve erkek cinsiyette hafifçe daha sık gözlenir. Vakaların %90'ı ekstremite, gövde/pelvisin yumuşak dokusunda saptanırken yaklaşık %10'u iç organlarda görülmektedir. Ewing Sarkomlu hastalarda vakaların çoğu kemiklerde görülürken CIC-rearanjman tümörlerin sadece çok az bir kısmı kemik dokuda izlenmektedir

Mikroskopik olarak değerlendirildiğinde, CIC-rearanjman sarkomlarda çoğunlukla büyük tümör lobüllerini ayıran kalın hyalin bantlardan oluşan büyüme paterni sık gözlenmektedir. En azından fokal miksoid stromanın izlenmesi yine farklı olan bulgularındandır. Tümör hücreleri çoğunlukla yuvarlak/oval morfolojidedir; sık karşılaşılmasa da minör morfoloji olarak rabdoid ya da plazmositoid morfoloji görülebilir (yaklaşık %25 oranında). Daha nadir oranda (yaklaşık %10) ise iğsi hücreli komponent görülmektedir. Klasik Ewing sarkomlar ile karşılaştırılınca CIC-rearanjman sarkomlarda veziküler kromatin, belirli nükleol ve artmış pleomorfizm izlenmektedir. Daha geniş eozinofilik sitoplazma görülmesi sık izlenen bir bulgudur ve şeffaf hücreli değişiklikler görülebilir. Ewing Sarkomda görülen Homer-Wright rozetleri gibi nöroektodermal farklılaşma bulguları izlenmez. Mitotik aktivite 10 BBA'da ortalama 30 kadar yüksek izlenir.

İmmünhistokimyasal olarak incelendiğinde CIC::DUX4 sarkomlar CD99 ile sıklıkla ekspresyon göstermezler ya da fokal zayıf membranöz ekspresyon izlenir; çok az sayıda vakada diffüz ekspresyon mevcuttur. Nükleer ETV4 ve WT1

ekspresyonu sıklıkla izlenmektedir (8). ERG ve FLI1 eskpresyonu ise klasik ES lerde görüldüğü gibi CIC::DUX4sarkomların çoğunda izlenmektedir.

Klinik seyir ve prognozu karşılaştırmak için yapılan çeşitli çalışmalardan; Antonescu ve arkadaşlarının 2017'de yapmış olduğu kohort çalışmasında 115 tane CIC-rearanjman hastada klinik olarak takip edebildikleri 57 hasta ile Ewing Sarkomu tanısı konmuş yaş ve patolojik evrenin benzer olduğu 57 hasta karşılaştırılmış. CIC-rearanjman tümörler agresif klinik gidişat ve başta akciğer olmak üzere yüksek metastatik özelliklere sahip olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş. 5 yıllık sağ kalım oranı tüm grupta %43 iken ve tanı anında lokalize hastalığın tespit edildiği vakalarda %49 oranında tespit edilmiş. Total sağ kalım, 5 yıllık sağ kalım oranının %79 olduğu hastalık evresi ve yaş olarak benzer olan Ewing Sarkomlu kohort grubundaki hastalara göre oldukça düşük olarak bulunmuş. Bu sonuçların daha önce yapılmış olan diğer kohort çalışmaları ile uyumlu olduğu gözlenmiş.

Ross A. Okimoto ve arkadaşları 2019'da yapmış oldukları çalışmada, CIC::DUX4 füzyon geninin kanser onkogenezisindeki rolünü araştırılmış. CIC::DUX4 füzyon sarkomlarda hücre siklusunda önemli rollere sahip ETV4 ve Siklin-E1'in ekspresyonunun artışının tümör metastazındaki ve sağ kalımdaki etkilerini direkt kontrol ettiği gösterilmiş. Geliştirdikleri in-vitro ve in-vivo modellerde ETV4 supresyonu sonucu akciğer metastazlarında düşüşün olduğu görülmüş.

İmmünhistokimyasal olarak gösterilebilen ETV4 upregülasyonunun tümör invazyonu ve metastazından rol aldığı ancak tümör büyümesi ve apoptozda herhangi bir fonksiyonu olmadığı sonucuna varmışlar. Siklin E1 ekspresyonu artışında ise Siklin E1'e karşı özel ilaç olmadığı için siklin bağlayıcı protein Siklin Kinaz D2'ye karşı geliştirilmiş kemoterapötik ilaç kullanılmış. Sonuç olarak ETV4'ten farklı olarak Siklin E1'in artışının Siklin E1-Siklin Kinaz D2 kompleksi ile tümör büyümesi ve apoptozda önemli rol oynadığı görülmüş (10).Yeni bazı araştırmalarda ise diğer CIC-rearanjman tümörlerden CIC-FOXO4 ve CIC-NUTM1 füzyon sarkomlarında da ortak transkripsyonel yolakları paylaştıkları tespit edilmiş (11). Bu sebeple Okimoto ve arkadaşları CIC-rearanjman sarkomlarda belirtilen CIC geninin transkripsiyon inhibitörü yerine aktivite ettiğini desteklediğini düşünmüşler. Siklin E1-Siklin kinaz D2 kompleksine karşı geliştirilecek olan tedavinin bu sarkom grubunda önemli yere sahip olacağı fikrini ortaya atmışlar.

Özetle, CIC-rearanjman sarkom grubu Ewing Sarkom'dan morfolojik, immünohistokimyasal profil, klinik gidişat ve sağkalımsal olarak farklıdır. Hala Ewing Sarkomu'na benzer neoadjuvan kemoterapi ile tedavi edilenbu tümörlerin %70'inde zayıf patolojik yanıt görülmüştür (2). DSÖ'nün Nisan 2020'de yayınlanmış Yumuşak Doku ve Kemik Tümörleri kitabında CIC-rearanjman sarkomlar ayrı bir kategoride içerisinde belirtilmiştir; ancak gelişmekte olduğu vurgulanmıştır. Siklin E1 proteinindeki artışın tümör patogenezinde ve tedaviye yön vermede önemli olduğu düşünülürse; biz bu çalışmamızda, Siklin E1

proteininin artışının pahalı ve erişimi zor olan moleküler yöntemlerin yerine immünohistokimyasal yöntemleri kullanarak göstermeyi amaçladık.

3-Araştırma amacı (Objectives)

CIC-rearanjman sarkomlarda Siklin-E1 immünohistokimyasal ekspresyonu sıklığını saptanması

Siklin E-1 immünohistokimyasal ekspresyon profilinin Ewing Sarkomu ve CIC-rearanjman sarkomların ayırıcı tanısındaki yerinin olup olmadığının belirlenmesi

4-Hipotez (Hypothesis)

Çalışmamızda araştıracağımız Siklin-E1 immünohistokimyasal pozitifliğinin CIC-rearanjman sarkomların ayırıcı tanısında ve dolayısı ile klinisyenlerin tedaviyi belirlemesinde önemli yeri olabileceğine inanıyoruz.

5-Araştırma türü/tasarım (Study Design)

Çalışmamız prospektif, analitik ve kesitsel bir çalışma olarak dizayn edilmiştir.

6- Araştırma yeri (StudySetting/ Location)

Tek Merkez/ Dr Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji SUAM Tıbbi Patoloji Kliniği

7- Araştırmaya katılanlar/denekler (StudyPopulation)

Dahil etme kriterleri;

Çalışmamızda Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji SUAM Tıbbi Patoloji Kliniği'nde 1 Ocak 2012- 1 Temmuz 2020 tarihleri arasında 80 adet ilk tanısı Küçük Yuvarlak Hücreli Malign Tümör olan vakalar arasından Ewing-Benzeri Sarkom veya Ewing Sarkomu olarak yorumlanmış vakalar seçilecektir.

Hariç tutma kriterleri;

Parafin bloklarına ve kayıtlarına ulaşılamayan olgular
Dekalsifikasyon işlemine maruz kalmış olgular
Biyopsi veya ameliyat materyaline ait bloklarda yeterli tümör hücresi içermeyen olgular

8- Araştırmanın birincil ve ikincil sonuç değişkenleri (Primary and Secondary Outcome)

Birincil değişken;

Ewing Sarkomlarda ve CIC-rearanjman sarkomlarda Siklin-E1 ekspresyonu

İkincil değişken;

Patolojik parametreler: Ewing Sarkomu ve CIC-rearanjman sarkomlarda Siklin-E1 ekspresyonu ile histomorfolojik profilin karşılaştırılması

Klinik veriler: Ewing Sarkomu'nda ve CIC-rearanjman Sarkomlarda; hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün yerleşim yeri ve tanı anında metastaz varlığı Siklin-E1 ekspresyonunun ilişkisi

9- Araştırma Süreçleri (Studyprocedures)

Hematoksilen-Eozin boyalı kesitler iki patolog tarafından değerlendirilmiş ve uyuşmazlık içermeyen vakalar çalışma için uygun bulunmuştur.

Araştırmada daha önce belirtilen kriterlere göre dahil edilen hastalara ait tanı anındaki yaş, cinsiyet, tümörün yerleşim yeri ve tanı anında metastaz varlığı not edilecektir. Hastaların ameliyat/biyopsi materyallerine ait Hematoksilen&Eozin boyalı lamlar yeniden incelenecektir. Tümör hücrelerinin nükleer ve sitoplazmik özellikleri, tümör stromasının özellikleri ve nekroz varlığı değerlendirilecek ve not edilecektir. Daha önce uygulanmış olan immünohistokimyasal yöntemler içerisinde CD99 boyanma paterni, FLI-1 ve ERG ile ekspresyonları yeniden incelenip not edilecektir. Parafin bloklarda 3 mm çapındaki 15-20 adet kuyucuk açılarak seçilen bloklardan alınan dokular bu kuyucuklara haritalanarak gömülecektir. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 3 µm'lik kesitler, polyl-Lysin'li lamlara alınacak ilk olarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabili Dalı'nda EWSR1 gen translokasyonu varlığını araştırmak için Floresan In-situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi ile floresan miroskopta değerlendirilecektir. EWSR1 gen translokasyonu olmayan vakalarda FISH yöntemi ile CIC rearanjmanı varlığına bakılacaktır. Tüm vakalara hastanemiz patoloji laboratuvarında Siklin-E1 immünohistokimyasal antikoru uygulanarak ekspresyon varlığı ve paterni ışık mikroskobu ile değerlendirilecektir.

Tüm bu parametreler değerlendirilerek EWSR1 (+) Sarkomlar, EWSR1 (-) CIC-rearanjman sarkomlar ve EWSR1 (-) CIC rearanjmanın görülmediği sarkomlar arasında karşılaştırma yapılacaktır. Gerekli istatistiksel yöntemler uygulanarak değerlendirilicektir.

10-Örnek büyüklüğü ve istatistiksel güç (Sample size and statistical power)

Bu çalışmada için 80 hasta belirlenmiştir. Çalışma sırasında dışlama kriterleri ile çalışmaya uygun olmayan hastalar çıkarıldıktan sonra çalışmadaki son hasta sayısı belirlenecektir.

11- İstatistiksel yöntemler (Statistical methods) Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package fort he SocialSciences) Windows 16.0 paket programı kullanılarak yapılacaktır. Karşılaştırmak için Kruskal-Wallis test, Ki-kare, ManWithney U test ve Sperman korelasyonu testi uygun olduğu şekilde uygulanacaktır. Tanımlayıcı istatistik yöntemlerinin (ortalama, standart sapma) normal dağılımını değerlendirmek için Kolmogorov Smirnov testi ve Skewness-Kurtosis testi kullanılacaktır. P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.
12-Etik Öngörü (Ethical Considerations) Çalışmamız, Helsinki deklarasyonu ve denek araştırma etik kuraları ile çelişmemekte ve İyi Klinik Uygulama (Good Clinical Practice) ilkelerine de uygundur.
13- Anahtar kelimeler (Keywords) Küçük Yuvarlak Hücreli Malign Tümör, CIC-rearanjman sarkom, Siklin-E1, Ewing Sarkomu

Kontrol edilmiştir ve uygundur.

(Tez Danışmanı) Prof. Dr. Sibel YENİDÜNYA

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	CIC-rearanjman Sarkomlarda Siklin-E1 ekspresyonunun Ewing Sarkomlar ile Ayırıcı Tanısındaki Önemi, Klinik, Histomorfolojik ve İmmünhistokimyasal Parametrelerle İlişkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 2020-09/819**	**Tarih: 23.09.2020**
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. Lütfi DOĞAN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *	
Prof. Dr. Lütfi DOĞAN	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Mustafa ARSLAN	Fizyoloji/Anestezi	Gazi Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☒	H ☐
Prof. Dr. F. Nur BARAN AKSAKAL	Halk Sağlığı	Gazi Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Tolga Reşat AYDOS	Farmakoloji	Başkent Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Merih KIZIL ÇAKAR	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Nazan ÇİLEDAĞ GÖKBAYRAK	Radyoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Uzm. Dr. Ebru ATASEVER AKKAŞ	Radyoterapi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Erdem ÖZTÜRK	Üroloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Op. Dr. Hakan BULAK	Genel Cerrahi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Uzm. Dr. Özlem ŞEN	Anestezi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Uzm. Dr. Bahar UNCU ULU	Hematoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Ayşe OCAK DURAN	Tıbbi Onkoloji	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Uzm. Dr. Recep ÖZTÜRK	Ortopedi	SBÜ Ankara Onkoloji SUAM	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Av. Arzu BATUR	Avukat	Ankara İl Sağlık Md	E ☐	K ☒	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Uzm. Fiz. Müh. Dinçer YEĞEN								

*:Toplantıda Bulunma

EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	CIC-rearanjman Sarkomlarda Siklin-E1 ekspresyonunun Ewing Sarkomlar ile Ayırıcı Tanısındaki Önemi, Klinik, Histomorfolojik ve İmmünhistokimyasal Parametrelerle İlişkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ DR. ABDURAHMAN YURTARSLAN ONKOLOJİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	
	TELEFON	0 312 336 96 81
	FAKS	0 312 336 96 81
	E-POSTA	

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Sibel YENİDÜNYA			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Patoloji Kliniği			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji SUAM			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☒		
		Diğer ise belirtiniz			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐