

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AYIRICI TANI ZORLUĞU YAŞANAN
PEDİATRİK KANSERLERDE MİKRODİZİN
SİSTEMİ İLE KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK
HİBRİDİZASYONLA TÜM KROMOZOMLARDA
ANOMALİ TARANMASININ YERİ**

HÜLYA TOSUN YILDIRIM

TEMEL ONKOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2015970056

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AYIRICI TANI ZORLUĞU YAŞANAN
PEDİATRİK KANSERLERDE MİKRODİZİN
SİSTEMİ İLE KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK
HİBRİDİZASYONLA TÜM KROMOZOMLARDA
ANOMALİ TARANMASININ YERİ**

TEMEL ONKOLOJİ

DOKTORA TEZİ

**HÜLYA TOSUN
YILDIRIM**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr.Safiye Aktaş

Bu araştırma Türkiye Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) tarafından finansal olarak desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI. PhD-2015970056

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı
Doktora programı öğrencisi **Hülya TOSUN YILDIRIM**'ın, '**AYIRICI
YAŞANAN PEDIATRİK KANSERDE MİKRODİZİN SİSTEMİ İLE KARŞILAŞTIRMALI
GENOMİK HİBRİDİZASYONLA TÜM KROMOZOMLARDA ANOMALİ TARANMASININ
YERİ**' konulu Doktora Tezinin **17.07.2019** tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Zekiye ALTUN
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji AD

Prof. Dr. Mukaddes GÜMÜŞTEKİN
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD

Prof. Dr. Hasan HAVİTÇIOĞLU
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Ortopedi ve Travmatoloji AD

Prof. Dr. Gülten DİNİZ
ÜYE
Demokrasi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji AD

Doç. Dr. Nükhet ELİYATKIN
ÜYE
Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji
Enstitüsü Temel Onkoloji AD

Prof. Dr. Kemal ERGİN
YEDEK ÜYE
Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD

Prof. Dr. Nur OLGUN
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Pediatrik Onkoloji BD

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2. Araştırmanın Hipotezleri.....	6
2. GENEL BİLGİLER.....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Araştırmanın tipi	12
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	12
3.3. Araştırmanın evreni ve örneklemi.....	12
3.4. Çalışma materyali	12
3.5. Araştırmanın değişkenleri.....	15
3.6. Veri toplama araçları	15
3.7. Araştırma planı ve takvimi.....	15
3.8. Verilerin değerlendirilmesi.....	15
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	15
3.10. Etik Kurul Onayı	16
4. BULGULAR.....	17
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	33
7. KAYNAKLAR	34
8. EKLER.....	39

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Araştırma takvimi	15
Tablo 2. Hastaların demografik verileri	17
Tablo 3. ES/ PNET hastaları arasında KGH ile saptanan sık görülen kopya sayı değişiklikleri	21
Tablo 4. NB hastaları arasında KGH ile saptanan sık görülen kopya sayı değişiklikleri.....	22
Tablo 5. İMT hastaları arasında KGH ile saptanan sık görülen kopya sayı değişiklikleri.	24
Tablo 6. Tanısı konan olgulardaki farklı ve sık rastlanan kopya sayı değişiklikleri.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. KGH yönteminin şematik hali.....	13
Şekil 2. Olguların tanı gruplarına göre dağılımı.....	18
Şekil 3 Olguların cinsiyete göre dağılımı	18
Şekil 4. Tümörlerin lokalizasyona göre dağılımı	19
Şekil 5. ES/ PNET tümör hücrelerinin boyanma profili	19
Şekil 6. Nöroblastomun kemik iliği metastazı (HEX 200).....	20
Şekil 7. RT olduğu düşünülen indiferan malign tümör (HEX 400).....	22
Şekil 8. DKYHT olduğu düşünülen indiferan malign tümör (HEX 100).....	23
Şekil 9. RMS olduğu düşünülen indiferan malign tümör (HEX 100).	23

KISALTMALAR

ICCC	: Uluslararası çocuk kanserleri sınıflaması
TPOG	: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu
SSS	: Santral Sinir Sistemi
ES	: Ewing Sarkom
PNET	: Primitif Nöroektodermal Tümör
DKYHT	: Dezmozplastik Küçük Yuvarlak Hücreli Tümör
RT	: Rabdoid Tümör
FISH	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
NB	: Nöroblastom
RMS	: Rabdomyosarkom
KGH	: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
srGAP2	: SLIT-ROBO Rho GTPaz aktive edici protein
RGPD5	: RANBP2 benzeri GRIP alanı
NPHP1	: Nefrosistin 1
GTF2IRD2	: GTF2I tekrar alanı 2
PXDC1	: Piridoksal bağımlı dekarboksilaz alanı 1
ANKRD30A	: Ankyrin Repeat Domain 30A
PTPN20	: Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 20
USP22	: Ubiquitin Spesifik Peptidaz 22
CAMK2B	: Calcium/ calmodulin dependent protein kinase II beta
NPK	: Nükleer Pore Kompleksi
CypB	: Siklofilin B
PPIase	: Peptidil-Prolil Cis-Trans İzomerase
CypA	: Siklofilin A
HERC2	: RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 geni
TDO2	: Tryptophan 2,3-dioxygenase

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Safiye Aktaş ve hocam Prof.Dr. Gülden Diniz’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Verilerin değerlendirilmesinde ve analizinde yardımcı olan Burçin Baran ve Tekincan Çağrı Aktaş’a teşekkür ederim.

Her zaman hoşgörü, sabır ve desteği ile yanımda olan eşim, oğlum ve aileme çok teşekkür ederim.

Hülya TOSUN YILDIRIM

AYIRICI TANI ZORLUĞU YAŞANAN PEDIATRİK TÜMÖRLERDE MİKRODİZİN TABANLI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYONLA TÜM KROMOZOMLARDA ANOMALİ TARANMASININ YERİ

Hülya TOSUN YILDIRIM, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Onkoloji AD,
İZMİR

ÖZET

Amaç: Geleneksel histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlere karşın pediatrik kanserlerin ayırıcı tanısında, özellikle küçük, yuvarlak hücreli tümör morfolojisinde ve bazen iç hücreli tümör morfolojisinde zorluklar yaşanabilir. Bu durumlarda, kromozomal anormalliklerin belirlenmesi yararlı olabilir. Tek problu bir örnekte FISH yöntemiyle tek bir translokasyonun veya delesyonun incelenmesi, söz konusu kromozomal anormallik tek bir tip olamayacağından her zaman kesin bir yanıt vermeyebilir. Varyasyonlar bulunabilir ve bu nedenle tanı için birden fazla alanı incelemek gerekebilir. Bu çalışmanın amacı, tüm genom karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yönteminin ayırıcı tanıda zorluk yaşayan pediatrik kanserlerde yerini değerlendirmektir.

Yöntem: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyonda (KGH), tüm genomda 135.000 prob ve gen başına 3 prob olarak tarandı. Parafin blok dokulardan çalışmak mümkündür. Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi Patoloji Laboratuvarı arşivinden, ayırıcı tanıda güçlük yaşayan 24 olgunun parafin bloklarından DNA ekstraksiyonu yapıldı ve her olguda tüm kromozomlarda saptanan anomalilerin kontrol karşılaştırması yapıldı. Belirlenen kromozomal anomaliler, klinikopatolojik bulgular ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Tipik olarak gözlenen kromozomal anomaliler ile birlikte, tartışmalı önemi olan ek değişiklikler tespit edildi. ES / PNET olgularımızda kontrole kıyasla en sık kopya sayısı farklılığı srGAP2, RGPD5, NPHP1, GTF2IRD2, PDXDC1 genlerinde bulunmuştur. Andiferansiye nöroblastom hastalarımızda en sık sayıda kopya sayısı değişikliği; Defensin beta 106A, Defensin beta 103B, RGPD5 geni ve MAGE ailesi üyesi A12, SPANX ailesi üyesi D sarkom antijeni genlerinde tespit edilmiştir. Özellikle küçük yuvarlak hücreli indiferan tümör grubunda en sık sayıda kopya sayısı değişiklikleri immüoglobulin superfamily member 2, kalsiyum / kalmodulin bağımlı protein kinaz II beta, POM121 transmembran nükleoporin, Ankyrin repeat domain 30B, Solute carier family 6 member, Peptidil prorolil izomeraz B, siklofilin A, RLD alanı içeren E3 ubiquitin protein ligaz 2, Tryptophan 2.3-dioxygenase genlerinde tespit edildi.

Sonuç: Tüm genom KGH yöntemi, ayırıcı tanıda zorluk yaşanan pediatrik kanserlerde faydalı

olabilir. Ancak, parafin dokusunun incelenmesinde teknik zorluklar olduğundan, tümörlerden taze doku depolanması, genetik ve moleküler incelemeler için yararlı olacaktır. Yöntemin bir kısıtlılığı da, kromozomal anomalilerin belirlenmesine rağmen, in situ hibridizasyon gibi translokasyonun rapor edilememesidir.

Anahtar Kelimeler: Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH), nadir Pediatrik Kanserler, Ayırıcı Tanı



THE PLACE OF SCANNING ALL CHROMOSOMAL ABNORMALITIES WITH MICRORRAY- BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDISATION IN PEDIATRIC CANCERS POSING DIFFICULTIES IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS

Hulya TOSUN YILDIRIM, Dokuz Eylul University Institute of Health Sciences, Department of Oncology, IZMIR

ABSTRACT

Objective: Despite conventional histopathological and immunohistochemical methods, difficulties may be experienced in the differential diagnosis of pediatric cancers, especially in small, round-cell and sometimes in spindle-cell tumours. In these cases, determination of chromosomal abnormalities may be helpful. Examination of a single translocation or deletion with the FISH method in a sample with a single probe may not always yield a definitive response as the chromosomal abnormality in question may not be a single type. Variations may be found and therefore, it may be necessary to examine more than one domain for diagnosis. The aim of this study was to evaluate the place of the whole genome array comparative genomic hybridization method in pediatric cancers where difficulty is experienced in differential diagnosis.

Method: In Comparative Genomic Hybridization (CGH), 135,000 probes were scanned as 3 probes per gene in all genomes. It was possible to analyze paraffin block tissues obtained from the archive of the Pathology Laboratory of Dr Behcet Uz Children's Hospital. DNA extraction was made from the paraffin blocks of 24 cases where difficulty had been experienced in making the differential diagnosis and in each case, comparisons with control samples were made for all anomalies in all chromosomes with microarray technology. The chromosomal anomalies determined were compared with the clinicopathological findings.

Results: Together with the typically observed chromosomal anomalies, additional derangements with debatable importance were determined. In our ES/ PNET patient cohort, most frequently the number of copies were altered in genes srGAP2, RGPD5, NPHP1, GTF2IRD2, PDXDC1. In our undifferentiated neuroblastoma patient, most frequently the number copies were determined in genes Defensin beta 106A, Defensin beta 103B, RGPD5 gene and MAGE family member A12, SPANX family member D sarcoma antigen. In indifferntiated malignant tumors especially in the group of small round cell malignant tumors, most frequently the number copies were detected in immunoglobulin superfamily member 2, calcium / calmodulin- dependent protein kinase II beta, POM121 transmembrane nucleoporin, Ankyrin repeat domain 30B, Solute carrier family 6 member, Peptidylprolyl isomerase B, cyclophilin A, RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 2, Tryptophan 2.3-dioxygenase.

Conclusion: The whole genome CGH method may be useful in pediatric cancers where difficulties are experienced in making differential diagnosis. Since, technical difficulties are experienced in the examination of paraffin-embedded tissue samples, storing fresh tissue samples from each tumor will be helpful for genetic and molecular examinations. A limitation of the method is that although chromosomal anomalies can be determined, contrary to in situ hybridization translocation of the chromosomal abnormality can not be determined.

Key Words: Comparative Genomic Hybridization (CGH), Rare Pediatric Cancers, Differential Diagnosis



1. Giriş ve Amaç:

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi:

Çocukluk çağında nadir görülmesine rağmen maligniteler, çocuklarda da önemli bir ölüm nedenidir. Gelişmiş ülkelerde kanserlerin yüzde birinden azı 15 yaş altı çocuklarda görülür. Toplam kanser prevalansı 15 yaş altında milyonda 70-160 arasındadır (1). Diğer gelişmekte olan ülkeler ve Türkiye’de maligniteden ölümler dördüncü sırada yer alır. Çocukluk çağında beklenen yaşam süresinin uzun olması nedeniyle çocukluk çağı malignitelerinde ayırıcı tanı daha da önemlidir.

Son 30 yılda, tedavi seçeneklerindeki artışa paralel, çocukluk çağı kanserlerinde yaşam oranlarında önemli iyileşmeler olmuştur. Pediatrik kanserler, uluslararası çocuk kanserleri sınıflamasına (ICCC) göre 12 gruba ayrılır (2). Yaşlara göre dağılımda farklılıklar olsa da Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) kayıtlarına göre, çocukluk çağında ülkemizde en sık lösemi/ lenfomalar, ardından santral sinir sistemi (SSS) tümörleri görülür (1, 3). Kanserlin yaşa göre dağılımını incelediğimizde ilk bir yaşta daha çok spesifik organlarda yerleşmiş nöroblastom, retinoblastom ve nefroblastomun ön planda olduğu embriyonel primitif tümörler, 1-4 yaş arasında lösemiler ve 5-14 yaşında lösemi/ lenfoma ve SSS tümörlerin olguların hemen hepsini oluşturduğu görülür. Özetle çocukluk yaş grubuna özgü, fetal hayattaki her üç gelişim yaprağından köken aldığı düşünülen “primitif” tümörler” ciddi tanı tuzaklarına sahiptir. Bu grup tümörler küçük yuvarlak hücreli malign tümörler olarak da anılırlar (4-7).

Araştırmanın Amacı:

Çocukluk çağında gözlenen primitif küçük yuvarlak hücreli tümörler, çocukluk çağı malign tümörlerinin % 0,1’ini oluşturan heterojen malign tümör grubudur. Temelde çocukluk çağında görülen bu tümörler; nöroblastom, sarkomlar arasında rabdomyosarkom ve rabdomyosarkom dışı yumuşak doku tümörleri olarak sınıflandırılan Ewing sarkom (ES)/ primitif nöroektodermal tümör (PNET), dezmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (DKYHT) ve malign rabdoid/ teratoid tümör (RT) olarak sıralanabilir (8-10).

Unutulmaması gereken önemli nokta, bu tümörlerin heterojen yapısı, biyopside örneklenen dokunun sınırlılığı ve bu tümörlerde birbiriyle örtüşen morfolojik ve hatta immunohistokimyasal bulguların olabileceğidir. Pediatrik kanserlerde özellikle küçük yuvarlak hücreli tümör morfolojisinde, bazen de içsi hücreli tümörlerde konvansiyonel histopatoloji ve immunohistokimyasal yöntemlere rağmen ayırıcı tanı güçlüğü yaşanabilmektedir. Küçük biyopsi örneklerinde, klinik ve radyolojik verileri ışığında,

hücresel detaylar ve yapısal paternler irdelenerek bir ön tanı oluşturulmalı ve ayırıcı tanısına giren antiteler göz önünde bulundurularak immunohistokimyasal incelemeler ve gereklilik halinde moleküler incelemeler kullanılmalıdır (11, 12). Tek bir prob ile örneğin Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile tek bir translokasyon ya da delesyona bakmak her zaman kesin yanıt vermeyebilmektedir. Çünkü söz konusu kromozomal anomali tek tip olmayabilmektedir. Varyasyonları bulunabilmektedir. Ya da ayırıcı tanı için birden çok bölgeye bakmak gerekebilmektedir. Bu olgularda kromozomal anomalilerin saptanması yardımcı olabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı; tanı güçlüğü yaşanan pediatrik kanserlerde tüm genom karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yönteminin yerini araştırmaktır. Bu çalışmanın devamında elde edilen çok sayıda genetik data ilgili bölgelerdeki genler ve fonksiyonları araştırılarak karsinogeneze katkıları açısından yorumlanacaktır.

1.2. Araştırmanın Hipotezi:

Bizim bu çalışmada hipotezimiz; “tanı güçlüğü yaşanan pediatrik kanserlerde tüm genom karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemi” ile saptanan kromozomal değişikliklerin tümörlerin tanısında ve ayırıcı tanısında yol gösterici olduğudur. Çalışma sonucunda; olgu sayısının kısıtlılığı nedeniyle kesin aday gen değişikliği tanımlayamasak da; bazı genetik değişikliklerin özellikle bazı tümörlerle ilişkisinin öngörülebileceğini gördük.

2. Genel Bilgiler:

Nöroblastom (NB):

Nöroblastom (NB); adrenal medulla ya da sempatik nöronlardaki nöral krest kökenli hücrelerin diferansiasyon defektine bağlı gelişir ve en sık rastlanan ekstrakraniyal çocukluk çağı solid tümörüdür (13, 14). NB tüm pediatrik kanserlerinin % 8-10'ununda görülür ve çocukluk çağı kanserlerinde ölüm nedeni olarak ilk sıradadır. NB, farklı biyolojik davranışa sahiptir. Yaşamın ilk iki yılında % 2 civarında spontan regresyon gösterirken, yüksek riskli ileri evre olgularda multimodal yoğun tedavi yaklaşımlarına rağmen 10 yıllık sağ kalım % 30'ların altındadır (15). Tedavi; yaş, tümör evresi, histopatolojik derece, N-myc gen amplifikasyon kopya sayısı, ploidi, 11q LOH benzeri segmental aberasyonlara dayanarak hazırlanan risk protokollerine göre uygulanır. Bu protokollerde sisplatin ana tedavi edici ajandır. Yüksek doz kemoterapi protokollerine rağmen prognozun yeterince iyi olmaması farklı tedavi arayışlarını beraberinde getirmektedir (15,16).

Ewing Sarkom/ Primitif Nöroektodermal Tümör

Ewing sarkomu (ES) ve Primitif nöroektodermal tümör (PNET), ortak histolojik ve moleküler bulguları olan, fakat değişen derecelerde nöroektodermal diferansiyasyon gösteren “küçük yuvarlak hücreli tümör” grubundadır. ES/ PNET'ler iskelet sisteminin herhangi bir yerinde, özellikle uzun kemik diafizinde, pelviste ve ekstremitelerin derin yumuşak dokularında görülür. Göğüs duvarı yerleşimli olduğunda Askin tümörü olarak isimlendirilir (17, 18).

Kemik kökenli ES/PNET çocukluk çağında osteosarkomdan sonra; yumuşak dokuda ise rabdomyosarkomdan sonra ikinci sırada görülmektedir. ES/ PNET'in köken aldığı hücreler netlik kazanmamıştır; bazı araştırmacılara göre mezenkimal kök hücreden bazılarına göre post-ganglionik parasempatik primordial hücrelerden köken almaktadır (9, 17). Morfolojik olarak uniform küçük, yuvarlak, primitif hücrelerin diffüz proliferasyonundan oluşmaktadır. Hücreler kompakt tabakalar ve intertrabeküler alanı dolduran yuvalar oluşturur. Nükleer kromatin ince granüler yapıda olup, küçük-orta boy nukleol olabilir. Tümör hücreleri, intrasitoplazmik glikojen içeriğinden dolayı PAS pozitifdir. Tümör matriks üretmez. Hücreler fibriler uzantıların çevresinde dizilim göstererek nöroblastomda görülen ile benzer Homer-Wright rozeti veya bir damar çevresinde dizilim gösteren psödorozet oluşturabilir (18, 19).

İmmunohistokimyasal olarak ES/ PNET'te tümör hücrelerinde membranöz CD99 pozitifdir ancak her zaman bu tümöre spesifik olmayıp mezenkimal kondrosarkom, rabdomyosarkom, küçük hücreli osteosarkom, az diferansiye sinoviyal sarkom, lenfoma/

lösemide de pozitif olabilir. Bazı olgular Pansitokeratin, CD57 ve NSE pozitif olabilir (11). ES/PNET ailesi sarkomların yaklaşık %85'i t(11;22)(q12;q24) (EWSR1-FLI-1) içerdiği için nükleer FLI-1 pozitifliği tanıda değerlidir ancak bu belirteç ES/ PNET'e spesifik bir marker değildir. Vakaların büyük çoğunluğunda 22.kromozomda bulunan EWS geninde karşılıklı bir translokasyon vardır. Rutinde parafine gömülü dokularda, EWSR1 spesifik problemleri kullanılarak FISH ile bu translokasyonlar veya RT-PCR ile füzyon transkripsiyonları saptanabilir. Ancak ES/PNET ailesi sarkomların yaklaşık %85'inin pozitif olduğu akılda tutulmalı ve bu belirteçlerin epitelial tümörlerde ve lenfomalarda da pozitif olabileceği unutulmamalıdır (9, 11, 18, 19).

Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (DKYHT)

Çocukluk çağı ve ergenlik döneminde görülen oldukça agresif küçük yuvarlak hücreli bir tümördür. Sıklıkla yaygın serozal tutulum şeklinde, en sık peritoneal kavite olmak üzere toraks, santral sinir sistemi, baş-boyun lokalizasyonunda görülebilir. Tümörün kökeni bilinmemektedir fakat tümör epitelial, kas ve nöral belirteçler ile pozitif olup polifenotipik diferansiyasyon göstermektedir (18).

Morfolojik olarak desmoplastik stroma içerisinde trabeküler ve adalar şeklinde küçük, yuvarlak, dar sitoplazmalı hücrelerden oluşan primitif az diferansiye malign tümördür. Bazen tümör hücrelerinde rozet benzeri yapılanmalar görülebilir. İmmunohistokimyasal olarak tümör hücreleri vimentin, sitokeratin, desmin, EMA ve WT-1 pozitif boyanır. Tümör hücrelerinde Desmin ve vimentin ile karakteristik olarak noktasal, paranükleer boyanma görülür. Ayrıca bu hücrelerde CD56, NSE, kromogranin, sinaptofizin ve S-100 fokal pozitif olabilir. Moleküler olarak ES/PNET ailesi sarkomlarında gördüğümüz EWS-WT1 füzyon geni varlığı tanıda yardımcı olabilir (9, 11, 20).

Değişik kemoterapi protokolleri kullanılarak tedavi edilse de, DKYHT'lerde cerrahi, radyoterapi ve hatta kök hücre nakli ile genel sağ kalım %15 dolayındadır. Sıklıkla lokal rekürrensler ile seyreden, agresif gidişli bu tümörün çoğu fatal seyirlidir (20, 21).

Rabdomyosarkom (RMS)

Rabdomyosarkom en sık görülen pediatrik yumuşak doku sarkomudur; pediatrik malignitelerin %5-8'ini oluşturur. Çocukluk çağında görülen malign tümörlerin ayırıcı tanısında mutlaka düşünülmelidir. Rabdomyosarkom embriyonik iskelet kası yönünde farklılaşma potansiyeli gösteren, fenotipik ve biyolojik özelliklerini taklit eden, primitif tümördür. Ancak çizgili kas dışı yerlerde daha sık ortaya çıkar. En sık primer yerleşim bölgeleri baş- boyun, genitoüriner sistem olmak üzere retroperiton, pelvis ve batin gibi

visseral organların komşuluğu ve ekstremitelerdir. RMS, WHO sınıflamasında embriyonel, alveolar, pleomorfik, iğsi/ sklerozan ve epiteloid rabdomyosarkom alt tiplerine ayrılmaktadır. Çocukluk çağının en sık görülen sarkomu yuvarlak/ iğsi hücreli bir sarkomdur ve en sık 15 yaş altında görülür. Ancak genel olarak bu tümörlerin büyük çoğunluğunu embriyonel ve alveolar alt tipleri oluşturur. Bu alt tipler klinik, morfolojik, moleküler ve prognostik açıdan birbirinden farklıdır. İğsi hücreli/ sklerozan ve embriyonel rabdomyosarkom iyi prognozlu iken, alveolar rabdomyosarkom kötü prognozludur (9, 10).

Morfolojik olarak rabdomyosarkomlar iskelet kasının gelişimine benzer şekilde kasın farklı gelişim aşamalarını gösteren primitif mezenkimal hücrelerden oluşur. Primitif tümör hücreleri iğsi ya da yuvarlak olabilir ve genellikle bol miksoid stroma içerir. Tanıtıcı özellik olarak ise bu primitif yuvarlak hücreler rabdomyoblastik farklılaşma gösterebilir. Rabdomyoblastik hücreler geniş eozinofilik sitoplazmalı, sitoplazmasında enine çizgilenme olan uzayarak elonge şekil alan hücrelerdir. Tümör hücreleri sitoplazmik glikojen içeriğinden dolayı PAS pozitif olabilir. İmmühistokimyasal incelemede rabdomyoblastik hücrelerde desmin ve kasa özgül aktin sitoplazmik pozitif, Myogenin ve MyoD1 daha ilkel primitif hücrelerde nükleer pozitifdir. Sitokeratin, S-100 protein, CD99 fokal ekspresyon gösterebilir (13). Moleküler açıdan embriyonel RMS'lerde karakteristik translokasyon tanımlanmamıştır, ancak alveolar RMS'lerin %85'inde iki translokasyondan biri bulunur: t(1;13)(p36;q14) veya t(2;13)(q35;q14). Bu translokasyonlar sırasıyla PAX7-FOXO1 ve PAX3-FOXO1 füzyon genlerinin oluşumuna neden olur (7, 9).

Rabdomyosarkom ayırıcı tanısında benign reaktif/ neoplastik süreçler ve malign birçok tümör vardır. Benign süreçlerde öncelikle travma ve travmaya sekonder değişiklikler yanı sıra benign neoplastik süreç olan rabdomyom ile karışabilir. Ayrıca arada kalmış atrofik tümör dışı iskelet kasında yalancı pozitiflik o tümörün rabdomyosarkom tanısı almasına neden olabilir. Aynı zamanda bazı tümörlerde örneğin nefroblastom (wilms tümör), liposarkom, kondrosarkom, ES/PNET ya da sinir kökenli tümörlerde rabdomyoblastik diferansiyasyon görülebilir. Asıl problem indifferansiye bir tümörde çizgili kas yönünde diferansiyasyonunun morfolojik olarak ayırt edilemediği “küçük yuvarlak hücreli tümör” morfolojisindeki az diferansiye bir tümörde, RMS ayırıcı tanıda mutlaka düşünülmelidir. Çocukluk çağının en sık görülen sarkomu olan RMS'da tanı anında hastanın evresi, tümörün yerleşim yeri, tümörün histolojik alt tip ve yaşı prognostik açıdan önemlidir. Bu tümörlerde cerrahi ve ek olarak radyoterapiden oluşan tedaviye, kemoterapinin eklenmesi sağ kalımı %70'lere çıkarabilir (9).

Yumuşak dokunun malign rabdoid tümörü

Malign rabdoid tümör (RT) sıklıkla çocuklarda, konjenital olarak görülebilen kökeni belirsiz nadir bir sarkomdur. Derin yumuşak doku kalça-omuz ve visseral iç organlarda (GİS, karaciğer, kalp, mesane ve beyin) görülebilir. Mikroskopik olarak sellüler bir tümör olup, poligonal hücre kümelerinden oluşur. Nadiren küçük yuvarlak hücreli komponent de içerebilir (7,8). İmmunohistokimyasal olarak çoğu vakada sitokeratin, EMA, CD99 ve nöroendokrin belirteçler pozitifdir ve tipik olarak INI1 ekspresyon kaybı vardır (9,10). Tedavisi cerrahidir. Kemoterapi genellikle etkisizdir. Prognozu kötüdür. Sıklıkla lokal rekürrens ve uzak metastaz görülür (8).

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (KGH)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH)'un dahil olduğu klasik sitogenetik yöntemlerin, kanser sitogenetiğinde karşılaşılan yapısal problemleri net olarak tanımlayamaması nedeniyle (tek bir prob ile tek bir translokasyon veya delesyon saptanması) yeni yöntem arayışları oldu. Moleküler ve sitogenetik tekniklerin birlikte kullanıldığı KGH sorunun ortadan kalkmasına neden oldu (22). Kallioniemi ve arkadaşları KGH yöntemi ile DNA dizisindeki kopya sayısı değişimleri araştırdı ve değerlendirdi (23-26).

KHG tekniği, temeli FISH'e dayanır, değişik floresan boya ile boyanan referans ve test (hasta) referans DNA örnekleri ile karşılaştırılarak ortaya konur ve elde edilen floresan renk değişiklikleri analiz edilir. Bioinformatik ortamda görüntü analiz programıyla bilgisayarda hibridizasyon oranlarına göre kromozom hibridizasyon profilleri hesaplanır ve o kromozomda o lokustaki 1 kb'a kadar ayrıntılı kromozomal anomaliler ortaya çıkarılır. Bu yöntem ile; standart tekniklerle saptanamayan yapısal kromozom anomaliler daha güvenilir saptanabilir, en az iki genom birbiri ile karşılaştırılır, tek bir deneyde tüm genom analiz edilir, sitogenetik analiz için yeterli metafaz elde edilemeyen tümörlerin incelenebilmesi mümkündür ve taze tümör dokularına uygulanabilir. Bu tekniğin kısıtlılıkları da vardır; heterojen hücre popülasyonu ile çalışılması, standardizasyonun zorluğu, dolayısıyla incelemeyi ve araştırmayı bu konuda eğitim almış kişilerin yapabilmesidir (23, 24, 27).

KGH, geniş ve yeni moleküler sitogenetik analiz yöntemidir ve tanı zorluğu yaşanan birçok olguda kromozomal anomalinin tanımlanmasına ve ortaya çıkarılmasına imkan tanır. Özellikle prenatal tanıda da kullanılan bu teknik otizm ve zihinsel geriliğe neden olan spesifik kromozom anomalilerin saptanmasında kullanılır. Ayrıca, nöromusküler kas hastalıkları ve genetik metabolik hastalıkları saptamak amacıyla bu teknik kullanılabilir (25, 28).

KGH yöntemi temelde tümöre özgü genetik değişiklik ya da daha önce tanımlanmış o

tümöre spesifik karakteristik genetik anomalilerdeki farklılık paternini değerlendirerek tümör progresyonu veya hasta sağ kalımıyla ilişkisi olup olmadığını aydınlatmaya çalışır. Hematolojik kanserlerin yanısıra bir farklı tümörde birden fazla noktalarda saptanabilen genetik değişimler vardır (25, 29). Günümüze kadar birçok farklı kanserde KGH yönteminin araştırıldığı birçok farklı çalışma yayınlanmıştır. Birçok kanser ve o kanserlerden üretilen hücre hatlarındaki kromozomal farklılıklar araştırılmıştır. Ayrıca bu teknik ile, in situ lezyonlar, invaziv kanserler ve metastatik kanserler gibi tümörün farklı aşamalarını gösteren örneklerde tümör gelişimi sırasında DNA kopya sayısındaki değişiklikler gösterilebilmiştir (30).



3.Gereç ve Yöntem:

3.1 Araştırmanın Tipi:

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Projeye Haziran 2016 de başlanmış olup Ağustos 2019’de tez savunması ile sonlanmıştır.

3.3.Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları:

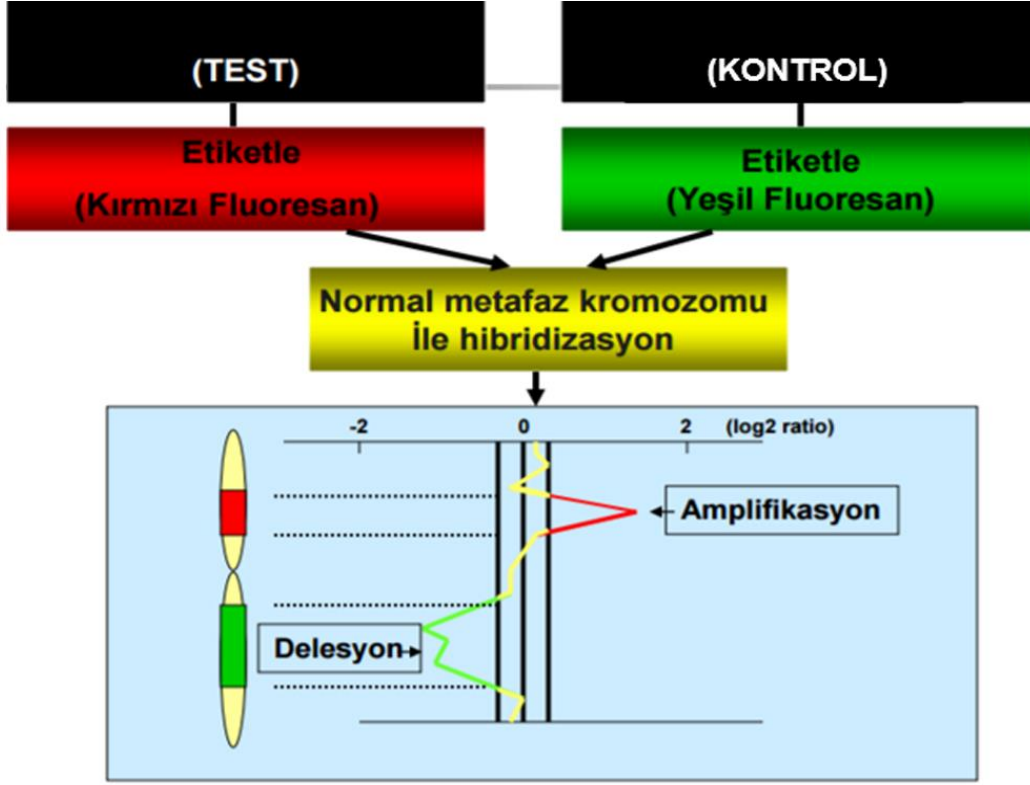
Dr. Behçet Uz Çocuk Hastanesi Patoloji Laboratuvarı arşivinden, ayırıcı tanıda güçlük yaşayan 24 olgunun parafin bloklarından DNA ekstraksiyonu yapıldı ve KGH analizi uygulandı. Her olguda tüm kromozomlarda saptanan anomalilerin kontrol karşılaştırması yapıldı. Belirlenen kromozomal anomalileri, klinikopatolojik bulgular ile karşılaştırıldı.

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon analizinde tüm genom veya genom üzerinde alt bir bölgeye, örneğin ilgililenen tek bir kromozomal bölgeye veya birden çok lokusa özel tasarlanmış NimbleGen CGH dizinleri (array) kullanılarak ilgililenen bir genomun referans bir genom ile arasındaki kopya sayı farklılıkları, kromozomal anomaliler tespit edildi.

3.4. Çalışma materyali

KGH Analizi:

KGH için analiz edilecek 24 olgunun DNA’sı (test DNA’sı) ile normal DNA (kontrol DNA’sı) farklı florokromlarla işaretlendi ve normal hücrelerden elde edilen metafaz kromozomları ile hibridize edildi. Referans metafaz alanındaki kromozomlar boyunca floresan yoğunluklarındaki farklılıklar, tümör DNA’sındaki kopya sayısı değişiklikleri (amplifikasyonlar veya delesyonlar) anlamına gelir. Farklı floresan fenotipi gösteren DNA’lar normal metafaz kromozomları ile hibridize oldukları zaman birbiri ile örtüşüyorsa, mavi-turuncu bir renkte izlenir. Eğer test DNA’sında bir delesyon söz konusu olursa bu bölgede hibridizasyon gerçekleşmez, dolayısıyla bölge kırmızı renkte izlenir (Şekil 1). Buna karşılık DNA’da bir amplifikasyon varsa, bu bölgede hibridizasyon daha yoğun olduğu için bölge diğer bölgelerden daha parlak yeşil olarak izlenir. Görüntü analiz sisteminin programıyla bilgisayarda hibridizasyon oranlarına göre kromozom hibridizasyon profilleri hesaplandı.



Şekil 1: KGH yönteminin şematik hali.

Özetle KGH analizinde şu basamaklar uygulandı: doku kontaminasyonunu engellemek adına dikkatli stereoskopik mikrodiseksiyon, DNA elde edilmesi, DNA işaretlemesi, mikroarray hibridizasyon, mikroarray görüntüleme ve özel yazılım ile verilerin analizi ve değerlendirilmesi. Bu taranan ham verilerden özet grafik gösterimi oluşturuldu. Bu ham verilerden, küçük genomik değişikliklerin kesin yerini teyit etmek için yararlanıldı. Ayrıca gen füzyonunu taramak ve füzyon eşini saptamak için de bu veriler kullanıldı. KGH yöntemiyle elde ettiğimiz veriler tümöre neden olan spesifik genetik değişiklik ya da o tümöre özgü bilinen karakteristik genetik anomalilerdeki değişiklik paterni ile tümör progresyonu veya hasta sağkalımı üzerine ilişkisi aydınlatılmaya çalışıldı.

DNA izolasyonlarında spin kolon kullanıldı ve manuel yöntemle yapıldı. En az 0,5 µg test edilecek genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları 260/ 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümlerle absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen DNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilerek, ideal saflıkta kaliteli DNA eldesi için $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,9$ olma kriteri dikkate alındı.

DNA örnekleri ve kontrol örnekleri işaretleme kiti ile protokole uygun işaretlendi. Ve işaretleme sonlandırılıp, uygun yıkama ve santrifüjlerde temizlendi. Hibridizasyon için gerekli miktar hesaplanıp ayrıldı. Hibridizasyon sonrası yıkama aşamaları protokole uygun gerçekleştirildi. Tarama işlemleri MS 200 microarray scanner aletinde alete ait yazılım programları kullanılarak otomatik olarak gerçekleştirildi. Tarama aşamasında tek bir tarama ile 12 örneğin hepsine ait görüntü elde edilmesi mümkündür. Tarama işlemleri iki farklı işaretleme olduğu için iki farklı dalga boyunda 532 ve 635 nm'de, 2 µm rezolüsyon ile düzgün bir görüntü elde edilinceye kadar tekrarlandı. Tarama işlemleri sonrasında görüntü dosyaları bilgisayar yazılım programlarıyla incelenmek üzere kaydedilerek, mikrodizin lamı cihaz içerisinden çıkarılarak karanlık bir desikatör içinde gerekli olduğu takdirde tekrar taranmak üzere saklandı.

Elde edilen tarama görüntüleri kitin ticari (NimbleGEN) programında kontrolle karşılaştırmalı analiz edildi. İstatistik incelemeye gerek yoktu. Tüm kromozom tarama ile ortaya çıkan değişiklikler literatür bilgisi ile karşılaştırıldı (31).

KGH teknik aşamaları

- Test ve referans hücrelerden genomik DNA izolasyonu
- İzole edilen bu DNA materyalinin farklı renkte florokromlarla [Cy 3 (yeşil) ve Cy5 (kırmızı)] işaretlenmesi,
- Ard arda tekrarlanan bölgelerden kaynaklanabilecek hatalı eşleşmeleri önlemek için Human Cot-1 DNA ile muamele
- BAC, PAC, kosmid, cDNA, oligonukleotid ve PCR türevli problemlerin (target) cam matriks üzerine sabitlenmesi
- Hibridizasyon
- Bilgisayar ortamında çeşitli analiz programları ile floresan sinyallerin tanımlanarak sonucun değerlendirilmesi

Elde edilen tarama görüntüleri kitin ticari programında kontrolle karşılaştırmalı analiz edildi. Deneysel Ölçüt Raporu hazırlandı. Hazırlanan raporla, sinyal aralığı, blok başına ortalama sinyal yoğunluğu, blok bütünlüğünün değişkenliği, dizin üzerindeki deneysel

karakteristiklerin ortalama sayısı, ortalama sinyal yoğunlukları gibi birçok bilgi elde edildi. Her bir olgunun sitogenetik idiogramları çıkarıldı. İstatistik incelemeye gerek yoktu. Tüm kromozom tarama ile ortaya çıkan değişiklikler literatür bilgisi ile karşılaştırıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

KGH ile saptanan kromozomal değişiklikler bağımsız değişkenler olup, pediatrik olgularda ayırıcı tanı güçlüğü yaşadığımız tümörler bağımlı değişkendir.

3.6. Veri Toplama Araçları:

Parafin bloklardan elde edilen DNA örnekleri, KGH sonuçları

3.7. Araştırma Plan ve Takvimi (Tablo 3.7.1):

Tablo 1: Araştırma takvimi			
Haziran-Temmuz 2016	Ağustos-Ekim 2017	Haziran 2018	Haziran 2019
Deneylein planı Malzeme temini	DNA ekstraksiyonu KGH analizi	Değerlendirme İstatistiksel Analiz Yazma Literatür güncelleme	Yayına dönüştürme Sunma Bitirme raporu

3.8.Verilerin Değerlendirilmesi:

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde incelenecektir. Bulgular, Kruskall-Wallis sonrası Mann Whitney-U testiyle analiz edilecektir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

KGH yönteminin kısıtlılığı temelde dengeli translokasyonları ve inversiyonları tespit edemez. Ayrıca kanserler sadece kromozomal dengesizlikler dışında, DNA'daki nokta mutasyonları olan tek bir baz çiftindeki değişiklik sonucu da meydana gelebilir. KGH yöntemi bu kadar küçük değişiklikleri saptayamaz. Ayrıca, KGH yöntemi ile bulunan kopya sayısı değişiklikleri fenotipik olarak normal bireylerde de olabilir, kanser ya da hastalığa yol açtığı net söylenemez.

Ayrıca intratümöral heterojenite önemli bir konu olup, aynı tanıya sahip farklı hastaların tümör dokuları aynı moleküler özellikleri göstermeyebilir.

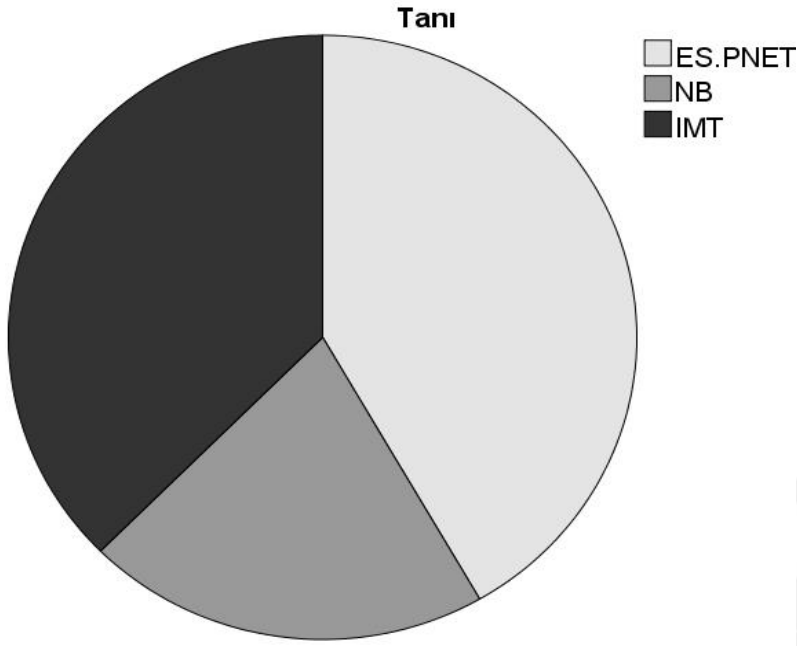
3.10.Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için; 31.03.2011/6 tarihli B-10-4-ISM-4-3565-72/ Etik komite (Dr Behçet Uz Çocuk Hastanesi) Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Onayı alındı.

4.Bulgular:

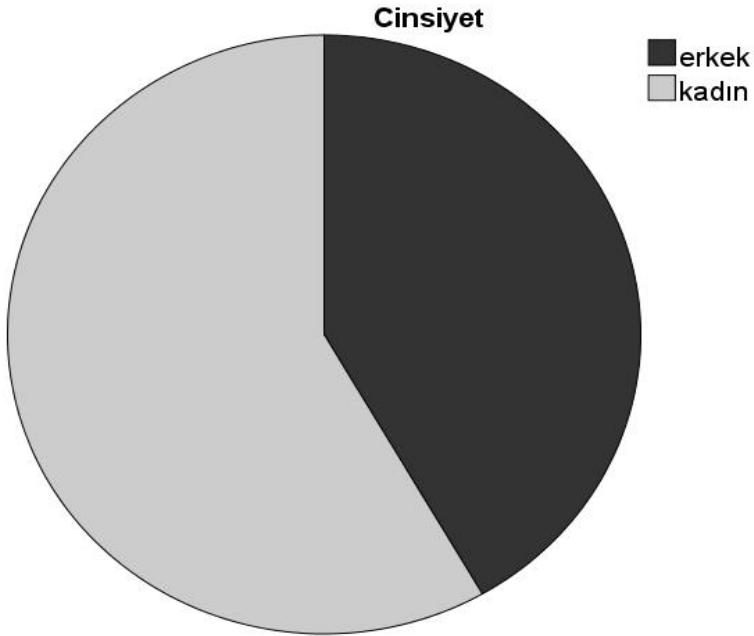
Hastalarımız arasında 10 Ewing sarkom, 5 nöroblastom vardı. Geri kalan 9 olgu indiferan malign tümör olarak tanımlandı (Şekil 2). İndiferan malign tümör tanısı alan olguların ikisinde RT, ikisinde DKYHT, birinde ise RMS öncelikli olarak düşünüldü. Olguların yaşları 2 ay ile 18 yaş arasında değişiyordu. Hastaların yaş ortalaması $8,7 \pm 5,3$ idi. Seri, 10 erkek (% 41,7) ve 14 kızdan (% 58,3) oluşuyordu (Şekil 3). Tümörlerin yerleşim yeri 6 böbrek ve adrenal bez, 4 batın içi, 4 toraks duvarı, 3 kalça veya ekstremitte yumuşak dokusu, 2 akciğer veya plevra, 2 pelvik bölge ve 1 karaciğer şeklindeydi. Konsültasyon gelen 2 olguda ise tümörün yerleşimi bilinmiyordu (Tablo 2) (Şekil 4).

Tablo 2. Hastaların demografik verileri.

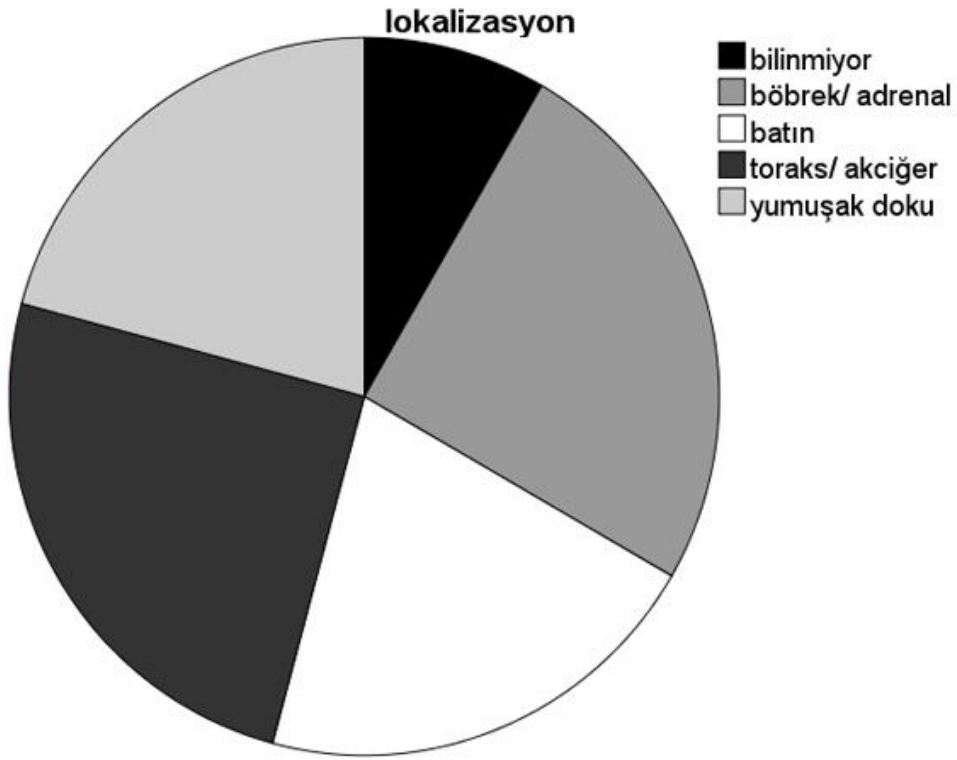
VAKA	VAKA KODU	YAŞ (yıl)	CİNSİYET	YERLEŞİM YERİ	TANI	SAĞ KALIM
1	1A1	4	K	İliak kanat	Ewing sarkom	Bilinmiyor
2	1A2	4	E	Batın içi	İndiferan malign tümör (DKYHT ile uyumlu)	Bilinmiyor
3	1A3	11	E	Toraks duvarı	Ewing sarkom	Bilinmiyor
4	1A4	9	E	Pelvik bölge	İndiferan malign tümör (DKYHT ile uyumlu)	Bilinmiyor
5	1A5	8	E	Sakral bölge	Ewing sarkom	Eksitus
6	1A6	0	K	Karaciğer	İndiferan malign tümör	Bilinmiyor
7	1A7	18	K	Bilinmiyor	Ewing sarkom	Sağ
8	1A8	17	K	Bilinmiyor	Ewing sarkom	Eksitus
9	1A9	13	E	Akciğer/ plevra	İndiferan malign tümör	Eksitus
10	1A10	2,5	K	Pelvik bölge	İndiferan malign tümör (RMS ile uyumlu)	Bilinmiyor
11	1A11	10	K	Böbrek	İndiferan malign tümör	Bilinmiyor
12	1A12	7	K	Toraks duvarı	Ewing sarkom	Bilinmiyor
13	2A1	13	K	Batın içi	Ewing sarkom	Bilinmiyor
14	2A2	3	E	Böbrek	İndiferan malign tümör (RT ile uyumlu)	Eksitus
15	2A3	3	E	Böbrek	İndiferan malign tümör (RT ile uyumlu)	Eksitus
16	2A4	15	E	Omuz	Ewing sarkom	Sağ
17	2A5	15	K	Akciğer/ plevra	Ewing sakom	Eksitus
18	2A6	14	K	Toraks duvarı	Ewing sarkom	Sağ
19	2A7	5	E	Batın içi	İndiferan malign tümör	Sağ
20	2A8	7	K	Adrenal bez	Nöroblastom	Sağ
21	2A9	16	K	Batın içi	Nöroblastom	Bilinmiyor
22	2A10	2	E	Adrenal bez	Nöroblastom	Sağ
23	2A11	7	K	Adrenal bez	Nöroblastom	Sağ
24	2A12	5	K	Toraks duvarı	Nöroblastom	Sağ



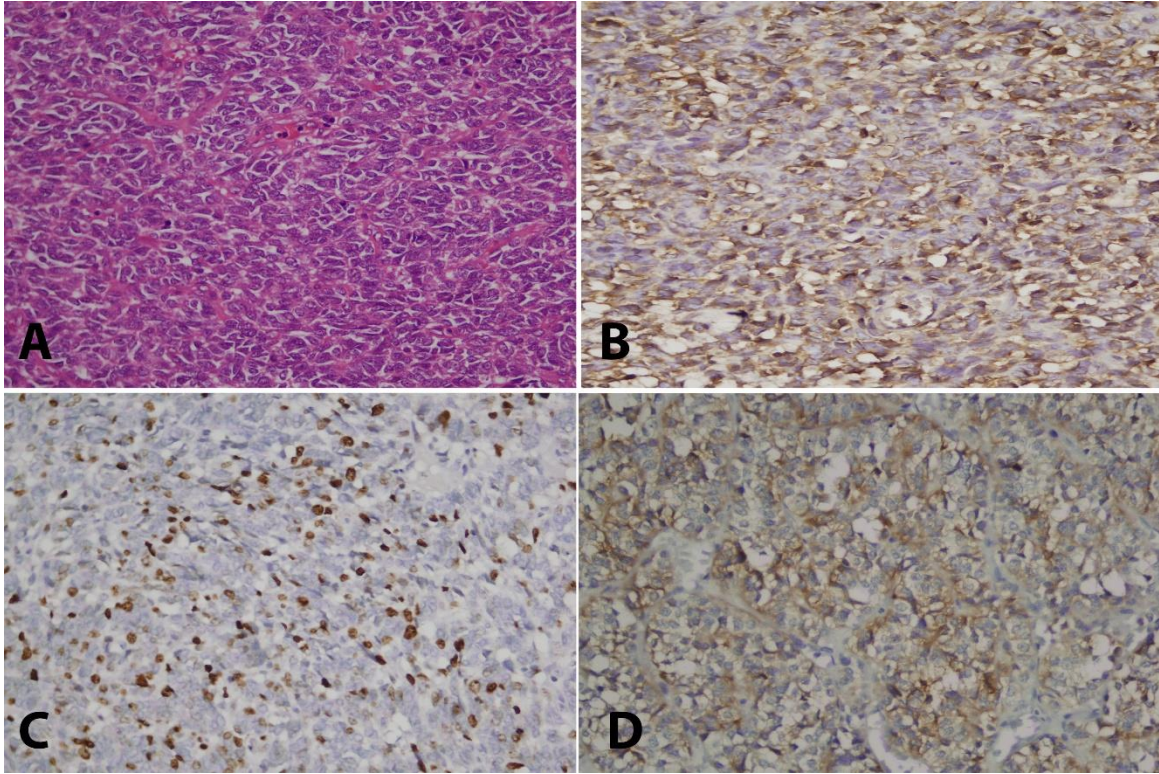
Şekil 2: Olguların tanı gruplarına göre dağılımı.



Şekil 3: Olguların cinsiyete göre dağılımı

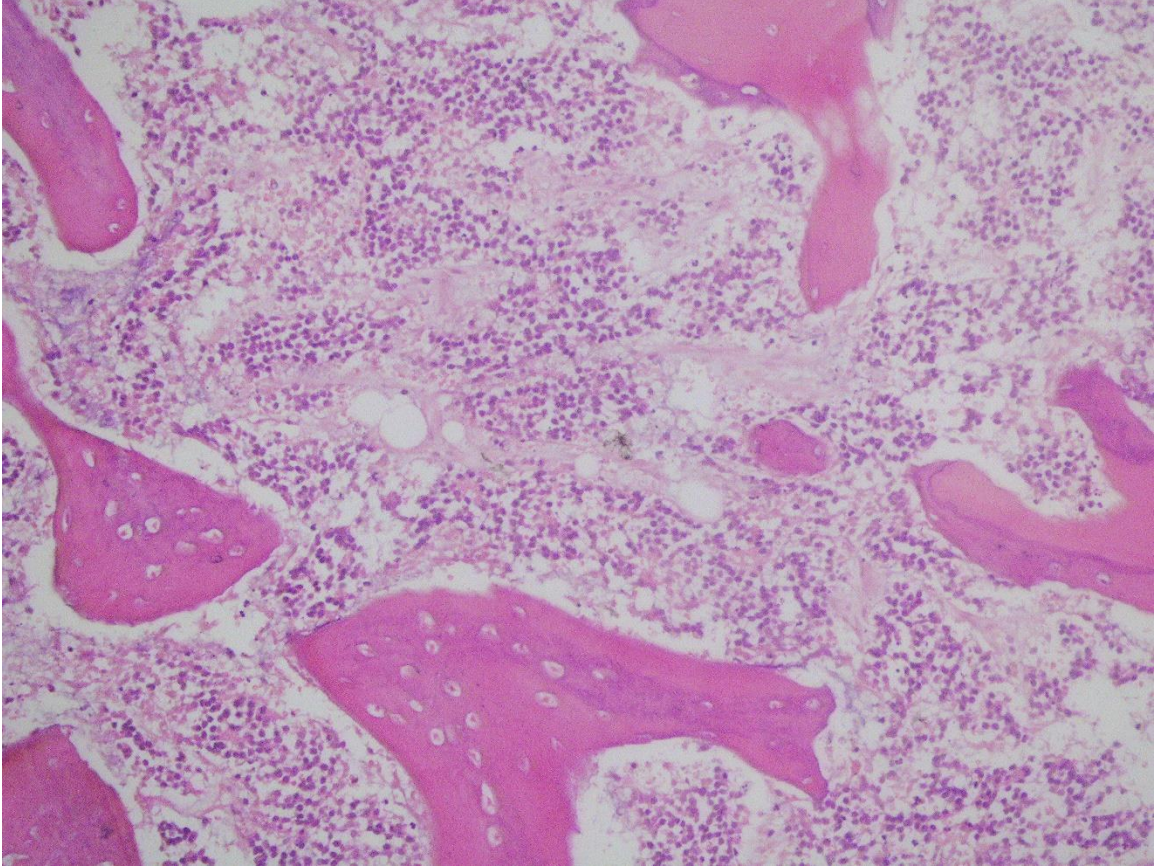


Şekil 4. Tümörlerin lokalizasyona göre dağılımı.



Şekil 5. ES/ PNET tümör hücrelerinin A) Hematoksilen eozin boyalı görünümü (HE x 200). Aynı tümörde İHK'sal; B) Ki67 proliferasyon indeksi, C) CD99 ve D) Sinaptofizin ekspresyonu (DAB x 200).

Serimizde en kalabalık grubu oluşturan ES/ PNET hastalarının (Resim 5) cinsiyete göre dağılımı 4 erkek ve 6 kadın şeklindeydi. Yaş aralığı 1 ile 14 yıl arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 8,6 idi. Tümörlerin yerleşim yeri; 2 ekstremit, 1 akciğer olup; 7 olgu gövde yumuşak dokusunda lokalizeydi. KGH analizinde sık saptanan (10 olgunun 6 ve 7'sinde ortak bulunan) 8 gen bölgesi saptandı. Bu bölgelerden SLIT-ROBO Rho GTPaz aktive edici protein (srGAP2), RANBP2 benzeri GRIP alanı (RGPD5), nefrosistin 1 (NPHP1), GTF2I tekrar alanı 2 (GTF2IRD2) ve piridoksal bağımlı dekarboksilaz alanı (PXDC1) genlerinde kopya sayısı değişiklikleri 10 hastanın 7'sinde bulunmuştur. On hastanın 6'sında gözlenen kopya sayısı değişikliği olan genler ise MALL, Ankyrin Repeat Domain 30A (ANKRD30A), protein tirozin fosfataz reseptör olmayan tip 20 (PTPN20) ve ubiquitin spesifik peptidaz 22 (USP22) genleriydi (Tablo 3).



Şekil 6. Nöroblastomun kemik iliği metastazı (HEX 200).

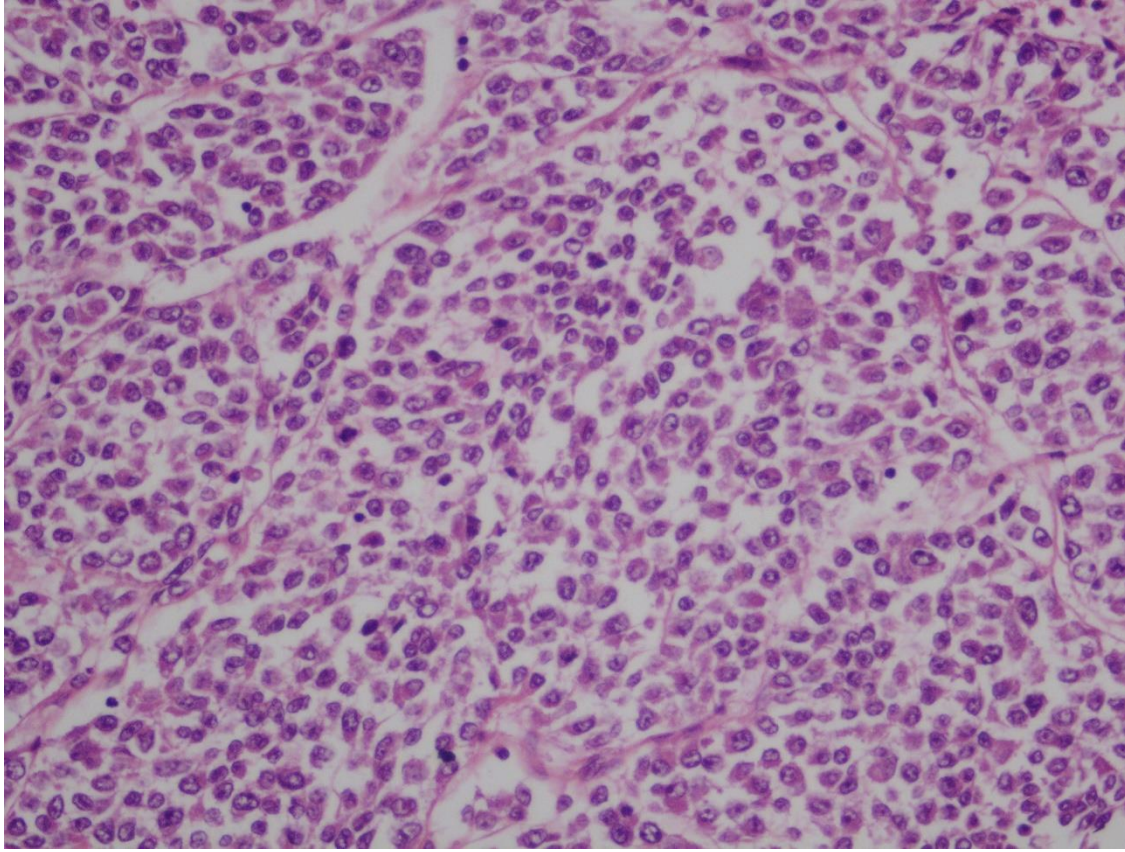
Tablo 3. ES/ PNET hastaları arasında KGH ile saptanan sık görülen kopya sayı değişiklikleri.

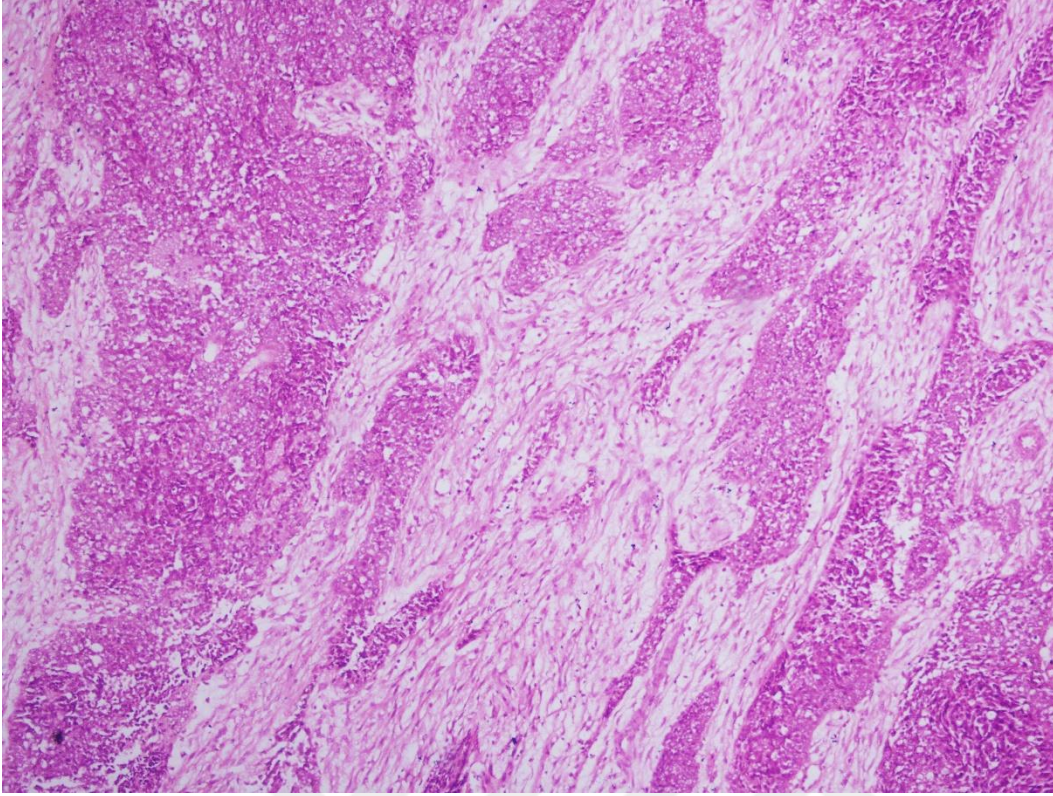
SEMBOL	GEN	YER	1A1	1A3	1A5	1A7	1A8	1A12	2A1	2A4	2A5	2A6	TOTAL
srGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase- activating protein 2	<u>1q32.1</u>	del	del	del	del	del	x	del	del	x	x	7/10
RGPD5	RANBP2-like and GRIP domain containing 5	<u>2q13</u>	del	del	x	x	del	del	del	del	del	x	7/10
NPHP1	nephrocystin 1	<u>2q13</u>	del	x	x	del	del	del	del	del	del	x	7/10
GTF2IRD2	GTF2I repeat domain containing 2	<u>7q11.23</u>	del	del	x	del	x	del	del	del	amp	x	7/10
PDXDC1	pyridoxal dependent decarboxylase domain containing 1	<u>16p13.11</u>	del	del	x	del	del	del	x	del	del	x	7/10
MALL	T cell differentiation protein like	<u>2q13</u>	del	del	del	del	del	x	del	x	x	x	6/10
ANKRD30A	Ankyrin repeat domain 30A	<u>10p11.21</u>	del	del	x	del	x	del	x	del	del	x	6/10
PTPN20	PTPN20 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20	<u>10q11.21</u>	del	del	del	x	del	x	x	del	del	x	6/10
USP22	ubiquitin specific peptidase 22	<u>17p11.2</u>	x	del	x	del	x	del	del	del	del	x	6/10

Serimizdeki andiferansiye nöroblastom tanılı olgu sayısı 5 idi (Şekil 6). Cinsiyete göre dağılımı 1 erkek ve 4 kadın şeklindeydi. Yaş aralığı 2 ile 16 yıl arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 7,2 idi. Tümörlerin yerleşim yeri 3 olguda adrenal bezdi. KGH analizinde sık saptanan (5 olgunun 4 veya 5'inde ortak bulunan) 8 gen bölgesi saptandı. Bu bölgelerden Defensin beta 107A geni hastaların hepsinde ortaktı. MAGE family member A12, SPANX family member D sarkom antijeni 1, Defensin beta 106A, Defensin beta 103B ve RANBP2 like and GRIP domain containing 5 RANBP2 benzeri GRIP alanı (RGPD5) genlerinde ise 5 olgudan 4 tanesinde kopya sayısı değişikliği gözlendi (Tablo 4).

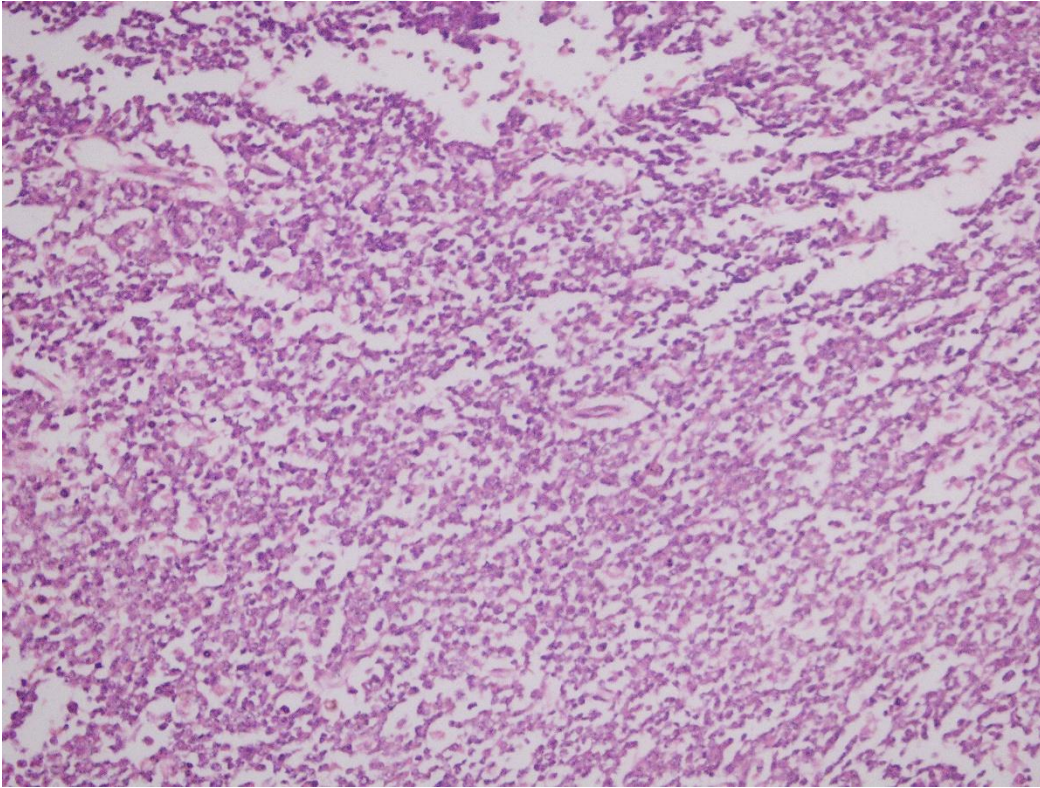
Tablo 4. NB hastaları arasında KGH ile saptanan sık görülen kopya sayı değişiklikleri.

SEMBOL	GEN İSMİ	LOKASYON	2A8	2A9	2A10	2A11	2A12	Total
DEFB107A	Defensin beta 107A	<u>8p23.1</u>	del	del	del	del	del	5/5
MAGEA12	MAGE family member A12	<u>Xq28</u>	del	del	x	del	del	4/5
SPANXD	SPANX family member D	<u>Xq27.2</u>	del	x	del	del	del	4/5
SAGE1	sarcoma antigen 1	<u>Xq26.3</u>	del	del	del	del	x	4/5
DEFB106A	Defensin beta 106A	<u>8p23.1</u>	x	del	del	del	del	4/5
DEFB103B	Defensin beta 103B	<u>8p23.1</u>	del	del	del	x	del	4/5
RGPD5	RANBP2 like and GRIP domain containing 5	<u>2q13</u>	del	del	x	del	del	4/5

**Şekil 7.** RT olduğu düşünülen indiferan malign tümör (HEX 400)



Şekil 8. DKYHT olduğu düşünülen indifferan malign tümör (HEX 100).



Şekil 9. RMS olduğu düşünülen indifferan malign tümör (HEX 100).

Tablo 5. İMT hastaları arasında KGH ile saptanan sık görülen kopya sayı değişiklikleri.												
SEMBOL	GEN	YERİ	DKYT 1A2	DKYT 1A2	İMT 1A6	İMT 1A9	RMS 1A10	İMT 1A10	RT 2A2	RT 2A3	İMT 2A7	Total
ANKRD30 B	ankyrin repeat domain 30B	<u>18p11.21</u>	del	X	X	del	del	del	del	x	x	5/9
SLC6A4	solute carrier family 6 member 4	<u>17q11.2</u>	del	del	x	x	del	del	del	x	x	5/9
PPIB	peptidylprolyl isomerase B	<u>15q22.31</u>	del	del	x	del	x	del	del	x	x	5/9
HERC2	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	<u>15q13.1</u>	del	del	x	del	del	del	x	x	x	5/9
TDO2	tryptophan 2,3- dioxygenase	<u>4q32.1</u>	amp	amp	x	del	del	del	x	x	x	5/9
IGSF21	immunoglobulin superfamily member 21	<u>1p36.13</u>	x	x	x	del	del	x	del	del	x	4/9
CAMK2B	calcium/calmo dulin dependent protein kinase II beta	<u>7p13</u>	x	x	x	del	del	x	del	del	x	4/9
POM121	POM121 transmembrane nucleoporin	<u>7q11.23</u>	del	x	x	del	del	del	x	x	x	4/9

Serimizdeki 9 olgu indiferan malign tümör olarak tanımlandı. İndiferan malign tümör tanısı alan olguların ikisinde RT (Şekil 7), ikisinde DKYHT (Şekil 8), birinde ise RMS (Şekil 9) öncelikli olarak düşünüldü. Olguların yaşları 2 ay ile 13 yaş arasında değişiyordu. Hastaların yaş ortalaması $5,5 \pm 4,2$ idi. Seri 6 erkek (% 66,7), 3 kızdan (% 33,3) oluşuyordu. Tümörlerin yerleşim yeri 3 böbrek ve adrenal bez, 3 batın içi, 1 toraks duvarı ve 2 kalça veya ekstremitte yumuşak dokusu şeklindeydi.

Tablo 6. Tanısı konan olgulardaki farklı ve sık rastlanan kopya sayı değişiklikleri							
SEMBOL	GEN	YER	ES/ PNET	NB	DKYT	RT	RMS
srGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2	<u>1q32.1</u>	+				
RGPD5	RANBP2-like and GRIP domain containing 5	<u>2q13</u>	+				
GTF2IRD2	GTF2I repeat domain containing 2	<u>7q11.23</u>	+				
PDXDC1	pyridoxal dependent decarboxylase domain containing 1	<u>16p13.11</u>	+				
PTPN20	PTPN20 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20	<u>10q11.21</u>	+				
USP22	ubiquitin specific peptidase 22	<u>17p11.2</u>	+				
DEFB107A	Defensin beta 107A	<u>8p23.1</u>		+			
SLC6A4	solute carrier family 6 member 4	<u>17q11.2</u>			+		
PPIB	peptidylprolyl isomerase B	<u>15q22.31</u>			+		
HERC2	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	<u>15q13.1</u>			+		
TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase	<u>4q32.1</u>			+		
IGSF21	immunoglobulin superfamily member 21	<u>1p36.13</u>				+	
CAMK2B	calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta	<u>7p13</u>				+	
IGSF21	immunoglobulin superfamily member 21	<u>1p36.13</u>					+

KGH analizinde sık saptanan (9 olgunun 4 veya 5'inde ortak bulunan) 8 gen bölgesi saptandı. Bu bölgelerden immunoglobulin superfamily member 21, calcium/ calmodulin dependent protein kinase II beta ve POM121 transmembrane nucleoporin genlerinde kopya sayı değişikliği 9 hastadan 4'ünde saptandı. Ankyrin repeat domain 30B, solute carrier family 6 member 4, peptidylprolyl isomerase B, HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 ve tryptophan 2,3-dioxygenase genlerinde ise 9 olgudan 5 tanesinde kopya sayısı değişikliği gözlemlendi (Tablo 5).

İndiferan malign tümör grubunda öncelikle DKYHT ile uyumlu olarak düşünülen olguların 2'sinde ortak solute carrier family 6 member 4, peptidylprolyl isomerase B ve HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 ve tryptophan 2,3-dioxygenase genlerinde kopya sayısı değişikliği saptandı. İndiferan malign tümör grubunda öncelikle RT ile uyumlu olarak düşünülen olguların 2'sinde ortak immunoglobulin superfamily member 21, calcium/ calmodulin dependent protein kinase II beta genlerinde kopya sayısı değişikliği izlendi. İndiferan malign tümör grubunda öncelikle RMS ile uyumlu olarak düşünülen bir olguda superfamily member 21, calcium/ calmodulin dependent protein kinase II beta ve POM121 transmembrane nucleoporin, ankyrin repeat domain 30B, solute carrier family 6 member 4, HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 ve tryptophan 2,3-dioxygenase genlerinde kopya sayısı değişikliği izlendi gözlemlendi (Tablo 6).

5.Tartışma

Çocukluk çağında gözlenen primitif küçük yuvarlak hücreli tümörler, nadir görülen oldukça agresif seyredebilen heterojen malign tümör grubudur. Bu tümörlerde birbiriyle örtüşen morfolojik ve hatta immunohistokimyasal bulgular olabilir. Bu tümörlerde özellikle küçük yuvarlak hücreli tümör morfolojisinde histopatoloji ve immunohistokimyasal yöntemlere rağmen ayırıcı tanı güçlüğü yaşanabilmektedir ve bu tümörlerin tanısında gereklilik halinde moleküler incelemeler kullanılabilir (3-7). Bu çalışmada tanı güçlüğü yaşanan pediatrik tümörlerde tüm genom karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yönteminin yeri araştırılmıştır.

KGH analizi, Ewing sarkom/ PNET tanısı konan hastalardaki DNA kopya sayısı değişikliklerinin tespiti için yararlı bir yöntemdir. Hasta serimizde srGAP2, RGP5, NPHP1, GTF2IRD2, PDXDC1 kopya sayısı en fazla değiştirilmiş genler olarak bulunmuştur. Çalışmamızda en sık kopya değişikliği saptanan genlerden olan srGAP2 geni, SLIT-ROBO Rho GTPaz aktive edici protein ailesinin bir üyesi olup; aktin dinamikleri aracılığıyla hücre göçü, hücre farklılaşması ve nöronal göçte etkilidir. Bu gen, 1q bölgesinde lokalizedir ve 1q bölgelerindeki delesyon, önceki KGH çalışmasında da gözlenmiştir (32). RGP5, nükleer bir membran ilişkili proteindir ve diğer proteinlerle etkileşimler yoluyla hücre fonksiyonları düzenler. NPHP1, Crk ilişkili substrat ile etkileşime girer ve hücre bölünmesi, hücre- hücre ve hücre- matriks adhezyon sinyalini kontrol etmede işlev görür. GTF2IRD2, retinoblastom proteininin kontrolü altındaki bir transkripsiyonel faktördür. MALL, endotel hücrelerinde hücre içi fonksiyonlarda görevlidir. MALL, caveolin ile etkileşime girer ve glikolipid veya kolesterolle zenginleştirilmiş hücre zarı girintilerine lokalize olur. PTPN20, protein tirozin fosfatazların bir üyesidir ve aktin polimerizasyonu ile ilgilidir. USP22 hücre proliferasyonu, apoptoz ve malignite gibi çeşitli hücre fonksiyonları ve metabolizma ile ilişkili süreçleri düzenleyen ilginç bir gendir. Aynı zamanda histon H2A ve H2B'nin ubiquitinasyonunda görevli olduğundan koaktivatör görevi görür. USP22, MYC gibi çeşitli onkogenlerin aktivasyonuna katılır ve osteosarkom hücre hatlarında epitelyal mezenkimal geçişin yanı sıra kolorektal karsinogeneze katkıda bulunur. Epitel hücrelerinde ve testiste eksprese edilen ANKRD30A'nın değişmiş ekspresyon seviyelerinin meme kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. TPTE, PTEN ile ilişkili tirozin fosfatazdır ve endokrin sinyal iletim yollarında ve testisin spermatojenik fonksiyonunda rol oynar. CTSE, antijen işlenmesi ve salgı proteinlerinin olgunlaşmasını içeren peptidazı kodlar (33, 34). ES/ PNET serimizdeki kopya sayısı değişiklikleri çoğunlukla sitoskeletal elementler, göç ve protein trafiği ile ilgili genlerde bulundu (32- 33). Bu genlerin Ewing Sarkom patogeneziindeki rolünü daha iyi anlamak için

daha geniş serilerde gen fonksiyonlarının da irdeleneceği çalışmalar yapılmalıdır.

Tüm moleküler ve immünohistokimyasal yöntemlere karşın; özellikle **az diferansiye ve andiferansiye nöroblastomlarda** tanı güçlüğü yaşanabilmektedir. Bu nedenle KGH analizi, hastalardaki DNA kopya sayısı değişikliklerinin tespiti için kullanılabilir. Hasta serimizde en sık Defensin beta 107A, MAGE family member A12, SPANX family member D sarkom antijeni 1, Defensin beta 106A, Defensin beta 103B, Speedy/RINGO cell cycle regulator family member E9 ve RANBP2 like and GRIP domain containing 5RANBP2 benzeri GRIP alanı (RGPD5) genlerinde kopya sayısı değişikliği gözlemlendi.

Çalışmamızda en sık kopya değişikliği saptanan genlerden olan defensin beta 107A geni ve üretimi olan defensin ailesi nötrofiller tarafından yapılan bir antimikrobiyal ve sitotoksik peptid ailesidir, immün sistemde etkilidir. Bu gen, 8p bölgesinde lokalizedir ve anormal defensin ekspresyonunun enfeksiyöz hastalık ve enflamatuar bozukluklara duyarlılık ile ilgili olduğuna dair kanıtlar vardır. Özellikle defensin beta 107A kaybı; meme, serviks, kolon ve mesane kanserlerinde gözlemlenmiştir (35). MAGE family member A12 geni X kromozomunda kümelenmiş diğer birkaç genle yakından ilgilidir. Bu genlerin melanom ve meme kanseri tümörlerinde aşırı eksprese olabileceği bildirilmiştir (36). Ancak bizim çalışmamızda nöroblastomda MAGE family member A12 geninde delesyon saptanmıştır. SPANX family member D sarkom antijeni 1, olgun spermatozoanın oluşumunda işlev görür, erkek germ hücresindeki moleküler ve morfolojik değişiklikler dizisini başlatmak için gereklidir. Bu gen, X kromozomu üzerinde bir kümede yer alan SPANX kanser / testis ile ilişkili gen ailesinin bir üyesidir. SPANX genleri, farklı subselüler bölmelerde lokalize olan, farklı şekilde eksprese edilmiş testise özgü proteinleri kodlar. Bu genin spesifik fonksiyonu henüz belirlenmemiş olsa da bu gendeki polimorfizmler prostat kanseri ve meme kanseri duyarlılığı ile ilişkili olabilir (37,38). Defensin beta 106A özellikle kazanılmış immün cevapta immün sistemi uyarmadaki süreçleri düzenleyen ilginç bir gendir (39). Defensin beta 103B antimikrobiyal ve sitotoksik peptid olup, immün sistemde etkilidir. İnsan papilloma virüsü enfeksiyonu dahil olmak üzere çeşitli stimülasyonlara cevap olarak epitelde eksprese edilen bir beta-defensin 3'ün son zamanlarda baş boyun kanserlerinde ve serviks kanserlerinde aşırı eksprese edildiği ve tümörojenik aktiviteler gösterdiği bulunmuştur (40). RGPD5 geni ise 2.kromozomda lokalize olup RAS süper ailesinin küçük bir GTP bağlayıcı proteindir, nükleer membran ile ilişkili ve diğer proteinlerle etkileşimleri yoluyla çeşitli hücresel fonksiyonları kontrol ettiği düşünülmektedir. Henüz kanser gelişimi ile ilişkisi saptanmamıştır (41).

Sonuç olarak, nöroblastom serimizdeki kopya sayısı değişiklikleri çoğunlukla immün sistemi uyarmadaki süreçleri düzenleyen genlerde bulundu (35, 36, 40 41). Bu genlerin

nöroblastom patogenezindeki rolünü daha iyi anlamak için daha geniş serilerde gen fonksiyonlarının da irdeleneceği çalışmalar yapılmalıdır.

Özellikle küçük yuvarlak hücreli malign tümörler grubunda ele alınan **indiferan malign tümörlerde** ayırıcı tanı güçlüğü beklenen bir durumdur. Tüm sofistike yöntemlere karşın; kesin tanı konamayabilir. Hatta immünohistokimyasal ve moleküler testler bile olguların bir yöne diferansiasyonunu göstermeyebilir. Bu tip olgularda KGH analizi, hastalardaki DNA kopya sayısı değişikliklerinin tespit edilmesi ve ayırıcı tanı için kullanılabilir. Hasta serimizde 9 olguda kesin ayırıcı tanıya ulaşamadık. Bu olgularda KGH analizinde en sık; immunoglobulin superfamily member 21, calcium/ calmodulin dependent protein kinase II beta, POM121 transmembrane nucleoporin, ankyrin repeat domain 30B, solute carrier family 6 member 4, peptidylprolyl isomerase B, HERC2 ve tryptophan 2,3-dioksijenaz genlerinde genlerde kopya sayısı değişikliği gözlemlendi.

Çalışmamızda en sık kopya değişikliği saptanan genlerden olan immunoglobulin superfamily member 21, 1p36.13'de lokalizedir. Bu gen, iki immünooglobulin alanına sahip olan ve immünooglobulin süper ailesinin bir üyesi olan bir proteini kodlar. Bu proteinler genellikle hücre zarlarında bulunur ve immün yanıt yollarında reseptör görevi görür. Henüz kanser gelişimi ile ilişkisi saptanmamıştır (42). Calcium/ calmodulin dependent protein kinase II beta (CAMK2B), 7p13'de lokalizedir, Bu genin ürünü, serin / treonin protein kinaz ailesine ve Ca (2 +) / kalmodulin bağımlı protein kinaz alt ailesine aittir. Kalsiyum sinyali, glutamaterjik sinapta plastisitenin birçok farklı yönleri için çok önemlidir. Özellikle yapılan çalışmada CAMK2B'nin disfonksiyonu, prostat osteoblastik kemik metastazları ile ilişkili bulunmuştur ve insan mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastogenezi ile yakın ilişkilidir (43). POM121 transmembrane nucleoporin, 7q11.23'de lokalize olup bu gen nükleer pore kompleksinin (NPK) bir bileşenidir. NPK kompleksi, nükleus-sitoplazik transport, transkripsiyon, genomun stabilitesini regüle etmede işlev görür. Ancak, kanserdeki fonksiyonel rolleri yeterince anlaşılamamıştır. NPK'nin primerden ilerlemiş metastatik prostat kanserine gelişimde rol oynayabileceğine yönelik literatürde veriler vardır (44). Ankyrin repeat domain 30B, 18p11.21'de lokalize olup ekspresyonu testis içinde sınırlıdır. Solute carrier family 6 member 4, 17q11.2 lokalizedir. Bu gen serotoninini sinaptik alanlardan presinaptik nöronlara taşıyan integral membran proteini eksprese eder. Hücrede uzun zincirli yağ asidi alımına aracılık eden bir taşıma proteini kodlar. Bu proteinlerin işlevi, esas olarak lipid biyosentezi, yağ asidi metabolik süreci ve yağ asidi taşınması ile ilgilidir. Özellikle Alzheimer hastalarında agresif davranış ve duygusal travma yaşayan insanlarda depresyon duyarlılığında rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca bu gen delesyonunun meme ve tiroid kanseri

gelişiminde katkıda bulunabileceği, kolorektal kanserli hastalarda sağkalımın azalmasına etkili olabileceği belirtilmiştir (45, 46, 47). Peptidylprolyl isomerase B, 15q22.31 de lokalizedir. Peptidylprolyl isomerase B'nin gen ürünü olan Siklofilin B (CypB), bir siklofilin ailesi üyesi olarak Siklofilin A'ya bağlanan bir endoplazmik retikulum proteindir (48, 49). CypB, peptidil-prolil cis-trans izomeraz (PPIase) aktivitesine sahiptir. PPIazlar, prolin imidip peptid bağlarının oligopeptitlerde cis-trans izomerizasyonunu katalize eder ve proteinlerin katlanmasını hızlandırır. Kodlanmış protein bir siklofilin A (CypA) bağlayıcı proteindir ve siklofilin aracılı immün baskılamada rol oynayabilir. Bu genin ürettiği protein olan CypA'nın özellikle meme, mide, serviks kanseri ve pankreas kanserinde upregüle olduğu bildirilmiştir (50, 51, 52, 53). Özellikle mide kanseri hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını düzenlediği, tümör büyümesi ve anti-apoptotik fonksiyonun kazanımı ile ilişkili olabileceği bildirilmiş ve kanser patogeneğinde çok önemli bir bağlantı olarak dikkat çekmiştir (48). Ayrıca CypB'nin overekspresyonu hücrede oluşan antioksidan enzimlerin aktivasyonunu ve sonucunda oksidatif stresin azalmasını, özellikle c-Jun N-terminal kinaz yolu ile mitojenle aktive olan protein kinaz üzerinden nörositotoksisteyi engeller (49). RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 geni (HERC2), çok sayıda yapısal alan içeren, oldukça büyük protein grubunu şifreleyen HERC gen ailesine aittir. Tüm üyeler, birkaç E3 ubiquitin protein ligazında bulunan hücre döngüsü düzenleyici RCC1'e homolog bir N-terminal bölgesinin ve bir E-terminal HECT'in (E6-AP C terminaline homolog olan) etki alanına sahiptir. HERC2 genindeki mutasyon, ciddi bir nörogelişimsel bozukluğa yol açar. Ayrıca küçük hücreli dışı akciğer kanserinde HERC2, BRCA1'in DNA hasar bölgelerine alınması için RNF8-UBC13 kompleksinin birleştirilmesini kolaylaştırır ve kanser gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (54). Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2) geni ise, 4q32.1'de lokalizedir. Bu gen, triptofan metabolizmasında kritik bir rol oynayan bir heme enzimini kodlar. Kodlanmış proteinin artmış aktivitesi ve daha sonra kynurenine üretimi ayrıca antitümör immün yanıtlarının baskılanması yoluyla kanserde de rol oynayabilir. Özellikle yapılan bir çalışmada TDO2 özofagus skuamöz hücreli karsinom kanser kök hücrelerinde aşırı ekspresyonu görülmüş ve kötü prognoz ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (55, 56).

İndiferan malign tümör tanısı alan olguların ikisinde RT, ikisinde DKYHT, birinde ise RMS öncelikli olarak düşünüldü. İki RT düşünülen olgularda KGH analizinde ortak immunoglobulin superfamily member 21, calcium/ calmodulin dependent protein kinase II beta genlerinde genlerinde kopya sayısı değişikliği gözlemlendi. İmmunoglobulin superfamily member 21, 1p36.13'de lokalize olan bu gen, iki immünoglobulin alanına sahip olan ve immünoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan bir proteini kodlar. Bu proteinler genellikle

hücre zarlarında bulunur ve immün yanıt yollarında reseptör görevi görür (42). Calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta ise (CAMK2B), 7p13'de lokalizedir, Bu genin ürünü, serin / treonin protein kinaz ailesine ve Ca (2+) / kalmodulin bağımlı protein kinaz alt ailesine aittir. Kalsiyum sinyali, glutamaterjik sinapta plastisitenin birçok farklı yönleri için çok önemlidir. Özellikle yapılan çalışmada CAMK2B'nin disfonksiyonu, insan mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastogenezi ile yakın ilişkili bulunmuştur (43). Literatürde RT tümörde ortak olarak TEAD4 amplifikasyonu ve MYC and CCND1 delesyonları saptanmıştır (57). Farklı bir çalışmada 1 olguda CGH yöntemi ile SMARCB1/INI1delesyonu bildirilmiştir (58). Bizim çalışmamızda sonuç olarak RT ortak 2 gende delesyon saptanmış, bu genlerden biri olan immunoglobulin superfamily member 21'in literatürde kanser ile ilişkisi henüz gösterilememiş ancak CAMK2B'nin mezenkimal kök hücre fonksiyonu ve diferansiyasyonunda önemli olduğu ve kaybında kanser gelişimi olabileceği bildirilmiştir (43).

İki DKYHT düşünülen olgularda KGH analizinde ortak 4 gende kopya sayısı değişikliği saptanmış bunlar; solute carrier family 6 member 4, Cyclophilin B, HERC2 delesyon ve TDO2 genlerinde amplifikasyon tespit edilmiştir. Solute carrier family 6 member 4 gen kanser hücresinde lipid biyosentezini bozarak kanser oluşmasına katkıda bulunmuş olabilir. HERC2 genindeki mutasyon sonucu hücrelerde ciddi bir nörogelişimsel bozukluk oluşmuş ve HERC2'nin, BRCA1'in fonksiyonunu bozarak tümör supresör gen inaktivasyonuna neden olmuş olabilir (54). Özellikle DKYHT'de Siklofilin B'nin delesyonu ve TOD2 gen amplifikasyonu hücrede immün yanıtlarının baskılanması yoluyla ve oksidatif stres oluşması yoluyla tümör gelişiminde de rol oynamış olabilir (49, 55, 56).

Sonuç olarak, ES/ PNET serimizdeki kopya sayısı değişiklikleri çoğunlukla sitoskeletal elementler, göç ve protein trafiği ile ilgili genlerde bulundu (32- 34). Nöroblastom serimizdeki kopya sayısı değişiklikleri çoğunlukla immün sistemi uyarmadaki süreçleri düzenleyen genlerde bulundu (35, 36, 40, 41). Bu genlerin Ewing Sarkom ve Nöroblastom gelişimindeki rolünü daha iyi anlamak için daha geniş serilerde gen fonksiyonlarının da irdeleneceği çalışmalar yapılmalıdır.

Serimizde kesin tanı koyamadığımız indifferan malign tümörlerde kopya sayısı değişiklikleri çoğunlukla mezenkimal kök hücre diferansiyasyonunda önemli olabilecek genlerde ve immün yanıtlarının baskılanması yoluyla ve oksidatif stres oluşması yoluyla tümör gelişiminde de rol oynamış olabilecek genlerde değişiklik saptandı (49-55). Bu genlerin tümör patogeneziindeki rolünü ve ayırıcı tanısına katkısı olup olmadığını daha iyi anlamak için, daha geniş serilerde gen fonksiyonlarının da irdeleneceği çalışmalar yapılmalıdır.

6.Sonuç ve Öneriler:

Tüm genom KGH yöntemi, ayırıcı tanıda zorluk yaşanan pediatrik kanserlerde faydalı olabilir. Tekniklerin ucuzlaması ile, KGH yöntemi ile tüm kromozom taraması yapılması ayırıcı tanı güçlüğü yaşanan tümörlerde ya da primeri bilinmeyen tümörlerde ayırıcı tanıda yardımcı olabilir.

Ayrıca, parafin dokusunun incelenmesinde teknik zorluklar olduğundan, tümörlerden taze doku depolanması, genetik ve moleküler incelemeler için yararlı olacaktır. Yöntemin bir kısıtlılığı da, kromozomal anomalilerin belirlenmesine rağmen, in situ hibridizasyon gibi translokasyonun rapor edilememesidir.

Ancak ayırıcı tanı güçlüğü yaşanan pediatrik tümörlerde her hastada tüm genom KGH yapmak günümüzde tanıyı belirgin hale getirmeye yaramaktan çok kafa karıştırıcı olabilir. Bu bilgilerin iyi bir bioinformatik programla desteklenmesi gerekmektedir. Tüm genom analizler giderek yerini yeni nesil dizi analizi metodu ile daha ucuz ve daha etkin olarak araştırılır hale getirmiştir. Tümörlerdeki intratümöral heterojenite nedeniyle aynı tanıya sahip farklı hastaların tümör dokuları aynı moleküler özellikleri göstermemektedir.

Tüm genom analizler ayırıcı tanı ile birlikte tedavi kararı vermede, prediktif ve prognostik yönden de önem taşımaktadır.

Nadir tümörlerin tüm genom analizinin bilgi birikimi zamanla daha çözümsel yaklaşımlar getirecektir.

7. Kaynaklar:

1. Yaman Bajin I, Kutluk T. Çocukluk çağı kanserlerinin epidemiyolojisi ve risk faktörleri. Kanser gündemi dergisi. 2016; 4/1-2: 21-25.
2. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer. Third edition. Cancer 2005;103:1457-67. Kutluk MT, Yeşilipek A. Turkish National Pediatric Cancer Registry 2002-2008 (Turkish Pediatric Oncology Group and Turkish Pediatric Hematology Society). J Clin Oncol 2017; 31.
3. Tosun Yildirim H, Yildirim H, Diniz G, Aktas S, Vergin C. Childhood Malign Solid Soft Tissue Sarcomas; Diagnostic, Histopathological and Molecular Approach. Izmir Dr. Behcet Uz Cocuk Hast. Dergisi 2019;9:1-9
4. Picarsic J, Reyes-Múgica M. Phenotype and immunophenotype of the most common pediatric tumors. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2015; 23: 313-26
5. Chen X, Pappo A, Dyer MA. Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy. Oncogene 2015; 34: 5207-15.
6. Allen-Rhoades W, Whittle SB, Rainusso N. Pediatric Solid Tumors of Infancy: An Overview. Pediatr Rev 2018; 39: 57-67.
7. Rajwanshi A, Srinivas R, Upasana G. Malignant small round cell tumors. J Cytol. 2009;26(1):1-10
8. Merchant MS, Mackall CL. Current approach to pediatric soft tissue sarcomas. Oncologist 2009;14: 1139-53
9. Kapoor G, Das K. Soft tissue sarcomas in children. Indian J Pediatr 2012;79: 936-42.
10. Chang CC, Shidham VB. Molecular genetics of pediatric soft tissue tumors: clinical application. J Mol Diagn 2003;5: 143-54.
11. D'cruze L, Dutta R, Rao S, Varadarajan S, Kuruvilla S. The role of immunohistochemistry in the analysis of the spectrum of small round cell tumours at a tertiary care centre. J Clin Diagn Res. 2013;7: 1377-82.
12. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Cetingul N ve ark. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. Pediatr Hematol Oncol 2003;20: 211-8.
13. Castleberry RP. Biology and treatment of neuroblastoma. Pediatr Clin North Am 1997;44: 919-37.
14. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. Hematol Oncol Clin North Am 2010;24: 65-86.

15. Bradeur GM, Maris JM. Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Roven. 2006.
16. Orhan D (Ed). Pediatrik Tümör Patolojisi. Izmir, O'tıp Kitapevi; 2015
17. Choi EY, Gardner JM, Lucas DR, McHugh JB, Patel RM. Ewing sarcoma. Semin Diagn Pathol 2014;31: 39-47.
18. Wei S, Siegal GP. Round cell tumors of bone: an update on recent molecular genetic advances. Adv Anat Pathol 2014;21: 359-72
19. Magro G, Longo FR, Angelico G, Spadola S ve ark. Immunohistochemistry as potential diagnostic pitfall in the most common solid tumors of children and adolescents. Acta Histochem 2015;117: 397-414.
20. Lar DR, Su WT, Wolden SL, Loh KC ve ark. Results of multimodal treatment for desmoplastic round cell tumors. J Pediatr Surg 2005;40: 251-255.
21. Alaggio R, Boldrini R, Di Venosa B, Rosolen A ve ark. Pediatric extra-renal rhabdoid tumors with unusual morphology: a diagnostic pitfall for small biopsies. Pathol Res Pract 2009;205: 451-7.
22. King W, Proffitt J, Morrison L, Piper J, Lane D, Seelig S. The role of fluorescence in situ hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management. Mol Diagn 2000;5: 309-19.
23. Chiyan Lau, 2016, Molecular Pathology in Cancer Research, Lakhani SR, Fox SB (Editors), Springer, New York, U.S.A.
24. Hester SD, Reid L, Nowak N, Jones WD ve ark. Comparison of comparative genomic hybridization technologies across microarray platforms. J Biomol Tech 2009;20: 135-51.
25. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D ve ark. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992;258: 818-21
26. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J ve ark. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. Am J Hum Genet 1995;57: 1211-20.
27. Szczaluba K, Demkow U. Array comparative genomic hybridization and genomic sequencing in the diagnostics of the causes of congenital anomalies. J Appl Genet 2017;58: 185-198.
28. Kallioniemi A. CGH microarrays and cancer. Curr Opin Biotechnol 2008;19: 36-40

29. Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T ve ark. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Gene Chromosome Canc* 2006; 45: 1033-1040.
30. Savola S, Klami A, Tripathi A, Niini T ve ark. Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. *BMC Cancer* 2009; 9: 1-17
31. www.ncbi.nlm.nih.gov/gene (2019).
32. Savola S, Klami A, Tripathi A, Niini T, Serra M, Picci P, Kaski S, Zambelli D, Scotlandi K, Knuutila S. Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. *BMC Cancer* 2009; 9-17.
33. Brohl AS, Solomon DA, Chang W, Wang J, Song Y, Sindiri S, Patidar R, Hurd L, Chen L, Shern JF. The Genomic Landscape of the Ewing Sarcoma Family of Tumors Reveals Recurrent STAG2 Mutation. *PLoS Genet* 2014; 10, e1004475.
34. Zhang D, Jiang F, Wang X, Li G. Downregulation of Ubiquitin-Specific Protease 22 Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma Cells. *Oncol. Res* 2017; 25: 763–771.
35. Taudien S, Huse K, Groth M, Platzer M. Narrowing down the distal border of the copy number variable beta-defensin gene cluster on human 8p23. *BMC Res Notes*. 2014;7:93-97
36. Wu J, Wang J, Shen W. Identification of MAGEA12 as a prognostic outlier gene in gastric cancers. *Neoplasma* 2017;64: 238-243.
37. Kouprina N, Noskov VN, Solomon G, Otsot J ve ark. Mutational analysis of SPANX genes in families with X-linked prostate cancer. *Prostate* 2007;67: 820-8
38. Maine EA, Westcott JM, Precht AM, Dang TT ve ark. The cancer-testis antigens SPANX-A/C/D and CTAG2 promote breast cancer invasion. *Oncotarget* 2016;7: 14708-26.
39. De Paula VS, Gomes NS, Lima LG, Miyamoto CA ve ark. Structural basis for the interaction of human β -defensin 6 and its putative chemokine receptor CCR2 and breast cancer microvesicles. *J Mol Biol* 2013;425: 4479-95.
40. Xu D, Zhang B, Liao C, Zhang W ve ark. Human beta-defensin 3 contributes to the carcinogenesis of cervical cancer via activation of NF- κ B signaling. *Oncotarget* 2016;7: 75902-75913

41. Nothwang HG, Rensing C, Kübler M, Denich D ve ark. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998;47: 383-92.
42. Lin X, Wang J, Yun L, Jiang S ve ark. Association between LEKR1-CCNL1 and IGSF21-KLHDC7A gene polymorphisms and diabetic retinopathy of type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *J Gene Med* 2016;18: 282-287.
43. Mamaeva OA, Kim J, Feng G, McDonald JM. Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates notch-1 signaling in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2009;106: 25-32..
44. Rodriguez-Bravo V, Pippa R, Song WM, Carceles-Cordon M ve ark. Nuclear Pores Promote Lethal Prostate Cancer by Increasing POM121-Driven E2F1, MYC, and AR Nuclear Import. *Cell* 2018;174: 1200-1215.e20.
45. Savas S, Hyde A, Stuckless SN, Parfrey P ve ark. Serotonin transporter gene (SLC6A4) variations are associated with poor survival in colorectal cancer patients. *PLoS One* 2012;7:e38953.
46. De Summa S, Graziano F, Pilato B, Pinto R ve ark. Six low-penetrance SNPs for the estimation of breast cancer heritability: A family-based study in Caucasian Italian patients. *Oncol Lett* 2017;14: 4384-4390
47. Suh S, Kim YH, Goh TS, Jeong DC ve ark. mRNA Expression of SLC5A5 and SLC2A Family Genes in Papillary Thyroid Cancer: An Analysis of The Cancer Genome Atlas. *Yonsei Med J* 2018;59: 746-753.
48. Nakano N, Sakashita S, Matsuoka R, Murata Y ve ark. Cyclophilin A expression and its prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 2017;67: 555-563.
49. Oh Y, Jeong K, Kim K, Lee YS ve ark. Cyclophilin B protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells against MPP(+)-induced neurotoxicity via JNK pathway. *Biophys Res Commun* 2016;478: 1396-402.
50. Meng DQ1, Li PL2, Xie. Expression and role of cyclophilin B in stomach cancer. *Genet Mol Res* 2015;14: 5346-54.
51. Ray P, Sullenger BA, White RR. Further characterization of the target of a potential aptamer biomarker for pancreatic cancer: cyclophilin B and its posttranslational modifications. *Nucleic Acid Ther* 2013;23: 435-42.
52. Fang F1, Zheng J, Galbaugh TL, Fiorillo AA ve ark. Cyclophilin B as a co-regulator of prolactin-induced gene expression and function in breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2010;44: 319-29.

53. De Summa S, Graziano F, Pilato B, Pinto R ve ark. Six low-penetrance SNPs for the estimation of breast cancer heritability: A family-based study in Caucasian Italian patients. *Oncol Lett* 2017;14: 4384-4390.
54. Bonanno L, Costa C, Majem M, Sanchez JJ ve ark. Combinatory effect of BRCA1 and HERC2 expression on outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 2016; 16: 312.
55. Pham QT, Oue N, Sekino Y, Yamamoto Y ve ark. TDO2 Overexpression Is Associated with Cancer Stem Cells and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 2018;95: 297-308.
56. Bai WX, Gao J, Qian C, Zhang XQ. A bioinformatics analysis of differentially expressed genes associated with liver cancer. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2017;25: 435-439.
57. Suzuki M, Kondo A, Ogino I, Arai H ve ark. Overexpression of TEAD4 in atypical teratoid/rhabdoid tumor: New insight to the pathophysiology of an aggressive brain tumor. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64(7) e26398
58. Wu WW, Bi WL, Kang YJ, Ramkissoon SH ve ark. Adult Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors. *World Neurosurg* 2016;85: 197-204.


T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi
Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Komitesi

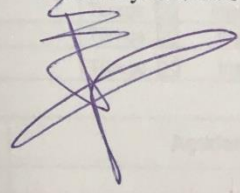
SAYI : B-10-4-ISM-4-35-65-72/Etik Komite
TARİH : 31.03.2011 / 6
KONU : Etik Komite Başvuruları

Sayın.. Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

“AYIRICI TANI ZORLUĞU YAŞANAN PEDIATRİK KANSERLERDE MİKRODİZİN SİSTEMİ İLE KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK HİBRİDİZASYONLA TÜM KROMOZOMLARDA ANOMALİ TARANMASININ YERİ.” isimli araştırmanız 31.03.2011 tarihinde İzmir BUÇH Klinik Araştırmalar Etik Komitesi’nce incelenmiş, ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik komite üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

Çalışmanızın durumunu yılda bir “Klinik Araştırma İçin Etik Komiteye Yapılan Yıllık Bildirim Formu” ile bildirirkeniz, fakat çalışmanızın erken bitmesi durumunda araştırmanızın özeti ile beraber “Klinik Araştırmanın Sona Erdiğine İlişkin Etik Komiteye Yapılan Bildirim Formu” nu doldurarak İzmir Dr Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Komitesi’ne bildirirkenizi rica ederim.

Klinik Araştırmalar
Etik Komite Başkanı
Uz. Dr. Aysel ÖZTÜRK



Browser tabs: Zimbra: Gelen Kutusu (15), e-Century Publishing, Invoice.pdf

Address bar: https://e-century.us/submission/app_customer_order_review.php?ID=97647

Navigation: Uygulamalar, Önerilen Siteler, e-Century Publishing, Yeni Selmeye

e-Century Publishing

Contact Us, My Account

Home, Account Update, Submit Manuscript, My Manuscripts (13), Sign Out

Tracking ID: IJCEP0097647

Submitted by Gulden Diniz (gulden.diniz@du.edu.tr) at 2019-05-28 07:55:01

Status:	Accepted
Review Comments	Preliminary review found that this is an interesting, very well-prepared manuscript; the data is interesting and convincing and is suitable for publication in this journal. Please consider your manuscript as 'accepted' although we may contact you again for clarification, even minor revision if there are any questions during following further processing/reviewing. Otherwise, you may receive the PDF of your paper for proofreading directly 1-2 weeks before publication along with the official editorial decision. Minor revisions, if any will be performed by our editorial staff directly for the efficiency. The attached file is for your reference when preparing your new manuscripts for submission to our journals in the future to avoid the similar errors, if any. At the same time, please go to www.e-century.org to download EndNote Output Style and the Sample Manuscript for your reference when preparing new submissions to us in the future. Thank you for publishing your nice paper with us. We look forward to receiving more great manuscripts from you in the near future: www.e-century.org

invoice.pdf, Tümüü göster

Windows Taskbar: Başlat, Internet Explorer, File Explorer, VLC, PowerPoint, Google Chrome, Paint, Skype, Zoom, Word, System Tray: 13:41, 04.07.19

The place of scanning all chromosomal abnormalities with microarray- based comparative genomic hybridisation in pediatric cancers posing difficulties in differential diagnosis

Hulya Tosun Yildirim¹, Safiye Aktas², Gulden Diniz³, Tekincan Cagri Aktas²,

Burcin Baran², Zekiye Altun², Yasemin Cakir², Nur Olgun²

¹ Health Sciences University, Antalya Education and Research Hospital, Department of

Pathology, Antalya/ Turkey; ² Dokuz Eylul University, Oncology Institute, Department of Basic

Oncology, Izmir/ Turkey; ³ Izmir Democracy University, Department of Pathology, Izmir/

Turkey

Running title: CGH in pediatric cancers

Address correspondence to: Dr. Gulden Diniz, Department of Pathology, Izmir

Tepecik Education and Research Hospital, Kibris Sehitleri Cad. 51/11. Alsancak

35220 Izmir, Turkey. Tel: +90 542 2431309; Fax: +90 232 3625522; E-mail:

gulden.diniz@idu.edu.tr; agdiniz@gmail.com

Disclosure of conflict of interest

This study was financially supported by Association of Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG).

ABSTRACT:

Objective: Despite conventional histopathological and immunohistochemical methods, difficulties may be experienced in the differential diagnosis of pediatric cancers, especially in small round-cell undifferentiated tumours. In these cases, determination of chromosomal abnormalities may be helpful. The aim of this study was to evaluate the place of the whole genome array comparative genomic hybridization method in pediatric cancers where difficulty is experienced in differential diagnosis. **Method:** In Comparative Genomic Hybridization (CGH), 135,000 probes were scanned as 3 probes per gene in all genomes. It was possible to analyze paraffin block tissues obtained from the archive of the Pathology Laboratory of Dr Behcet Uz Children's Hospital. DNA extraction was made from the paraffin blocks of 24 cases where difficulty had been experienced in making the differential diagnosis and in each case, comparisons with control samples were made for all anomalies in all chromosomes with microarray technology. **Results:** Together with the typically observed chromosomal anomalies, additional derangements with debatable importance were determined. **Conclusion:** The whole genome CGH method may be useful in pediatric cancers where difficulties are experienced in making differential diagnosis. Since technical difficulties are experienced in the examination of paraffin-embedded tissue samples, storing fresh tissue samples from each tumor will be helpful for genetic and molecular examinations.

Key Words: Comparative Genomic Hybridization (CGH), Pediatric Cancers, Small round cell malignant tumors, Differential Diagnosis.

INTRODUCTION

Malignancies are also among important causes of death in children. In developed countries, less than one percent of cancers occur in children under 15 years of age. The overall cancer prevalence is between 70 -160 per million people under the age of 15 years [1]. In developing countries such as our country, malignancies are the fourth most common cause of death. The differential diagnosis is more important in childhood malignancies due to the longer life expectancy in childhood [1].

Primitive small round cell tumors observed in childhood belong to heterogeneous malignant tumor groups that constitute 0.1% of childhood malignant tumors. These tumors mainly seen in childhood may be listed as neuroblastoma, sarcomas including rhamdomyosarcomas, non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas, Ewing sarcoma (ES)/ primitive neuroectodermal tumor (PNET), desmoplastic small round cell tumor (DSRCT) and malignant rhabdoid / teratoid tumor (RT) [1-3].

The whole genome-comparative genomic hybridization technique is a cytogenetic method based on FISH demonstrating fluorescent color differences obtained by linking test (patient), and reference DNA samples stained with different fluorescent dyes to normal chromosomes. With this method; structural chromosomal anomalies that cannot be detected by standard techniques can be identified more reliably, allowing both comparison of at least two genomes with each other, and analyzing the whole genome in a single experiment [4-6].

The aim of this study is to investigate the role of whole genome-comparative genomic hybridization in pediatric cancers posing difficulties in differential diagnosis.

MATERIAL AND METHOD

In the Pathology Laboratory of Dr Behçet Uz. Children's Hospital DNA samples were extracted from the paraffin blocks of 24 patients where difficulty was experienced in the differential diagnosis, and CGH analysis was performed. The anticipated chromosomal anomalies were compared with the clinicopathological findings.

In comparative genomic hybridization analysis, the differences in the number of copies in the whole genome or in a region on the genome with referenced genome

were determined using NimbleGen CGH arrays. The DNA of 24 patients (test DNA) and normal DNA (control DNA) to be analyzed for CGH were labeled with different fluorochromes and hybridized with metaphase chromosomes obtained from normal cells. Differences in fluorescence intensities across chromosomes in the reference metaphase domain refer to the differences in the number of copies (amplifications or deletions) in the tumor DNA. If DNAs showing different fluorescent phenotypes overlap with normal metaphase chromosomes, they are observed in a blue-orange color.

If there is a deletion in the test DNA, hybridization does not occur in this region, so this region is observed as a red domain. In contrast, if there is an amplification in the DNA, the region is observed as a green region brighter than the other regions because hybridization is more intense in this region. Chromosome hybridization profiles were calculated according to hybridization rates using a special image analysis software program.

RESULTS

Our study population consisted of patients with Ewing sarcomas (n=10), neuroblastomas (n=5), and undifferentiated malignant tumors (n=9). (Table 1). Priorly diagnoses of RT (n=2), DSRCT (n=2), RMS (n=1) were considered in 5 cases with diagnoses of undifferentiated malignant tumor. The ages of the patients ranged from 2 months to 18 years. The mean age of the patients was 8.7 ± 5.3 years. The series consisted of 10 boys (41.7%) and 14 girls (58.3%). Tumors were localized in kidneys and adrenal glands (n=6), abdominal cavity (n=4), chest wall (n=4), soft tissue of hip or extremity (n= 3), the lungs or pleura (n=2), pelvic region (n=2), and liver (n=1). The location of the tumor was unknown in 2 cases sent for the consultation (Table 1).

In all, 3 male and 7 female Ewing sarcoma patients were analyzed (Figure 1). The median age of the patients was 8,6 years. The oldest and the youngest patients were 14 years, and 1 year old, respectively. The tumors were located in different body parts. These tumors were localized in extremities (n=2), lung (n=1), and soft tissue of the trunk (n=7). In CGH analysis frequently detected 8 gene domains (commonly shared gene domains found in 6 and 7 cases with Ewing sarcoma (Table 2).

In our series, 1 male, and 4 female patients with a median age of 7.2 years (range, 2-16 years) received the diagnosis of undifferentiated neuroblastoma.

Tumors were localized in adrenal glands in 3 cases. In the CGH analysis, frequently 8 gene regions (commonly shared in 4 or 5 of 9 cases) were detected (Table 3).

In addition, 9 cases were diagnosed as undifferentiated malignant tumor. Among cases diagnosed as undifferentiated tumors priorly diagnoses of RT (n=2), DSCRT (n=2), and RMS (n=1) were considered. In the CGH analysis, frequently 8 gene regions (commonly shared in 4 or 5 of 9 cases) were detected (Table 4).

DISCUSSION

Due to the heterogeneous structure of the primitive small round cell tumors, the limitation in the number of tissue specimens sampled in the biopsy, and the overlapping morphological and even immunohistochemical findings, the differential diagnosis may be challenging. Therefore, molecular analyses may be needed for the diagnosis of these tumors [7]. A single translocation or deletion analyzed with a single probe may not always yield precise results. Since, the chromosomal anomaly in question may not be of uniform type, variations can be found, or, it may be necessary to look at multiple sites for differential diagnosis. In these cases, CGH may help to detect chromosomal anomalies [6].

In our ES/ PNET patient cohort, most frequently the number of copies were altered in genes srGAP2, RGD5, NPHP1, GTF2IRD2, PDXDC1. The srGAP2 is a member of SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein family, which regulates cell differentiation and neuronal migration. The gene is also located in the region 1q. The deletion in 1q regions were observed in previously performed CGH analysis, as well [8]. RGD5 is a nuclear membrane-associated protein and regulates cellular functions through interactions with other proteins. NPHP1 interacts with Crk-associated substrate and functions in controlling cell division, cell-cell and cell-matrix adhesion signaling. GTF2IRD2 is a transcriptional factor under the control of retinoblastoma protein.

MALL participates in raft-mediated trafficking in endothelial cells. MAL1 interacts with caveolin and is localized in glycolipid or cholesterol-enriched membrane rafts. PTPN20 is a member of protein tyrosine phosphatases and involves in actin polymerization. USP22 is an interesting gene and regulates various cellular and organismal processes such as cell proliferation, apoptosis and malignant transformation. It also deubiquitinates histones H2A and H2B, thereby acting as coactivator. USP22 participates in activation of several oncogenes such as MYC and contributes to stemness in colorectal carcinogenesis as well as epithelial

mesenchymal transition in osteosarcoma cell lines. Altered levels of ANKRD30A expressed in epithelial cells and in testis, is found to be associated with breast cancer. TPTE is PTEN- related tyrosine phosphatase and plays a role in endocrine signal transduction pathways and in spermatogenic function of testis. CTSE encodes peptidase that involves in antigen processing and maturation of secretory proteins [1, 8].

Despite all molecular and immunohistochemical methods, especially difficulty may be experienced in the diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated neuroblastomas. Defensin beta 107A gene where copy number variations were most frequently detected in CGH analysis performed in our patient series and defensin family produced by neutrophils are antimicrobial and cytotoxic peptides effective on immune system. There is evidence that abnormal defensin expression is related to susceptibility to infectious diseases and inflammatory disorders. Especially loss/deletion of defensin beta 107A has been observed in breast, cervix, colon and bladder cancers [10- 12].

The MAGE family member A12 gene is closely related to several other genes clustered on the X chromosome. It has been reported that these genes may be overexpressed in melanoma and breast cancer tumors [13, 14]. However, in our study, a deletion was detected in the MAGE family member A12 gene in cases of neuroblastoma. SPANX family member D sarcoma antigen 1 functions in the formation of mature spermatozoa. It is necessary to initiate the sequence of molecular and morphological changes in the male germ cell. This gene is a member of the gene family associated with the SPANX cancer / testis localized in a cluster on the X chromosome. SPANX genes encode diversely differentiated testis-specific proteins that are localized in different subcellular compartments. Although the specific function of this gene has not yet been determined, polymorphisms in this gene may be associated with susceptibility to prostate and breast cancer [15, 16].

Defensin beta 106A is an interesting gene that regulates the processes of stimulating the immune system, especially in the acquired immune response [17]. Defensin beta 103B is also effective in the immune system. A beta-defensin 3, expressed in the epithelium in response to various stimulations, including human papilloma virus infection, has recently been found to be overexpressed in head and neck cancers and cervical cancers and has been shown to exhibit tumorigenic activities [17, 18]. However, the RGD5 gene is a small GTP binding protein of the

RAS superfamily, thought to control various cellular functions associated with nuclear membrane and interactions with other proteins. Its relationship with cancerogenesis has not been detected yet [19].

Difficulties encountered in making the differential diagnosis of undifferentiated malignant tumors, especially in the group of small round cell malignant tumors are already anticipated. Even immunohistochemical and molecular tests may not show the degree of differentiation of the cases. In such cases, the CGH analysis can be used both to detect DNA copy number variations and to make differential diagnosis. In 9 cases of our patient series where we could not arrive at a definite differential diagnosis. The immunoglobulin superfamily member 21 gene, which is one of the genes most frequently demonstrating copy number variations in the CGH analysis, encodes a protein that is a member of the immunoglobulin superfamily. These proteins are usually found in cell membranes and act as receptors in immune response pathways. Its association with cancerogenesis has not been determined yet [20].

The product of the calcium / calmodulin- dependent protein kinase II beta (CAMK2B) gene belongs to the serine / threonine protein kinase family and the Ca (2+) / calmodulin- dependent protein kinase subfamily. Calcium signaling is very important for many different aspects of plasticity in glutamatergic synapse. In one study, dysfunction of CAMK2B was associated with osteoblastic bone metastases of prostate and it is closely related to osteoblastogenesis of human mesenchymal stem cells [21]. POM121 transmembrane nucleoporin is a component of the nuclear pore complex (NPC). The NPC functions in the regulation of nucleus- cytoplasmic transport, transcription, and the stability of the genome. However, their functional roles in cancer have been poorly understood. There is evidence in the literature that NPC may play a role in the development of primary metastatic prostate cancer [22].

Ankyrin repeat domain 30B gene expression is contained in the testis. Solute carrier family 6 member gene expresses the integral membrane protein that transports serotonin from synaptic domains to presynaptic neurons. It encodes a transport protein that mediates the uptake of long-chain fatty acids in the cell. The function of these proteins is mainly related to lipid biosynthesis, fatty acid metabolic process and fatty acid transport. It has been shown to play a role in depression sensitivity in people with aggressive behavior and emotional trauma, especially in Alzheimer's patients. In addition, the deletion of this gene may contribute to the

development of breast and thyroid cancer, and may be effective in reducing survival in patients with colorectal cancer [23- 25]. Peptidylprolyl isomerase B, a gene product cyclophilin B (CypB), is an endoplasmic reticulum protein that binds to cyclophilin A which is a member of cyclophilin family [26, 27]. CypB has peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) activity. PPIases catalyze the cis-trans isomerization of proline and peptide bonds in oligopeptides and accelerate the folding of proteins. The encoded protein is a cyclophilin A (CypA) binding protein and may play a role in cyclophilin mediated immunosuppression. CypA, the protein produced by this gene, has been reported to be upregulated in breast, stomach, cervical, and pancreatic cancers [28- 31]. In particular, it has been reported that it regulates the growth and survival of gastric cancer cells, and may be related to the recovery of tumor growth and anti-apoptotic function, and it has been noted as a very important link in the pathogenesis of cancer [26]. In addition, the overexpression of CypB inhibits the activation of antioxidant enzymes in the cell and resultant reduction of oxidative stress, especially the neurogenic cytotoxicity by mitogen-activated protein kinase through c-Jun N-terminal kinase pathway [27].

The RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 2 gene (HERC2) belongs to the HERC gene family which encodes a very large group of proteins containing a large number of structural domains. The mutation in the HERC2 gene leads to severe neurodevelopmental disorder. Furthermore, in non-small cell lung cancer, HERC2 facilitates the incorporation of the RNF8-UBC13 complex so as to introduce BRCA1 to DNA damage sites. Besides, its association with cancer development has been reported [32]. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2) gene encodes a heme enzyme that plays a critical role in tryptophan metabolism. Increased activity of the encoded protein and then the production of kynurenine may also play a role in cancer through the suppression of antitumor immune responses. In one study, overexpression of TDO2 was observed in cancer stem cells of esophageal squamous cell carcinoma and its probable association with poor prognosis has been indicated [33, 34].

In conclusion, CGH array may be a useful method for detection of DNA copy number alterations among pediatric patients with undifferentiated malign tumors. In our ES/ PNET dataset the copy number alterations are mostly found in genes related with cytoskeletal elements, migration and protein trafficking among our patient group. Changes in the number of copies in our neuroblastoma series were mostly found in

genes that regulate the processes in the stimulation of the immune system [11, 12, 17, 18]. Changes in the number of copies in undifferentiated malignant tumors were found in genes that may be important in mesenchymal stem cell differentiation and in genes that may have played a role in tumor development through suppression of immune responses and induction of oxidative stress [21, 26-31]. In order to better understand the role of these genes in tumorigenesis and their contribution to the differential diagnosis, it is necessary to examine the functions of genes in larger series.

Acknowledgements: This text has been edited by Gurkan Kazanci, a professional translator from Logos Publishing.

Disclosure of conflict of interest: This study was financially supported by Association of Turkish Pediatric Oncology Group (TPOG).

Address correspondence to: Prof. Dr. Gulden Diniz, MD, PhD.

Izmir Democracy University, Department of Pathology.

Kibris Sehitleri Cad, 51/11 Alsancak, 35220 Izmir,

Turkey. Tel: +90.232.3625547; Fax: +90.232.362-

5522; E-mail: gulden.diniz@idu.edu.tr

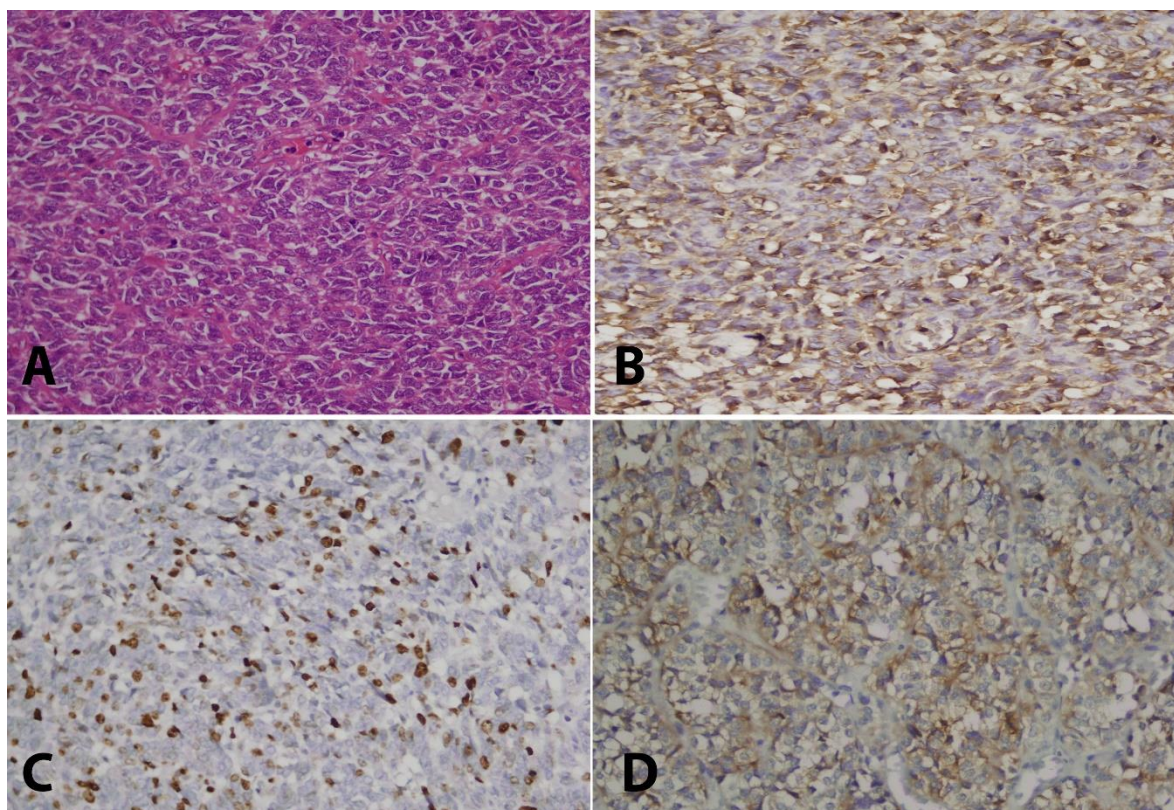
References

1. Rajwanshi A, Srinivas R, Upasana G. Malignant small round cell tumors. J Cytol 2009;26(1):1-10 doi: 10.4103/0970-9371.54861.
2. Merchant MS, Mackall CL. Current approach to pediatric soft tissue sarcomas. Oncologist 2009;14(11):1139-53 doi: 10.1634/theoncologist.2009-0160
3. Kapoor G, Das K. Soft tissue sarcomas in children. Indian J Pediatr 2012;79(7):936-42. doi: 10.1007/s12098-011-0560-4
4. King W, Proffitt J, Morrison L, Piper J, Lane D, Seelig S. The role of fluorescence in situ hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management. Mol Diagn 2000;5(4):309-19.
5. Chiyan Lau, 2016, Molecular Pathology in Cancer Research, Lakhani SR, Fox SB (Editors), Springer, New York, U.S.A.
6. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. Am J Hum Genet 1995;57(5):1211-20.

7. Chang CC, Shidham VB. Molecular genetics of pediatric soft tissue tumors: clinical application. *J Mol Diagn* 2003;5(3):143-54. doi:10.1016/S1525-1578(10)60466-7
8. Savola S, Klami A, Tripathi A, et al. Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. *BMC Cancer* 2009; 9: 1-17
9. Delattre O, Zucman J, Melot T, 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: 294–299
10. Zhang D, Jiang F, Wang X, Li G. Downregulation of Ubiquitin-Specific Protease 22 Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma Cells *Oncol Res* 2017; 25: 763–771
11. Jones EA, Kananurak A, Bevins CL, Hollox EJ, Bakaletz LO. Copy number variation of the beta defensin gene cluster on chromosome 8p influences the bacterial microbiota within the nasopharynx of otitis-prone children. *PLoS One* 2014;9(5):e98269. doi: 10.1371/journal.pone.0098269.
12. Hollox EJ, Armour JA, Barber JC. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet* 2003;73(3):591-600.
13. Zhao G, Bae JY, Zheng Z, Park HS, Chung KY, Roh MR, Jin Z. Overexpression and Implications of Melanoma-associated Antigen A12 in Pathogenesis of Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2019;39(4):1849-1857. doi: 10.21873/anticancerres.13292
14. Wu J, Wang J, Shen W. Identification of MAGEA12 as a prognostic outlier gene in gastric cancers. *Neoplasma* 2017;64(2):238-243. doi: 10.4149/neo_2017_210
15. Kouprina N, Noskov VN, Solomon G, Otstot J, Isaacs W, Xu J, Schleutker J, Larionov V. Mutational analysis of SPANX genes in families with X-linked prostate cancer. *Prostate* 2007;67(8):820-8
16. Maine EA, Westcott JM, Prechtel AM, Dang TT, Whitehurst AW, Pearson GW. The cancer-testis antigens SPANX-A/C/D and CTAG2 promote breast cancer invasion. *Oncotarget* 2016;7(12):14708-26. doi: 10.18632/oncotarget.7408
17. De Paula VS, Gomes NS, Lima LG, Miyamoto CA, Monteiro RQ, Almeida FC, Valente AP. Structural basis for the interaction of human β -defensin 6 and its

- putative chemokine receptor CCR2 and breast cancer microvesicles. *J Mol Biol* 2013;425(22):4479-95. doi: 10.1016/j.jmb.2013.08.001.
18. Xu D, Zhang B, Liao C, Zhang W, Wang W, Chang Y, Shao Y. Human beta-defensin 3 contributes to the carcinogenesis of cervical cancer via activation of NF- κ B signaling. *Oncotarget* 2016;7(46):75902-75913. doi: 10.18632/oncotarget.12426
 19. Nothwang HG, Rensing C, Kübler M, Denich D, Brandl B, Stubanus M, Haaf T, Kurnit D, Hildebrandt F. Identification of a novel Ran binding protein 2 related gene (RANBP2L1) and detection of a gene cluster on human chromosome 2q11-q12. *Genomics* 1998;47(3):383-92.
 20. Lin X, Wang J, Yun L, Jiang S, Li L, Chen X, Li Z, Lu Q, Zhang Y, Ma X. Association between LEKR1-CCNL1 and IGSF21-KLHDC7A gene polymorphisms and diabetic retinopathy of type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *J Gene Med* 2016;18(10):282-287. doi: 10.1002/jgm.2926
 21. Mamaeva OA, Kim J, Feng G, McDonald JM. Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulates notch-1 signaling in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2009;106(1):25-32. doi: 10.1002/jcb.21973.
 22. Rodriguez-Bravo V, Pippa R, Song WM, Carceles-Cordon M, Dominguez-Andres A, Fujiwara N, et al. Nuclear Pores Promote Lethal Prostate Cancer by Increasing POM121-Driven E2F1, MYC, and AR Nuclear Import. *Cell* 2018;174(5):1200-1215.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.015
 23. Savas S, Hyde A, Stuckless SN, Parfrey P, Younghusband HB, Green R. Serotonin transporter gene (SLC6A4) variations are associated with poor survival in colorectal cancer patients. *PLoS One* 2012;7(7):e38953. doi: 10.1371/journal.pone.0038953
 24. De Summa S, Graziano F, Pilato B, Pinto R, Danza K, Lacalamita R, Serratì S, Sambiasi D, Grassi M, Tommasi S. Six low-penetrance SNPs for the estimation of breast cancer heritability: A family-based study in Caucasian Italian patients. *Oncol Lett* 2017;14(4):4384-4390. doi: 10.3892/ol.2017.6725
 25. Suh S, Kim YH, Goh TS, Jeong DC, Lee CS, Jang JY, Cha W, Han ME, Kim SJ, Kim IJ, Pak K. mRNA Expression of SLC5A5 and SLC2A Family Genes in Papillary Thyroid Cancer: An Analysis of The Cancer Genome Atlas. *Yonsei Med J* 2018;59(6):746-753. doi: 10.3349/ymj.2018.59.6.746.

26. Nakano N, Sakashita S, Matsuoka R, Murata Y, Shiba-Ishii A, Kobayashi N, Sato Y, Noguchi M. Cyclophilin A expression and its prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 2017;67(11):555-563. doi: 10.1111/pin.12593.
27. Oh Y, Jeong K, Kim K, Lee YS, Jeong S, Kim SS, Yoon KS, Ha J, Kang I, Choe W. Biochem. Cyclophilin B protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells against MPP(+)-induced neurotoxicity via JNK pathway. *Biophys Res Commun* 2016;478(3):1396-402. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.135
28. Meng DQ¹, Li PL², Xie. Expression and role of cyclophilin B in stomach cancer. *Genet Mol Res* 2015;14(2):5346-54. doi: 10.4238/2015.
29. Ray P, Sullenger BA, White RR. Further characterization of the target of a potential aptamer biomarker for pancreatic cancer: cyclophilin B and its posttranslational modifications. *Nucleic Acid Ther* 2013;23(6):435-42. doi: 10.1089/nat.2013.0439.
30. Fang F¹, Zheng J, Galbaugh TL, Fiorillo AA, Hjort EE, Zeng X, Clevenger CV. Cyclophilin B as a co-regulator of prolactin-induced gene expression and function in breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2010;44(6):319-29. doi: 10.1677/JME-09-0140.
31. De Summa S, Graziano F, Pilato B, Pinto R, Danza K, Lacalamita R, et al. Six low-penetrance SNPs for the estimation of breast cancer heritability: A family-based study in Caucasian Italian patients. *Oncol Lett* 2017;14(4):4384-4390. doi: 10.3892/ol.2017.6725
32. Bonanno L, Costa C, Majem M, Sanchez JJ, Rodriguez I, Gimenez-Capitan A, et al. Combinatory effect of BRCA1 and HERC2 expression on outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 2016;16:312. doi: 10.1186/s12885-016-2339-5
33. Pham QT, Oue N, Sekino Y, Yamamoto Y, Shigematsu Y, Sakamoto N, et al. TDO2 Overexpression Is Associated with Cancer Stem Cells and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 2018;95(5):297-308. doi: 10.1159/000490725.
34. Bai WX, Gao J, Qian C, Zhang XQ. A bioinformatics analysis of differentially expressed genes associated with liver cancer. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2017;25(6):435-439. doi: 10.3760/cma.j.issn



General appearance of ES/ PNET tumor cells (HE x 200). Immunohistochemical stainings in the same tumor: B) Ki67 proliferation index, C) Expression of CD99 (DABx 200) and D) Expression of Synaptophysin (DAB x 200).

Table 1. Demographic data of patients						
CASE	CASE NUMBER	AGE (year)	SEX	LOCATION	DIAGNOSIS	SURVIVAL
1	1A1	4	F	Iliac bone region	Ewing sarcoma	Not known

2	1A2	4	M	Abdomen	Undifferentiated malignant tumor	Not known
3	1A3	11	M	Thoracic wall	Ewing sarcoma	Not known
4	1A4	9	M	Pelvic region	Undifferentiated malignant tumor	Not known
5	1A5	8	M	Sacral region	Ewing sarcoma	Died
6	1A6	0	F	Liver	Undifferentiated malignant tumor	Not known
7	1A7	18	F	Not known	Ewing sarcoma	Alive
8	1A8	17	F	Not known	Ewing sarcoma	Died
9	1A9	13	M	Lung /pleura	Undifferentiated malignant tumor	Died
10	1A10	2,5	F	Pelvic region	Undifferentiated malignant tumor	Not known
11	1A11	10	F	Kidney	Undifferentiated malignant tumor	Not known
12	1A12	7	F	Thoracic wall	Ewing sarcoma	Not known
13	2A1	13	F	Abdomen	Ewing sarcoma	Not known
14	2A2	3	M	Kidney	Undifferentiated malignant tumor	Died
15	2A3	3	M	Kidney	Undifferentiated malignant tumor	Died
16	2A4	15	M	Shoulder	Ewing sarcoma	Alive
17	2A5	15	F	Lung / pleura	Ewing sarcoma	Died
18	2A6	14	F	Thoracic wall	Ewing sarcoma	Alive
19	2A7	5	M	Abdomen	Undifferentiated malignant tumor	Alive
20	2A8	7	F	Adrenal gland	Neuroblastoma	Alive
21	2A9	16	F	Abdomen	Neuroblastoma	Not known
22	2A10	2	M	Adrenal gland	Neuroblastoma	Alive
23	2A11	7	F	Adrenal gland	Neuroblastoma	Alive
24	2A12	5	F	Thoracic wall	Neuroblastoma	Alive

Table 2. Copy number altered genes among patients with ES/ PNET

SYMBOL	GENE NAME	LOCATION	1A1	1A3	1A5	1A7	1A8	1A12	2A1	2A4	2A5	2A6	Total
srGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase- activating protein 2	<u>1q32.1</u>	del	del	del	del	del	x	del	del	x	x	7/10
RGPD5	RANBP2-like and GRIP domain containing 5	<u>2q13</u>	del	del	x		del	del	del	del	del	x	7/10
NPHP1	nephrocystin 1	<u>2q13</u>	del	x	x	del	del	del	del	del	del	x	7/10

GTF2IRD2	GTF2I repeat domain containing 2	<u>7q11.23</u>	del	del	x	del	x	del	del	del	amp	x	7/10
PDXDC1	pyridoxal dependent decarboxylase domain containing 1	<u>16p13.11</u>	del	del	x	del	del	del	x	del	del	x	7/10
MALL	T cell differentiation protein like	<u>2q13</u>	del	del	del	del	del	x	del	x	x	x	6/10
ANKRD30A	Ankyrin repeat domain 30A	<u>10p11.21</u>	del	del	x	del	x	del	x	del	del	x	6/10
PTPN20	PTPN20 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20	<u>10q11.21</u>	del	del	del	x	del	x	x	del	del	x	6/10
USP22	ubiquitin specific peptidase 22	<u>17p11.2</u>	x	del	x	del	x	del	del	del	del	x	6/10

Table 3: Copy number changes among patients with NB.

SYMBOL	GENE NAME	LOCATION	2A8	2A9	2A10	2A11	2A12	Total
DEFB107A	Defensin beta 107A	<u>8p23.1</u>	del	del	del	del	del	5/5
MAGEA12	MAGE family member A12	<u>Xq28</u>	del	del	x	del	del	4/5
SPANXD	SPANX family member D	<u>Xq27.2</u>	del	x	del	del	del	4/5
SAGE1	sarcoma antigen 1	<u>Xq26.3</u>	del	del	del	del	x	4/5
DEFB106A	Defensin beta 106A	<u>8p23.1</u>	x	del	del	del	del	4/5
DEFB103B	Defensin beta 103B	<u>8p23.1</u>	del	del	del	x	del	4/5
RGPD5	RANBP2 like and GRIP domain containing 5	<u>2q13</u>	del	del	x	del	del	4/5

Table 4: Copy number changes among patients with undifferentiated malignant

tumor												
SYMBOL	GENE NAME	LOCATION	1A2	1A4	1A6	1A9	1A10	1A11	2A2	2A3	2A7	Total
ANKRD30B	ankyrin repeat domain 30B	<u>18p11.21</u>	del	X	X	del	del	del	del	x	x	5/9
SLC6A4	solute carrier family 6 member 4	<u>17q11.2</u>	del	del	x	x	del	del	del	x	x	5/9
PPIB	peptidylprolyl isomerase B	<u>15q22.31</u>	del	del	x	del	x	del	del	x	x	5/9
HERC2	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	<u>15q13.1</u>	del	del	x	del	del	del	x	x	x	5/9
TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase	<u>4q32.1</u>	amp	amp	x	del	del	del	x	x	x	5/9
IGSF21	immunoglobulin superfamily member 21	<u>1p36.13</u>	x	x	x	del	del	x	del	del	x	4/9
CAMK2B	calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta	<u>7p13</u>	x	x	x	del	del	x	del	del	x	4/9
POM121	POM121 transmembrane nucleoporin	<u>7q11.23</u>	del	x	x	del	del	del	x	x	x	4/9



HÜLYA TOSUN YILDIRIM

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	26332543558
Doğum Tarihi	01/01/1981
İletişim Adresi	Antalya Eğitim Hastanesi Patoloji Kliniği
Telefon	(543) 685 63 41
E-posta	drhulyatosun@gmail.com
Web Adresi	

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

H. TOSUN YILDIRIM, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, S. EKMEKÇİ & D. AYAZ, Tissue expression of AT-rich interacting domain 1 alpha in Wilms tumor. , . Int J Clin Exp Med , 2016, 1940-5901, 9, 6, 11633-11638.

H. TOSUN YILDIRIM, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, R. ORTAÇ, S. AKTAŞ & İ. KARACA, Retrospective Evaluation of Children with Congenital Pulmonary Airway Malformation: A Single Center Experience of 20 Years , fetal and Pediatr Pathol, 2016, 1551-3815, 35, 3, 143-148.

H. TOSUN YILDIRIM, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, Y. OYMAK, B. DEMİRAG, S. AKTAŞ & R. ORTAÇ, Caveolin-1 Expression is Associated with Tumor Size and Therapy Response in Wilms Tumor. , Türkiye Klinikleri, 2015, 1300-0292, 35, 1, 31-35.

H. TOSUN YILDIRIM, M. HOSGÖR & A. SENCAN, Late ureteral obstruction after endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with polyacrylate polyalcohol copolymer, UROLOGIA INTERNATIONALIS, 2014, 0042-1138, 84, 5, 1188-93.

H. TOSUN YILDIRIM & N. ŞEN TÜRK, alysis of IMP3 expression in prostate adenocarcinomas. , Turk Patoloji Dergisi., 2012, 1018-5615, 28, 2, 128-133.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

