



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEZENKİMAL TÜMÖRLERİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL  
OLARAK EPİTELYAL - MEZENKİMAL TRANSİZYON (EMT) VE  
MEZENKİMAL - EPİTEL TRANSİZYON (MET) AÇISINDAN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Altan KAVUNCUOĞLU**

**UZMANLIK TEZİ**  
olarak hazırlanmıştır.

**ANKARA**  
**2020**





T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEZENKİMAL TÜMÖRLERİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL  
OLARAK EPİTELYAL - MEZENKİMAL TRANSİZYON (EMT) VE  
MEZENKİMAL - EPİTEL TRANSİZYON (MET) AÇISINDAN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Altan KAVUNCUOĞLU**

**UZMANLIK TEZİ**  
olarak hazırlanmıştır.

**Danışman: Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU**

**ANKARA**  
**2020**

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 18471 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

Kemik-yumuşak doku patolojisine olan ilgimi artıran, asistanlığımın ilk zamanlarından beri beni bilimsel çalışma yapma konusunda yüreklendiren, ilgilendiğim bir alanda çalışmama aracı olan, patolojik yaklaşımda büyük katkıları olduğuna inandığım, ilk tez öğrencisi olduğum değerli hocam ve ağabeyim Doç. Dr. Kemal Kösemehmetoğlu'na,

Çalışmamızdaki büyük veri setine sistematik yaklaşmam ve bulguları yorumlamamdaki katkıları, pandemi döneminin bütün olumsuzluklarına karşın güzel iş birliği için Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Hanife Avcı'ya,

Oldukça büyük bir vaka grubuyla çalışmamıza rağmen motivasyonu ve fedakarlığı için, ilk defa tecrübe ettiğim konularla ilgili rahatça organize olmamızı sağladığı için Ziya Birinci'ye,

Pandemi koşullarında antikorlarımızın temini ve uygulanması aşamasındaki pozitifliği ve güzel iletişimi için Şefika Karabulut'a,

Rehberliğiyle uzun ve zorlu bir maraton olan asistanlık sürecini benim için daha keyifli ve kolay kılan başta Dr. Ece Özoğul olmak üzere kıdemlilerime ve yoldaşlık eden tüm diğer asistan arkadaşlarıma,

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda asistanlık sürecindeki inançlarını ve desteklerini hissettiren değerli hocalarıma,

Arşivdeki vakaların temini konusundaki destekleri için Lokman Kale'ye, kesitlerimizdeki katkısı için Rahime Çiçek'e,

Sevgilerini ve desteklerini yüreğimde hissettiğim, bana inandığım yolda yürümeyi öğreten değerli aileme,

İçtenlikle teşekkür ederim.

## ÖZET

**AMAÇ:** EMT/MET belirteçlerinin ve bu süreçlerle ilişkili olabilecek diğer immünohistokimyasal belirteçlerin mezenkimal tümörlerdeki ekspresyonunu ve bu tümörlerin biyolojik özellikleri üzerindeki belirleyiciliğini araştırmak.

**MATERYAL METOD:** Çalışmamıza mezenkimal tümör olguları (n=527) yanı sıra karsinom (n=28) ve malign melanom (n=18) kontrol grupları seçilmiştir. 3-4 mm çaplı doku dizilerinden elde edilen kesitler immünohistokimyasal olarak SLUG, TWIST1, E-kaderin, ZEB1, Beta-katenin, P-kaderin, TCF-15 (PARAXIS) ve ALDH1 ile immünohistokimyasal olarak Leica Autostainer ile boyandı. Olgular SLUG, TWIST1 ve E-kaderin boyanma özelliklerine göre MET<sup>high</sup>, MET<sup>low</sup> ve MET<sup>neg</sup> olarak gruplandırıldı. Dediferansiye liposarkomların (n=16) diferansiye-dediferansiye odakları ile nodal metastaz yapan sarkomların (n=7) primer-metastaz odakları da karşılaştırıldı.

**BULGULAR:** Mezenkimal tümörler MET profilleri bakımından %19 oranında MET<sup>high</sup>, %71,1 MET<sup>low</sup> ve %9,8 MET<sup>neg</sup> olarak sınıflanmıştır, epitelyal dönüşüm eğilimi hakim bulgudur. Mezenkimal tümörlerin %8,9'unda P-kaderin ekspresyonu hemen sadece sarkomlarda olarak görülmüştür. Olguların %33,5 inde ALDH1 ekspresyonu mevcuttur; sinir kılıfı tümörlerinde ekspresyonu daha belirgindir (%73,7). Beta-katenin ile nükleer boyanma seyrek (%4,4), membranöz boyanma %23,3 olarak saptanmıştır. TCF15 ekspresyonu %13,4 oranında görülmüştür. Dediferansiye liposarkomların diferansiye-dediferansiye odakları, nodal metastaz yapan sarkomların primer-metastaz odaklarında bu belirteçler bakımından fark bulunmamıştır (p>0,05). ALDH1, MPNST ve monofazik sinovyal sarkom ayırımında (%59,1'e karşın %9,5); E-kaderin, DSRCT ve Ewing sarkomu ayırımında (%75'e karşın %0) ayırıcı tanıda yardımcı olmaktadır.

**SONUÇ:** Mezenkimal tümörlerde MET eğilimi sık bir bulgudur. Dediferansiyasyonla veya nodal metastazla MET arasında direk ilişki saptanmamıştır. P-kaderin'in sadece sarkomlarda izlenmesi tümör progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. ALDH1 ve E-kaderin gibi belirteçler mezenkimal neoplazilerin ayırıcı tanısında kullanışlı olabilir.

## SUMMARY

**AIM:** To investigate immunohistochemical expression of EMT/MET and associated markers among mesenchymal tumors together with their potential influence on biological characteristics of these tumors.

**MATERIALS AND METHODS:** Mesenchymal tumor cases (n=527) and also carcinoma (n=28) and malignant melanoma (n=18) control groups were selected for our study. Sections from tissue microarrays of 3-4 mm diameter, were immunohistochemically stained with SLUG, TWIST1, E-cadherin, ZEB1, Beta-catenin, P-cadherin, TCF15 (PARAXIS) and ALDH1 by Leica Autostainer. Cases were grouped as MET<sup>high</sup>, MET<sup>low</sup> and MET<sup>neg</sup> according to their staining patterns with E-cadherin, SLUG and TWIST1. Differentiated and dedifferentiated foci of dedifferentiated liposarcomas (n=16), also primary and metastatic foci of sarcomas with nodal metasis (n=7) were compared.

**RESULTS:** Mesenchymal tumors were classified as MET<sup>high</sup> (%19), MET<sup>low</sup> (%71,1) and MET<sup>neg</sup> (%9,8), tendency towards epithelial transition was dominantly present. P-cadherin expression was found in %8,9 of mesenchymal tumors and was present nearly only in sarcomas. %33,5 of cases were positive with ALDH1 with prominent expression among nerve sheath tumors (%73,7). Nuclear staining with beta-catenin was rare (%4,4) and membranous staining was %23,3. TCF15 expression was found in %13,4 of cases. No significant difference was noted between the differentiated and dedifferentiated foci of dedifferentiated liposarcomas or primary and metastatic foci of sarcomas with nodal metastasis in terms of any markers (p>0,05). ALDH1 is helpful in distinction between MPNST and monophasic synovial sarcoma (%59,1 vs. %9,5); also DSRCT and Ewing's sarcoma (%75 vs. %0).

**CONCLUSIONS:** MET tendency is a frequent finding among mesenchymal tumors. Dedifferentiation or nodal metasis were unrelated to MET. Presence of P-cadherin only in sarcomas set us thinking on its potential role in tumor progression. Markers such as ALDH1 and E-cadherin could be useful in differential diagnoses of mesenchymal neoplasms.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Mezenkimal Tümörler ve EMT/MET	5
2.2. Mezenkimal Fenotipi Destekleyen Belirteçler	10
2.2.1. SLUG (SNAI2)	10
2.2.2. TWIST1	12
2.2.3. ZEB1	12
2.2.4. Diğer Mezenkimal Belirteçler	13
2.3. Epitelyal Fenotipi Destekleyen Belirteçler	14
2.3.1. E-kaderin	14
2.3.2. Epitelyal Fenotipi Destekleyen Diğer Belirteçler	15
2.4. TCF15 (PARAXIS)	16
2.5. P-kaderin	18
2.6. Beta-katenin	19
2.7. ALDH1	20
2.8. Genel Bilgiler Işığında Mezenkimal Tümörlerde Çalışmada İncelenen Belirteçler Açısından Olası Hipotezler	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. İncelenecek Dokuların Seçimi ve Doku Dizinlerinin (Tissue microarray-TMA) Dizinlerinin Oluşturulması	23
3.2. İmmünohistokimyasal Analiz	26
3.3. İstatistiksel Analiz	29
3.3.1. Tüm Mezenkimal Tümör Grubunun İstatistiksel Analizleri	29

3.3.2. Bağımlı Örneklemelerin (lenf nodu metastazı yapan sarkomlar ile dediferansiye liposarkomların diferansiye ve dediferansiye alanları) İstatistiksel Analizleri	31
4. BULGULAR	32
4.1. Karsinomlarda EMT Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerin Ekspresyonu	35
4.2. Malign Melanomlarda EMT Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerin Ekspresyonu	37
4.3. Mezenkimal Tümörlerde EMT Belirteçlerinin Ekspresyonu	38
4.3.1. SLUG	38
4.3.2. TWIST1	40
4.3.3. ZEB1	42
4.3.4. E-kaderin	43
4.3.5. Mezenkimal Tümörler ve MET profilleri	44
4.4. Mezenkimal Tümörler ve Beta-Katenin	47
4.4.1. Nükleer Beta-katenin Ekspresyonu	47
4.4.2. Membranöz Beta-katenin Ekspresyonu	48
4.5. Mezenkimal Tümörler ve TCF15 (PARAXIS)	49
4.6. Mezenkimal Tümörler ve ALDH1	50
4.7. Mezenkimal Tümörler ve P-kaderin	52
4.8. Lenf Nodu Metastazı Yapan Sarkomlarda Primer ve Metastaz Odaklarının EMT/MET Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerle Ekspresyonu	54
4.9. Dediferansiye Liposarkomlarda Diferansiye ve Dediferansiye Odakların EMT/MET Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerle Ekspresyonu	56
4.10. İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Kendi Aralarındaki İlişkilerinin Değerlendirilmesi	57
5. TARTIŞMA	59
5.1. MET Belirteçlerinin İmmünohistokimyasal Ekspresyonları İle Mezenkimal Tümörlerin Biyolojik Davranışı Arasında Nasıl Bir İlişki Mevcuttur?	60
5.2. Mezenkimal Tümörlerdeki Dediferansiyasyonla MET Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasında Bir İlişki Mevcut Mudur?	67



5.3. Lenf Nodu Metastazı Yapan Sarkomlarla Karsinomlar Arasında MET Belirteçleri Bakımından Bir İlgisi Mevcut Mudur?	69
5.4. Mezenkimal Tümörlerde İmmünohistokimyasal TCF15 (PARAXIS) Ekspresyonu	74
5.5. Mezenkimal Tümörlerde İmmünohistokimyasal P-kaderin Ekspresyonu	76
5.6. Mezenkimal Tümörlerde İmmünohistokimyasal ALDH1 Ekspresyonu	77
5.7. Beta-Katenin İle İmmünohistokimyasal Olarak Membranöz Boyanmaların MET Açısından Anlamı Var Mıdır, Varsa Nedir?	80
5.8. Mezenkimal Tümörlerde Nükleer Beta-Katenin	82
5.9. MET Belirteçleri Ve Çalışmada Kullanılan Diğer Belirteçler Patoloji Pratiğinde Tanısal Araçlar Olarak Kullanılabilir Mi?	83
6. KAYNAKLAR	88

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>EMT</b>	: Epitelyal – Mezenkimal Transizyon
<b>MET</b>	: Mezenkimal – Epitelyal Transizyon
<b>EMP</b>	: Epitelyal – mezenkimal plastisite
<b>MiRNA</b>	: Mikro-RNA
<b>EMT-TF</b>	: EMT transkripsiyon faktörü
<b>bHLH</b>	: Bazik heliks-loop-heliks
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinaz
<b>DFSP</b>	: Dermatofibrosarkoma protuberans
<b>SFT</b>	: Soliter fibröz tümör
<b>MPNST</b>	: Malign periferik sinir kılıfı tümörü
<b>DSRCT</b>	: Desmoplastic small round cell tumor / Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b>	Epitelyal-mezenkimal plastisite	7
<b>Şekil 2.</b>	Epitelyal-benzeri, metastaz yapabilen ve mezenkimal- benzeri tümörlerin ayırıcı özellikleri	10
<b>Şekil 3.</b>	Embryoda anterior-posterior eksen boyunca epitelyal somit ve matür somit oluşumunun şematik görünümü	17
<b>Şekil 4.</b>	Karsinom ve mezenkimal tümör olgularında P-kaderin ekspresyonu	35
<b>Şekil 5.</b>	Karsinom ve mezenkimal tümör olgularında membranöz Beta-katenin ekspresyonu	36
<b>Şekil 6:</b>	Malign melanom ve mezenkimal tümör olgularında membranöz Beta-katenin ekspresyonu	37
<b>Şekil 7.</b>	Mezenkimal tümör olgularında SLUG (SNAI2) ekspresyonu	39
<b>Şekil 8.</b>	Mezenkimal tümör olgularında TWIST1 ekspresyonu	41
<b>Şekil 9.</b>	Mezenkimal tümör olgularında ZEB1 ekspresyonu	42
<b>Şekil 10.</b>	Mezenkimal tümör olgularında E-kaderin ekspresyonu	44
<b>Şekil 11.</b>	Mezenkimal tümör olgularında nükleer Beta-katenin ekspresyonu	48
<b>Şekil 12.</b>	Mezenkimal tümör olgularında membranöz Beta-katenin ekspresyonu	49
<b>Şekil 13.</b>	Mezenkimal tümör olgularında TCF15 (PARAXIS) ekspresyonu	50
<b>Şekil 14.</b>	Mezenkimal tümör olgularında ALDH1 ekspresyonu	52
<b>Şekil 15.</b>	Mezenkimal tümör olgularında P-kaderin ekspresyonu	53
<b>Şekil 16.</b>	Plastisiteye bağımlı ve plastisiteden bağımsız metastaz yolları	73

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Lenf nodu metastazı yapan sarkom olguları ve histolojik tanıları	24
<b>Tablo 2.</b>	Çalışma için seçilen mezenkimal tümörler ve vaka sayıları	25
<b>Tablo 3.</b>	Kullanılan Antikorlar, İmmünohistokimyasal Analizler İçin Tetkik Koşulları ve Ön Denemede Referans Alınan Kontrol Dokular	27
<b>Tablo 4.</b>	İmmünohistokimyasal Çalışmaların Değerlendirme Şeması	28
<b>Tablo 5.</b>	Tüm mezenkimal tümörlerde, karsinomlarda ve malign melanomlarda EMT/MET belirteçleri ile MET profillerinin ekspresyon prevalansları	33
<b>Tablo 6.</b>	Tüm mezenkimal tümörlerin diğer belirteçlerle ekspresyon oranları	46
<b>Tablo 7.</b>	Mezenkimal Tümörlerde Nükleer Beta-Katenin Ekspresyonu	47
<b>Tablo 8.</b>	Mezenkimal Tümörlerde P-kaderin Ekspresyonu	53
<b>Tablo 9.</b>	Lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda EMT/MET belirteçleri ve diğer belirteçlerle ekspresyon yaygınlıklarının primer ve metastaz odaklarında karşılaştırılması	55
<b>Tablo 10.</b>	Lenf nodu metastazı yapan sarkomlarında primer ve metastaz odaklarının MET profilleri açısından karşılaştırılması	56
<b>Tablo 11.</b>	Dediferansiye liposarkomlarda diferansiye ve dediferansiye odakların MET profilleri ve immünohistokimyasal ekspresyon statüleri açısından karşılaştırılması	57

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yumuşak doku tümörleri patolojinin en renkli tümör gruplarından birini oluşturmaktadır. Bu tümörler 2020 itibariyle Dünya Sağlık Örgütü'nün güncel sınıflamasında 100'den fazla ana antiteye ayrılmaktadır ve bu çeşitliliğin yeni moleküler tekniklerden faydalanan çalışmalarla birlikte daha da artacağına kesin gözüyle bakılmaktadır. Yumuşak doku tümörlerindeki bu morfolojik renklilik güncel patoloji pratiğinde bu tümörlerin tanısında güçlü bir araç haline gelmektedir. Bu nedenle de kullanılan yardımcı tekniklerin tanısız süreçteki önemleri büyüktür. Bugün itibariyle immünohistokimya ve moleküler yardımcı teknikler bu tümörlerin tanısında ve tiplendirilmesinde vazgeçilmez hale geldikleri gibi patogenezinin aydınlatılmasında da önemli roller oynamıştır.

Yumuşak doku tümörlerinin ana başlıklara ayrılmasında bu tümörlerin farklılaştıkları hücre tipi belirleyicidir, çünkü bu tümörlerin ortak hücre kökeninin mezenkimal kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Karsinomlardaki çok aşamalı karsinogenez modellerinin aksine mezenkimal tümörlerde bu kök hücrelerin nasıl bir yeniden programlanmadan geçtikleri ve biyolojik davranış çeşitlilikleri ile ilgili olarak cevabı aydınlatılamamış hâlâ çok fazla soru vardır. Ancak tıpkı karsinomlarda olduğu gibi, hücresel plastisite; hem invazyon hem de kohezyon gösterebilen bu tümörlerin patogenezinde ve morfolojik renkliliklerinde potansiyel öneme sahiptir.

Literatürde çeşitli sarkomlarda EMT belirteçlerinin patogeneze ve klinik parametrelerde (sağ kalım, metastaz riski gibi) etkileri olup olmadığını inceleyen çalışmalar mevcuttur<sup>1,2</sup>. Ancak söz konusu çalışmalar genellikle tümörleri bireysel olarak ele almaktadır ve genel tabloda boşluklar bulunmaktadır. "Hangi mezenkimal tümörlerde hücresel plastisite neoplastik sürecin tetikleyicisi, ilerleticisi ve olmazsa olmazıdır?" ya da "Farklı mezenkimal tümör tiplerinde EMT süreçlerinden faydalanış açısından farklılıklar mevcut mudur?" gibi soruların cevabı yeterince aydınlatılmamıştır. Bu hususta immünohistokimyadan blotlamaya çeşitli ekspresyon analiz yöntemlerinin önemi ortaya çıkmaktadır.

EMT alanındaki önemli araştırmacılarından Brabletz, EMT transkripsiyon faktörleri (EMT-TF) aracılığıyla metastaza progresyonun iki uç varyantını şu şekilde özetlemektedir: Diferansiye kanserler transkripsiyon faktörlerini metastaz yapacakları zaman geçici olarak aktive eder, metastaz yaptıktan sonra da rediferansiye olmak ve büyüyebilmek için “downregüle” ederler. Bu tümörlerde primer odak ve metastaz odaklarında EMT-TF ekspresyonları çoğunlukla düşük düzeydedir. Andiferansiye yüksek dereceli kanserler ise biriken genetik değişiklikler neticesinde farklılaşma anlamında geri dönüşü olmayan bir yola girmişlerdir. Genellikle agresif seyirli olan ve terapiye direnç gösteren bu grup tümörlerde EMT-TF ekspresyonu sıklıkla yüksek düzeydedir. Büyük olasılıkla bu iki ekstrem varyantın bir karışımının (biri ya da diğeri baskın olacak şekilde) sık görülen kanser tiplerinde mevcut olduğu belirtilmektedir <sup>3</sup>. Kanserde EMT'yi irdeleyen yayınların büyük oranda karsinomları ele alması ve tecrübenin bu alanda daha fazla olması nedeniyle sarkomlarda EMT hipotezlerini kurarken karsinomlardaki birikimi sarkomlara tercüme etme gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Tarif edilen EMT belirteç ekspresyonundaki heterojenitenin başta sarkomlar olmak üzere bir biyolojik davranış spektrumu içinde bulunan tüm mezenkimal tümörler için aslında geçerli olduğu düşünülebilir. Bu tez çalışmasında; immünhistokimyanın, tümör hücrelerinde ekspresyonun yaygınlığını ve dağılımını belirginleştirme özelliğinden faydalanılarak, geniş bir mezenkimal tümör grubunda (benign, borderline veya malign davranışlı), sınırlı bir karsinom kontrol ve malign melanom vaka grubunda EMT/MET ilişkili transkripsiyon faktörlerini ve diğer belirteçleri değerlendirmek, ayırıcı yönlerini tartışmak hedeflenmiştir. Bu değerlendirme sadece patogeneze için değil patoloji pratiğinde bu belirteçlerin tanısai araçlar olarak kullanılması açısından da önem arz etmektedir. Ayrıca iyi diferansiye ve dediferansiye alanlar içeren bir tümör tipi olarak dediferansiye liposarkom vakalarında EMT belirteçleri açısından tümör içi heterojenite, karsinom davranışını taklit edencesine lenf nodu metastazı yapan sarkomların EMT perspektifinden karsinomlarla benzerliği de bu çalışmanın diğer konularıdır.

Beta-katenin ile ilgili çalışmalar bir kenarda tutulursa literatürde EMT belirteçlerinin / EMT ilişkili belirteçlerin mezenkimal tümörlerdeki immünohistokimyasal ekspresyonuna yönelik çalışmalar geniş serileri kapsamamaktadır. Mevcut çalışmalarda immünohistokimyanın, sıklıkla bir ya da birkaç sarkom alt tipinden elde edilen moleküler verileri ve/veya bu tiplerle yapılan hücre çalışmalarının bulgularını teyit etme ya da test etme amaçlı kullanıldığını söylemek mümkündür. Buna karşılık konuya histopatoloji perspektifinden yaklaşan yayınlar ise nispeten azdır <sup>4</sup>.

Bu çalışmadan elde edilen anlamlı sonuçlar şu gelecek hedeflerini doğurabilir:

- Özellikle çalışmaya sınırlı sayıda dahil edilen veya dahil edilemeyen mezenkimal tümörler için, bu tümörlerin tüm morfolojik spektrumu da göz önünde bulundurularak, daha geniş seriler ile ilgili antikör(lar) yönünden yeniden karşılaştırmalı immünohistokimyasal çalışma yapmak
- EMT'nin tümörlerde parsiyel olarak bulunabileceği bilgisiyle tümörlerin farklı alanlarından multipl örneklerle veri setini daha da zenginleştirerek incelemek
- Biyolojik davranış açısından kritik bulguların elde edildiği tüm olgularda klinik parametreleri de analize dahil ederek çalışma kapsamını genişletmek
- Özgün ekspresyon statülerine rastlanan histolojik alt tiplerde bulguları ilgili gen bölgelerindeki mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlar açısından moleküler çalışmalarla yeniden ele almak, dolayısıyla moleküler araçların da olası tanısal önemlerini tartışmaya açmak
- Tez kapsamı dışında kalan sinyal yolağı değişiklikleri açısından kantitatif ya da yine immünohistokimyasal yöntemlerle, moleküler analizlerle patogeneze rol oynayabilecek diğer etmenlerin analizini yapmak

- Hücresel/dinamik fonksiyonel analizlerle mevcut bulguların terapötik direnç, apoptoz direnci, metabolik adaptasyon vb. tümör davranışını belirleyen özellikler ile korelasyonuna bakmak

2020 yılında Yang ve ark. tarafından yayımlanan ve EMT araştırmalarında rehber olması hedeflenen makalede EMT'nin son derece karmaşık ve her mekanizması net aydınlatılmamış bir hücresel programlanma olduğu tekrar vurgulanmaktadır. Bu alanda sağlıklı sonuçların elde edilebilmesi için ölçümsel analizlerin muhakkak hücresel ve fonksiyonel analizlerle bir arada yapılması önerilmektedir <sup>5</sup>.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mezenkimal Tümörler ve EMT/MET

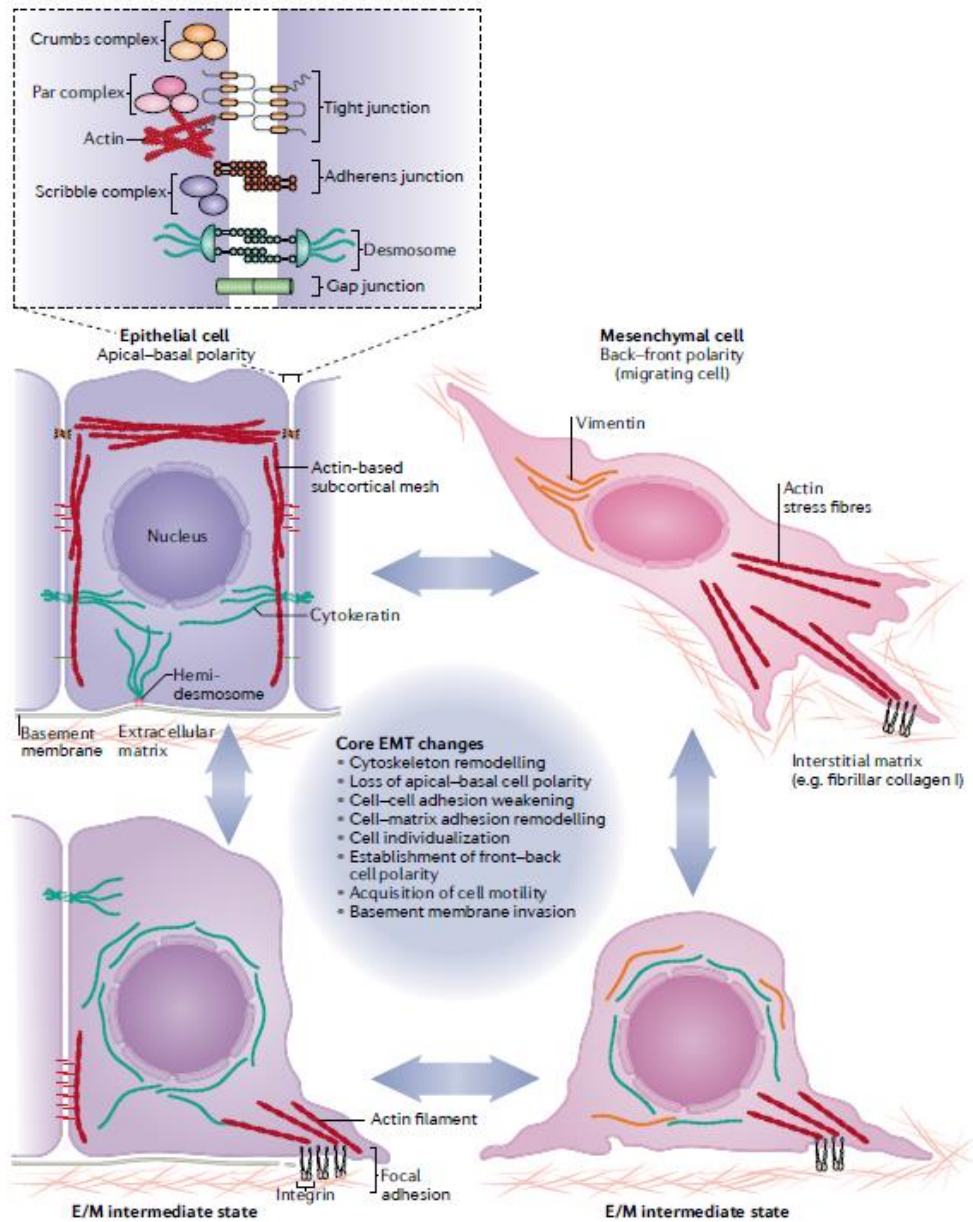
Epitelyal özellikteki hücrelerin mezenkimal fenotip kazanması *epitelyal-mezenkimal transizyon* (EMT), mezenkimal nitelikte hücrelerin epitelyal fenotip kazanması ise *mezenkimal-epitelyal transizyon* (MET) olarak isimlendirilmektedir. Hücrelerdeki bu geçişkenlik *hücreSEL plastisite* olarak adlandırılmaktadır. HücreSEL plastisite, hastalıkların patogeneğinde hücrelerdeki çeşitli proteinlerin değişken ekspresyonları ve bunlara eşlik eden ultrastrüktürel değişiklikler ile ilintilidir. İnsan vücudunda embriyolojik hayatta da önemli rolleri olan bu fenomenlerin kavramsal temelleri ilk olarak 1980'li yıllardaki embriyogenez çalışmalarıyla atılmıştır. Amerikalı gelişimsel biyolog Betty Hay ve ark.'nın hem embryonik hem matür iyi farklılaşmış epitelyal hücrelerle gerçekleştirdikleri hücre kültürü çalışmalarında; bu hücrelerin üç boyutlu kollajen jel üzerinde; mezenkimal hücrelerden ayırt edilemeyecek nitelikte olan, apikal bazal polaritesi kaybolmuş, migratuar kapasiteye sahip hücrelere in vivo olarak dönüşebilecekleri gösterilmiştir. <sup>6</sup> Takip eden yıllarda bunu EMT/MET ile ilgili embriyolojik çalışmalar ve keşifler yanı sıra neoplazi - hücreSEL plastisite ilişkisini derinleştiren araştırmalar takip etmiştir. HücreSEL plastisitenin bugün itibariyle kanser ve hücre çalışmaları için favori sahalardan biri haline geldiği ve bu konulardaki yayınların logaritmik bir şekilde arttığı söylenebilir.

Tümör ve EMT ilişkisini açmadan önce güncel literatürde “epitelyal hücre” ve “mezenkimal hücre”nin nasıl tanımlandığına kısaca değinmekte fayda var. *Epitelyal hücre* kavramı bir bazal membran üzerinde yerleşimli, apikal-bazal polarite gösteren, sıkı (“tight-junction”) ya da tutturucu (“adherens junction” ve “desmozomal bağlantı”) hücre-hücre bağlantıları aracılığıyla birbirlerine bağlanan, hemidesmozomlardaki integrinler aracılığıyla da oturdukları bazal membrana demirlenen hücreleri tanımlamaktadır. Epitelyal hücrelerde adherens bileşkeler kortikal aktin iskeletleri, desmozomal bağlantılar ise sitoplazmik intermedier filamanlar arasında köprü kurmaktadır. Mezenkimal hücreler ise epitelyal hücrelerin sahip olduğu bu fonksiyonel

bağlantılardan yoksun, ekstraselüler matrikse integrinlerle sadece fokal adezyon sergileyen, aktin stres lifleri sayesinde apikal-bazal yerine ön-arka polarite gösteren migratuar doğadaki hücreleri tanımlamaktadır. EMT'yi ne derecede geçirdiğine bağlı olarak bu iki fenotipten birine ya da diğerine daha yakın hibrit formlar ortaya çıkabilmektedir ve bu formlar arasında geri döndürülebilir, akışkan geçişler söz konusudur ("epitelyal-mezenkimal plastisite/EMP").<sup>5</sup> (Şekil 1)

Klasik anlamıyla EMT'nin gerçekleşebilmesi için EMT geçiren hücrenin başlangıçta epitelyal doğada olması beklenmektedir. Karsinomlarda süreç bu şekilde ilerlemektedir. Öncelikle bir bazal membran üzerinde oturan epitelyal hücreler tümörün primer odağında hücre-hücre bağlantılarındaki kohezyon moleküllerini kaybederek mezenkimal fenotipteki hücrelere dönüşmekte, invazyon ve migrasyon kapasitesi kazanmaktadır. Dolaşım yoluyla uzak bölgeye göç ettiklerinde ise tersine süreç ile epitelyal özelliklerini geri kazanarak koloni oluşturabilir hale geçmektedir (MET). Mezenkimal tümörlerde ise süreci aynı sekansla açıklamak mümkün görünmemektedir, çünkü bu tümörlerde neoplastik hücreler epitelyal kanserlerden farklı olarak *en başından itibaren* mezenkimal özelliktedir.

Bu sorun mezenkimal tümörlerde EMT ve MET'in mezenkimal tümör biyolojisinde ne derecede rol sahibi olduğu sorusunu beraberinde getirmektedir. Mezenkimal tümörlerin yukarıda tariflenen klasik EMT basamaklarıyla progresyon göstermedikleri aşikardır. 2018 yılında EMT konusunda deneyimli araştırmacı hekimlerden Thomas Brabletz ve ark.'nın derleme makalesinde<sup>3</sup> klasik EMT basamaklarını geçirmeseler bile non-epitelyal tümörlerin de epitelyal tümörler gibi EMT transkripsiyon faktörleri üzerinden düzenlenen hücresel programlardan faydalanabildikleri, bunların yardımıyla neoplastik süreci başlattıkları ve/veya ilerlettikleri belirtilmiştir.



**Şekil 1.** <sup>5</sup> Epitelyal-mezenkimal plastisite. Hücrelerin epitel – mezenkim aksında bulunabilecekleri farklı fenotipler resmedilmiştir.

EMT ve MET; ortak transkripsiyon faktörleri üzerinden düzenlenen, reverzibl hücresel programlardır. Ancak hem EMT hem de MET kendi başlarına özgün biçimde de düzenlenebilmektedir ve bu düzenlenimde mikro-RNA'lar (miRNA) önemli bir paya sahiptir.<sup>7,8</sup> EMT düzenleyici sinyal yolları eş zamanlı olarak birçok transkripsiyon faktörünü bir arada etkileyebilmektedir. Transkripsiyon faktörleri kendi aralarında etkileşebilmektedir. Transkripsiyon

faktörlerinin bireysel akış aşağı etkilerinin birer sonucu olarak epitelyal belirteç ekspresyonundaki değişiklikler mezenkimal belirteç ekspresyonunda ters yöndeki değişikliklerle sıklıkla bir arada olmaktadır. Özetle EMT hücre içerisinde birçok faktörün devrede olduğu karmaşık bir hücreyel “program”dır.

Mezenkimden köken alan tümörler olan kemik ve yumuşak doku tümörlerinde EMT'ye kıyasla MET'in önemine daha fazla vurgu yapılmaktadır. MET'in mezenkimal tümörlerde histopatolojik alt tiplerle ilişkisini bildiğimiz örnekler de mevcuttur. Bunun en iyi bilineni sinovyal sarkomdur. Saito ve ark.'nın önce 2006 yılında yayınladıkları, sonra da 2013 yılında revize ettikleri çalışmalarında bu tümörün patogenezinde EMT transkripsiyon faktörleri olan SNAIL ve SLUG'ın rollerini araştırmışlar; SYT-SSX gen füzyonu, EMT-TF'ler ve monofazik-bifazik morfoloji arasında ilgi kurmuşlardır.<sup>9</sup>

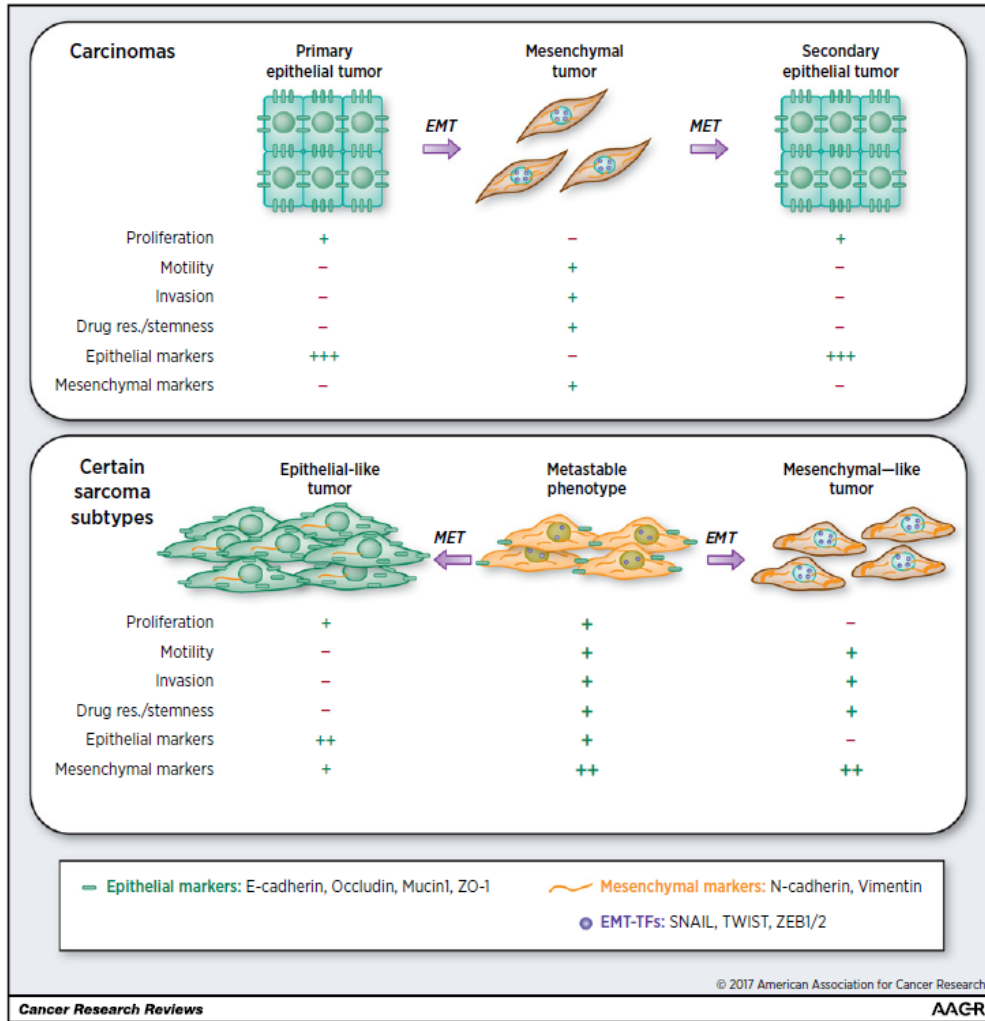
Embryogenezdeki EMT/MET süreçleriyle epitelyal ve non-epitelyal tümörlerdeki patolojik EMT/MET arasında da kesişmeler olduğu görülmektedir. Kanseri ilişkili EMT'de görev alan transkripsiyon faktörleri ile embriyolojik EMT'de rol alan transkripsiyon faktörleri aynıdır. Embryonik gelişim sırasında hücre farklılaşması, migrasyonu gibi çok çeşitli alanlarda rolü olan kanonik Wnt sinyal yolağı, neoplazi ilişkili EMT'nin de temel sinyal yollarından bir tanesidir. Progenitör hücrelerin sağlıklı işlevsel yönlendirmeleri için bu yolağın ne aşırı aktif ne de hipoaktif olması gerekmektedir, dolayısıyla yolağın normal embriyonal gelişimde sıkı bir düzenlenmeye tabiidir. Buna karşılık Ewing sarkomlarında EWSR gen füzyon ürünlerinin bu yolağın disregülasyonuna yol açabildiği bildirilmiştir.<sup>10</sup> Bir diğer örnek bir embriyonal mezenkimal tümörü olan Wilm's tümörüdür. Normal böbrek gelişiminde metanefrik mezenkimden tübül epiteline dönüşüm, yani fonksiyonel nefronların oluşumu sırasında MET gerçekleşmektedir. Wilm's tümöründe blastemal bileşenin de bu MET basamaklarından faydalandığı ancak diferansiyasyon bloğuna takıldığı, yine de MET ilişkili birçok genin bu hücrelerde aşırı ekspresyonu olduğu ve bu genlerin parsiyel de olsa epitelyal farklılaşmayı sağlayabildiği gösterilmiştir. Bu yönüyle bu tümörün embriyonal hayatta normal şartlarda tübül gelişimi sırasında gözlenen nefrogenez MET'ile ilgisi olduğu görülmektedir.<sup>11</sup> Bu örnekler de bize mezenkimal

tümörlerde embriyolojik hayattakine benzeyen ama onlardan ayrılan yönleri bulunan hücresel yeniden programlanmaların görülebileceğine işaret etmektedir.

EMT indüklenmesinin tümör hücrelerindeki etkileri arasında migrasyon ve invazyon dışında kanser kök hücresi üretimi, anoikis direnci, immünsupresyon, anjiogenezin indüklenmesi, DNA tamirinde artım ve kemoterapötik ilaç atılımında artım yer almaktadır.<sup>12</sup> Ayrıca karsinomların metastaz odaklarına gerçekleşen MET'in de proliferasyon yollarının aktivasyonu, anoikis direnci ve sitotoksik ajanlara dirence de etkidiği bildirilmiştir.<sup>13</sup> Karsinom verilerinden elde edilen bu temel bilgileri mezenkimal tümörlere de tercüme etmek mümkün olabilir.

EMT/MET bir tümörde hem geçici olarak izlenebilir, tümör kitlesinin bir kısmını ilgilendirebilir. Sannino ve ark. tümör hücrelerindeki bu gelgitlerin kavramsal olarak üç ayrı hücresel fenotipi meydana getirdiğini ve bu şemanın birtakım sarkomlar için geçerli olabileceğini öne sürmüşlerdir.<sup>14</sup> Bunlar “epitel-benzeri” fenotip, “mezenkim benzeri” fenotip ve “metastaz potansiyelli” fenotiptir. *Epitel benzeri fenotipe* sahip hücreler durağan, invazyon yapmayan, proliferatif kapasitesi yüksek, kök hücre karakteri/ilaç direnci göstermeyen, mezenkimal belirteçlere kıyasla belirgin epitelyal belirteç ekspresyonu gösteren hücrelerdir. *Mezenkim benzeri fenotipe* sahip hücreler hareket yeteneğine (motiliteye) sahip, invaziv, mikroçevre hasarına duyarlı, proliferatif kapasitesi düşük, kök hücre karakteri/ilaç direnci sergileyen, epitelyal belirteçlerle negatif ve belirgin mezenkimal belirteç ekspresyonu gösteren hücrelerdir. Bir de bu iki grup arasında yer alan hibrit formlar bulunmaktadır ve bu grup “*metastaz potansiyelli fenotip*” olarak bildirilmiştir. Metastaz potansiyelli fenotipe sahip hücreler hem proliferasyon yeteneğine sahiptir hem de hareket yeteneği, invaziv karakter, kök hücre özellikleri ve ilaç direncine sahiptir. Bu fenotipteki hücrelerde mezenkimal belirteçlerin epitelyal belirteçlere kıyasla daha fazla ifade edildiği ancak epitelyal belirteç ekspresyonunun mutlaka bulunduğu öne sürülmektedir. Metastaz yapabilen fenotip birbirine bağlı hücre gruplarının oluşmasına, kolektif hücre migrasyonuna, hücrelerin apoptozdan korunmasına ve mikroçevreye karşı dayanıklılığa olanak sağlamaktadır. Bu

şema, bu çalışmada kullanılan immünohistokimyasal sınıflamalar için temel oluşturmaktadır. (Şekil 2)



**Şekil 2.** Sannino ve ark.'nın belli sarkom tipleri için geçerli olabileceğini önerdikleri epitelyal-benzeri, metastaz yapabilen ve mezenkimal-benzeri tümörlerin ayırıcı özellikleri.<sup>14</sup>

## 2.2. Mezenkimal Fenotipi Destekleyen Belirteçler

### 2.2.1. SLUG (SNAI2)

İsmi ilk olarak tanımlandıkları Drosophilalardaki salyangoz benzeri proteinlerle benzerliğinden alan SNAIL ailesine ait bir EMT-transkripsiyon faktörüdür. “Zinc-finger” yapısındadır. Mezenkimal dönüşüm etkisini N-kaderin, fibronektin, vitronektin ve matriks metalloproteinazların ifadesinde

artıma ek olarak ZEB1, ZEB2 ve Twist gibi diğer EMT-TF'leri arttırarak yapmaktadır. Ayrıca E-kaderin promoter bölgeleri olan E-box'lar üzerinde zayıf da olsa bir represif etkisi olduğu bildirilmektedir. <sup>15</sup> SLUG'ın E-kaderin'in subselüler lokalizasyonunu (dağılımını) etkilediği belirtilmektedir. Ayrıca desmozomal bağlantıları da azaltmaktadır. <sup>16</sup> Bu ailede yer alan SNAIL (SNAI1) de potent bir EMT-TF'tir. Tıpkı SNAIL gibi TGF-beta, Wnt ve NOTCH sinyal akışlarının hepsinde hedef molekül olabilmekte, epitelyal belirteçlerin ekspresyonunu baskılayabilmektedir.

SLUG'ın normalde matür mezenkimal hücreler dahil olmak üzere birçok erişkin hücrelerinde immünohistokimyasal ekspresyonu görülmektedir. Farelerde meme epitel hücrelerinde SLUG'ın susturulması meme bezlerinin yenilenmesinde bozulmaya yol açmaktadır. Dolayısıyla SLUG kök hücre programları ile de ilişkili bir belirteçtir. <sup>3</sup>

Literatürdeki yayınlarda SLUG'ın mezenkimal tümörlerdeki ekspresyonunun sık olduğu belirtilmektedir. <sup>4,17</sup> Bu hususta Sato ve ark.'nın çalışmalarından ve sinovyal sarkom patogenezinde SLUG'ın rolünden bahsetmek gerekir. SYT-SSX gen füzyonu sinovyal sarkom gelişiminin tetikleyicisi olup bu tümör için imza niteliğindedir. SYT'nin partner geni SSX1 olduğunda daha çok monofazik, SSX2 olduğunda ise daha çok bifazik sinovyal sarkom geliştiği görülmüştür. SYT-SSX1 füzyon ürünleri SNAIL üzerinde, SYT-SSX2 füzyon ürünleri ise SLUG üzerinde represör etkisini göstermektedir. SLUG'ın SNAIL'e kıyasla E-kaderin ekspresyonunda daha zayıf baskılayıcı etki göstermesi neticesinde, SYT-SSX2 füzyonu görülen sinovyal sarkomlarda glandüler farklılaşmanın daha az baskılanması ve daha efektif bir MET'in gerçekleşebilmesi nedeniyle tümörün bifazik morfoloji kazandığı öne sürülmüştür. Wnt sinyal yolağı üzerindeki dolaylı etkiler, ekstraselüler matriksin yeniden modellenmesi, disfonksiyonel E-kaderin sentezi gibi fenotip belirleyici diğer etmenler de patogeneze akış şemasına yıllar içinde dahil edilmiştir. <sup>15</sup>

Leiomyosarkomlarda SLUG knockdown'u tümör hücrelerinin proliferatif kapasitesini, migrasyon ve invazyon yeteneğini baskılamaktadır <sup>1</sup>.

### 2.2.2. TWIST1

EMT'yi uyaran bir bazik heliks-loop-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörüdür. Diğer tüm bHLH transkripsiyon faktörleri gibi dimerleşerek promoter ya da enhancer bölgelerdeki kısa DNA sekanslarına (DNA yanıt elemanlarına, ör. E-kaderin'e ait) bağlanarak etki göstermektedir. Etkisini N-kaderin gibi yapısal proteinler yanı sıra Vitronektin, Fibronektin, SPARC ve Integrin  $\alpha V$  gibi hücre – ekstraselüler matriks bağlantısını sağlayan moleküllerin ekspresyonunu artırarak da göstermektedir. Ayrıca Claudin ve Occludin gibi “tight junction” proteinleri ile E-kaderin üzerinde represör etkisi mevcuttur. TGF-beta, Wnt ve ekstraselüler matriks/integrin sinyal akışlarında hedef molekül olabilmektedir.

Twist1'in erişkinde matür mezenkimal hücrelerdeki ekspresyonu tespit edilebilir düzeyde değildir ancak mezenkimal kök hücrelerde ekspresyonunun olduğu belirtilmiştir. <sup>18</sup> SNAI1/2'ye benzer şekilde kanser hücrelerinin hayatta kalmasında (bu etkisini apoptozu azaltarak göstermektedir), kanser kök hücre üretiminde ve ilaç direncinde rolü mevcuttur. Hücrelerde invazyon ayakçıklarının oluşmasında, vaskülogenezde ve intravazasyonda da etkili olduğu görülmektedir. <sup>19,20</sup>

TWIST1'in Ewing sarkomlarında metastaz potansiyelini arttırdığı bildirilmiştir. <sup>21</sup> Sinovyal sarkom hücrelerinde TWIST knockdown'u azalmış migrasyon ve invaziv kapasite ile ilişkili bulunmuştur <sup>22</sup>.

### 2.2.3. ZEB1

“Zinc-finger E-box binding homeobox protein 1”, diğer adıyla ZEB1, mezenkimal dönüşümü uyaran bHLH yapısında önemli bir EMT-TF'tir. ZEB1 ve aynı ailede yer alan ZEB2 etkilerini kaderin ve ZO-1 ekspresyonunu baskılama yanı sıra Vitronektin, N-kaderin ve matriks metalloproteinazların (MMP) ekspresyonunu artırarak yapmaktadır.

ZEB1 mezenkimal hücrelerde immünohistokimyasal olarak sıklıkla ekspresedir. ZEB1'in osteosarkomlardaki downregülasyonu apoptoz, hücre proliferasyonunun ve invazyonun baskılanması ile ilişkilendirilmiştir. <sup>23</sup>



ZEB1 ekspresyonu normal kemiğe kıyasla osteosarkomlarda, metastatik osteosarkomlarda ise non-metastatiklere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. <sup>24</sup>

#### 2.2.4. Diğer Mezenkimal Belirteçler

*SNAIL (SNAI1)*, SLUG ile aynı ailede (SNAI) yer alan ve E-kaderin'in baskılanması başta olmak üzere mezenkimal dönüşümü uyarıcı etkileri olan önemli bir EMT-TF'tir. SNAIL ekspresyonu yüksek olan sarkomlarda sağ kalımın azaldığı öne sürülmüştür. Özellikle yüksek dereceli sarkomlarda ve tümörlerin invazyon sınırlarında SNAIL ekspresyonu kuvvetli olduğu, lokal agresif mezenkimal tümörlerde ekspresyonunun seyrek olduğu belirtilmektedir. Mezenkimal kök hücre serilerinde genellikle kök hücre karakterini korumada rolü olduğu ancak kondrojenik farklılaşmayı önleyemediği ifade edilmektedir. <sup>25</sup>

*Vimentin*, mezenkimal fenotipi temsil eden bir sitoplazmik intermedier filaman, yani bir hücre iskelet proteinidir. Eski yıllarda mezenkimal tümör tanısında tümör kökeninin bir belirteci olarak kullanıldıysa da yıllar içinde gündelik pratikteki kullanımı azalmıştır, yumuşak doku tümörleri dışında epitelyal tümörler dahil farklı kökenlere sahip birçok tümörde eksprese olabilmektedir. Matür non-neoplastik mezenkimde de ekspresyonu yaygın ve sıktır. İnvaziv karsinomlarda ekspresyonu artmaktadır. Mezenkimal hücrelerde veya mezenkimale yakın hibrit fenotipe sahip hücrelerde ekspresyonu belirgindir. <sup>5</sup>

*N-kaderin*; EMT'de adherens bileşkelerin belli bileşenlerinin yerini alarak bileşkelere esneklik, hücrelere serbestleşme ve hareket kapasitesi sağlayan proteinlerdendir. N-kaderin ekspresyonuna zorlanmış hücrelerde E-kaderin downregüle olabilmektedir. <sup>26</sup> *Matriks metalloproteinazlar* membran asosiye ya da hücre dışına salgılanan enzimatik proteinlerdir. Bunlar ekstraselüler alanda E-kaderini parçalayabildiği gibi tümör hücrelerinde hücrelerin invazyon ayakları olan "invadopod"ların oluşumuna da öncülük etmektedir. *Ekstraselüler matriksin* kendisi (vitronektin, fibronektin, SPARC) ve hücre membranında ekstraselüler matriksle bağlantıyı sağlayan Integrin  $\alpha$ V

gibi yüzey molekülleri de hücrelerin migratuar/invaziv özellik kazanmasında belirleyici olabilmektedir.

### 2.3. Epitelyal Fenotipi Destekleyen Belirteçler

#### 2.3.1. E-kaderin

E-kaderin epitel hücreleri arasındaki adherens bağlantılarda yer alan ve bir moleküler fermuar gibi hücreler arası sıkı kenetlenmeyi sağlayan membran proteindir. E-kaderin hücre içinde aktin iskeletine, aralarında beta-kateninin de bulunduğu katenin molekülleri aracılığıyla bağlanmaktadır. E-kaderinin hücre membranından çözüldüğü karsinom örneklerinde (memenin lobüler karsinomu ya da midenin taşlı yüzük hücreli karsinomu gibi) E-kaderin ekspresyon düzeyinin tümörün infiltratif özelliğiyle doğrudan ilintili olduğu gözlenebilmektedir. Ayrıca diskoheziv morfoloji sergileyen birçok invaziv karsinomun progresyonunda da E-kaderin düzenlenmesinin önemli rol oynadığı dikkati çekmektedir. Gerçekten de EMT-TF'ler etkilerini sıklıkla E-kaderin'in baskılanması üzerinden göstermektedir. Sarkom MET'inin düzenlenmesinde de E-kaderin'in önemli bir hedef molekül olduğu kabul edilmektedir.<sup>7</sup>

E-kaderinin membrandan çözülmesi kendi başına mezankimal dönüşümün bir tetikleyicisi olabildiği gibi serbestleşen beta-kateninin nükleer translokasyonu da indirek olarak bu dönüşüme katkıda bulunabilmektedir. Benzer şekilde E-kaderinin de beta-katenin üzerindeki bağlayıcı etkisi sayesinde membrandaki E-kaderin, beta-kateninin nükleer lokalizasyonunu önleyebilmektedir.<sup>27</sup>

E-kaderin sentezinden sorumlu CDH1 geninde promotör metilasyonu ile kromatin yeniden modellenmesine (histon asetilasyonu/deasetilasyonu) bağlı transkripsiyonel kontrol, E-kaderin sentezinin temel düzenlenme mekanizmaları olarak görünmektedir.<sup>28</sup> E-kaderin; endoplazmik retikulum/Golgi kompleksinde post-translasyonel modifikasyon sırasında beta-kateninle kompleks oluşturduktan sonra hücre membranına çıkmaktadır. Güncel kanser araştırmalarındaki miRNA analizleri de başta miR-200 ailesi olmak üzere oldukça geniş bir miRNA spektrumunun kanserlerde E-kaderinin

transkripsiyonel düzenlenmesinde değişken şekillerde düzenleyici rol üstlenebildiklerini göstermiştir. <sup>7</sup>

Mezenkimal hücrelerde normal şartlarda eksprese olan kaderinler N-kaderin, R-kaderin ve Kaderin-11 olup <sup>29</sup> immünohistokimyasal olarak da bu hücrelerde E-kaderin ekspresyonu beklenmez. E-kaderin yumuşak doku ve kemik sarkomlarında değişken yaygınlıkta eksprese olabilmektedir. <sup>30</sup> Genel olarak sarkomlarda E-kaderin ekspresyonunun downregülasyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. <sup>31</sup> Kondrosarkomlarda MET-benzeri fenomenler saptanmış olup SNAIL downregülasyonu E-kaderin, desmocollin ve maspin gibi birtakım epitelyal belirteçlerde artışa yol açmaktadır. <sup>32</sup>

### 2.3.2. Epitelyal Fenotipi Destekleyen Diğer Belirteçler

Aktin iskeletiyle bağlantılı ve MET'te rol alan diğer epitelyal yüzey molekülleri arasında *Claudin-1*, *occludin-1*, *ZO-1* gibi tight junction proteinleri bulunmaktadır. Ewing sarkomunda Claudin-1 ve Occludin ekspresyonu ile karakterize kısmi epitelyal farklılaşmanın, tümörün karakteristik alterasyonu olan EWSR-FLI1 düzeylerindeki tümör içi heterojeniteyle ilişkili olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur. Ayrıca Ewing'de tight junction proteinlerinin immünohistokimyasal ekspresyonunun da olabildiği gösterilmiştir <sup>33,34</sup>.

Claudin-1'in immünohistokimyasal ekspresyonu yumuşak dokuda perinöromayı diğer yumuşak doku tümörlerinden ayırmada kullanılmaktadır. Perinöromadaki bu ekspresyon paterni, non-neoplastik perinöral hücrelerin diğer mezenkimal hücrelerden farklı olarak bu tight junction proteinini intrinsik olarak eksprese etmesi ile ilişkilendirilmiştir <sup>35</sup>.

Epiteloid sarkom ya da kordoma gibi neoplazmlar *sitokeratin* ve *EMA* gibi epitelyal belirteçlerle ekspresyonu nedeniyle epitelyal farklılaşma gösteren mezenkimal tümörler arasında anılmakta, bu belirteçler gündelik pratikte de sıklıkla kullanılmaktadır.

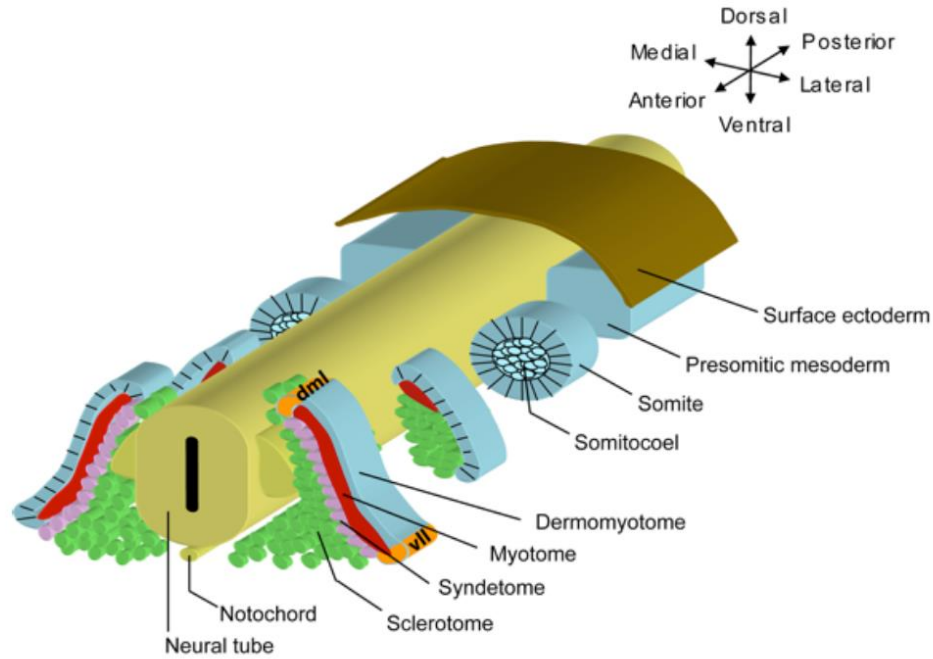
GRHL2, morfogenezin kilit düzenleyici transkripsiyon faktörlerindedir ve ZEB ile karşılıklı inhibitör bir döngü içindedir: GRHL2'nin promoter bölgesinde ZEB1'in bağlanabildiği üç bölge bulunur, ZEB1 promoter'ında GRHL2 için bir adet bağlanma bölgesi mevcuttur. Son yıllarda hücre

çalışmalarında miR200 ve GRHL2'nin bazı sarkom hücrelerinde sinerjistik olarak mezenkimal epitelyal transizyonu indükleyebildiği gösterilmiştir <sup>36</sup>.

#### **2.4. TCF15 (PARAXIS)**

Kanser hücrelerinde embryogenez süreçlerini anımsatan hücresel yeniden programlanmalar olabilmektedir. Embryogenezde rol alan çeşitli transkripsiyon faktörlerinin zaman zaman neoplazilerde de aktivite gösterebilmesi bu ilginin kurulmasını sağlamaktadır. TCF15, diğer adıyla PARAXIS, somitogenez sırasında matür epitelyal somit oluşumundaki MET'te gereksinim duyulan, TWIST ailesinden bir bHLH transkripsiyon faktörüdür. <sup>37</sup>

Somitogenez; başta ekstremitte gelişimi olmak üzere embryonun segmental olarak paternlenmesini sağlayan mezodermal toplulukların oluşmasını sağlamaktadır. Erken dönemde embryoda orta hatta nöral tüpün iki yanında uzanan presomitik mezoderm denen mezenkimal hücre hatları bulunmaktadır. Öncelikle bu hatlardan saat dalga-cephe modeli olarak ifade edilen sinyalleşmeler sayesinde rostrokaudal eksen boyunca birbirleriyle sınırları belirginleşen immatür somit segmentleri oluşmaktadır ("segmentasyon"). İmmatür somitlerin dış kısmında MET ile bir dış epitelyal kılıf oluşmakta ("matür epitelyal somit") ve bu kılıf somitosel ismi verilen mezenkimal korları çevrelemektedir. Her segmentte bu yapı epitelyal kılıfın kademeli olarak EMT geçirmesinin de katkılarıyla, ileriki safhalarda dermis, kemik ve yumuşak dokunun oluşumunun önünü açacaktır.



**Şekil 3**<sup>38</sup>: Embryoda anterior-posterior eksen boyunca epitelyal somit ve matür somit oluşumunun şematik görünümü. Somitosel etrafında epitelyal kılıf görülmektedir.

Somitogeneizde Paraxis'in aktive olması segmental ektodermal plaklarda üretilen ve Wnt sinyal yolağını harekete geçiren Wnt6 ligandı aracılığıyla olmaktadır. Bu yolak beta-katenin bağımlı kanonik Wnt sinyalini harekete geçirmektedir.<sup>26</sup> Somitogeneizde epitelyal kılıf hücrelerinde artmış adezyon özellikleri gözlenirse de Paraxis ile kaderin ailesi hücre yüzey moleküllerinin ekspresyonu arasında doğrudan bir ilişki bildirilmemiştir. Paraxis, fenotipteki etkisini ayrıca sitoskeletal reorganizasyon enzimleri (Rho-GTPazlar) ve hücre-ekstraselüler matris ilişkileri üzerinden de gösteriyor görünmektedir.<sup>37</sup>

Paraxis'in tiroid epiteli, nöron gibi vücuttaki çok çeşitli matür erişkin hücre tiplerinde de immünohistokimyasal olarak teyit edilmiş ekspresyonları mevcuttur. Ancak bunların fonksiyonel anlamları iyi bilinmemektedir. Matür mezenkimal hücrelerde ekspresyon bildirilmemiştir.

Paraxis bugüne kadar ne epitelyal ne de non-epitelyal tümörlerde araştırılmış bir transkripsiyon faktörüdür. 2020 tarihli güncel bir çalışma

Paraxis ekspresyonunun hematopoetik kök hücrelerin rejeneratif kapasitesinin uzun ömürlü olmasını sağladığına işaret etmiş ve kemik iliği transplantları açısından önemine dikkat çekmiştir.<sup>39</sup>

## 2.5. P-kaderin

Kaderin ailesinden bir yüzey molekülüdür. En çok çalışıldığı alan meme karsinomları olup çeşitli epitelyal kanserlerde kaderin değişimi (“cadherin-switching”) mekanizmasıyla metastazı kolaylaştırıcı etki göstermektedir. Bu mekanizma sayesinde E-kaderin gibi görece sıkı, hücrelerin kompakt şekilde bir arada durmasını sağlayan yüzey moleküllerinin yerini P-kaderin, N-kaderin gibi kaderin yine ailesine mensup ancak ona kıyasla adherens bileşkelere daha fazla esneklik getiren elemanlar almaktadır.

Karsinom verilerinden hareketle P-kaderin’in tümör progresyonu ile ilintisinin kaderin değişimi haricinde şu mekanizmalar üzerinden olduğu düşünülmektedir:

- E-kaderin mekanotransdüksiyonu
- Kök hücre sinyalleri
- Epitelyal-mezenkimal transizyon<sup>40</sup>

P-kaderin’in özellikle triple-negatif meme kanserlerinde hem primer odakta hem de aksiller lenf nodu metastazı odaklarında immünohistokimyasal olarak ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.<sup>41</sup> P-kaderinin matür mezenkim ya da mezenkimal kök hücrelerde immünohistokimyasal ekspresyonuna rastlanmamıştır. Yumuşak doku tümörlerinden alveoler rabdomyosarkomlarda bu tümörün özgün translokasyonu olan PAX3-FOXO1A’nın P-kaderin’i hedef aldığı ve tümörün agresivitesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>42</sup> Benzer şekilde P-kaderin’in myoplastik hücrelerde eksprese olduğunda Cdc42 ve Rac1 gibi Rho-GTPaz ailesinden sitoskeletal reorganizasyon enzimlerini aktive edebildiği, bu mekanizmalarla kolektif migrasyona yardımcı olduğu ifade edilmektedir.<sup>43</sup>

Bu bilgiler P-kaderinin mezenkimal tümör progresyonunda da rolü olabilecek bir belirteç olduğunu ve epitelyal kanserlere benzer davranış

sergileyen lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda daha sık görülebileceğini akla getirmektedir.

## 2.6. Beta-katenin

Kateninler ailesinde yer alan, kaderinin intrasitoplazmik ünitelerine bağlanarak adherens bileşkelerin yapısına katılan ve ayrıca sitozolik havuzu da bulunan, CTNNB1 geni tarafından kodlanan bir düzenleyici moleküldür. Beta-katenin, Wnt sinyalinin yokluğunda hücrelerde üretimi ile yıkımı sürekli ve aktif olarak devam eden önemli bir moleküldür. <sup>44</sup>

Kanonik, diğer adıyla beta-katenin bağımlı Wnt sinyal yolağı; Wnt ligandları ve hücre yüzeyinde bunları tanıyan Frizzled (Fzd) reseptörlerinin etkileşimi neticesinde aktive olmaktadır. Normal şartlar altında “beta-katenin yıkım kompleksi” ismi verilen, reseptörle de etkileşim halindeki birçok farklı protein ünitelerinin bir araya geldiği bir kompleks; serbest beta-katenini fosforilleyerek işaretlemekte, onu ubiquitinasyona ve proteozomal parçalanmaya yönlendirmekte, yani belli bir sitozolik konsantrasyonda tutmaya çalışmaktadır. Kanonik Wnt sinyal yolağı aktivasyonu sitozolik beta-katenin havuzunda şişmeye ve beta-kateninin nükleusa yer değiştirmesine neden olur. Beta-kateninin nükleer translokasyonu başta ZEB1, SLUG gibi EMT-TFlerin aktivasyonu olmak üzere çeşitli akış aşağı etkiler göstermektedir.

Beta-katenin EMT ilişkili belirteçler içerisinde mezenkimal tümörlerde en çok irdelenmiş belirteçtir. 2000’li yılların başında Montgomery ve ark. ile Ng ve ark.’nın yaptığı çalışmalarda mezenkimal tümörlerde nükleer beta-katenin ekspresyonunun sıklığı ve bu belirtecin mezenkimal tümör tanısındaki önemi değerlendirilmiştir. <sup>45,46</sup> Desmoid fibromatozis vakalarının büyük kısmında nükleer beta-katenin ekspresyonunun sık görüldüğü, bu bulgunun tanısal açıdan değerli olduğu ancak spesifik olmadığı vurgulanmıştır. Soliter fibröz tümörlerde (SFT) de nükleer beta-katenin ekspresyonu nadir değildir. <sup>47</sup> 2016 yılında yayınlanan bir diğer makalede, aralarında desmoid fibromatozisin de bulunduğu yumuşak doku ve histogenezi belirsiz birtakım parankimal tümörler spektrumunda, Wnt yolak aktivasyonundan bağımsız olarak beta-katenindeki intrinsik bir patolojinin, aktive edici beta-katenin mutasyonlarının patogeneizde

rol oynadığı ifade edilmiştir. Yazarlar tarafından bu tümörlere “CTNNB1 alterasyonu gösteren neoplaziler” adı verilmiştir. <sup>48</sup> Aktive edici beta-katenin mutasyonları, beta-kateninin en çok çalışıldığı karsinom gruplarından olan kolorektal kanserlerin bir kısmında da bildirilmiştir. <sup>49</sup>

Beta-katenin erişkin mezenkim hücresinde immünohistokimyasal olarak zayıf sitoplazmik ekspresyonu görülebilen bir belirteçtir. Nükleer ekspresyonu daima patolojik bir bulgudur.

## 2.7. ALDH1

Aldehit dehidrojenazlar (ALDH), sitozolik ve nükleer izoformları bulunan dehidrojenaz grubu bir enzim ailesidir. Temel işlevleri alkol metabolizması gibi aldehit ürünlerinin açığa çıktığı biyokimyasal süreçlerde hidrojen transferiyle oksidasyon ve detoksifikasyon sağlamalarıdır. ALDH ekspresyonunun çeşitli kanserlerde tümör hücrelerinin siklofosamid veya ifosamid gibi kemoterapötiklere direnciyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu yayınların arasında osteosarkom gibi mezenkimal tümörlerin de bulunması dikkat çekicidir. <sup>50-52</sup>

Epitelyal kanserlerdeki EMT çalışmalarında kök hücre belirteci olarak CD44, CD49f, CD24 gibi yüzey belirteçlerinden faydalanılmaktadır. <sup>12,14</sup> Aslında ne karsinomlarda ne de yumuşak doku tümörlerinde üzerine fikir birliğine varılmış ideal bir kök hücre belirtecinden bahsetmek mümkündür, ancak ALDH1'tan hem epitelyal hem mezenkimal tümörlerde sıklıkla bahsedilmektedir. <sup>53</sup> Lohberger ve ark.'nın farklı sarkomlara ait hücre serileriyle yaptıkları çalışmalarında ALDH1 ekspresyonunun yüksek bulunduğu hücrelerde kontrol grubuna kıyasla proliferatif aktivitenin yüksek olduğu, koloni oluşturma eğiliminin arttığı, indüklenmiş pluripotensin temsili olan c-myc ve SOX2 gibi kök hücre faktörlerinin ekspresyonunda artış olduğu, sitotoksik ilaç eksportundan sorumlu ABC transporter genlerinin daha çok ifade edildiği ve birtakım kemoterapötik ajanlara direnç geliştiği kaydedilmiştir. <sup>54</sup>

*ALDH1A1* geni, ALDH grubuna ait çeşitli izoenzimlerinden olan ALDH1A1'i kodlamaktadır. ALDH1A1'in immünohistokimyasal ekspresyonu vücutta çeşitli lokalizasyonlarda matür dokuda hem epitelyal hem mezenkimal hücrelerde görülebilmektedir. Bu enzim hem non-neoplastik dokulardaki kök



hücrelerde hem de kanser kök hücrelerinde önemli işlevlere sahiptir. ALDH1'in kök hücre belirteci olmasının altında A vitamini metabolizmasındaki etkileri yatmaktadır. A vitamini yıkımındaki ara ürünlerden olan retinoik asit ALDH1 aktivitesiyle açığa çıkmaktadır. Retinoik asit, nükleusta apoptozu önleyen, hücre proliferasyonunu uyaran ve tümör büyümesine yardımcı olan c-myc ve Cyclin-D1 gibi onkojenik aktivasyon/hücre siklus progresyonu faktörlerinin aktivasyonunu düzenlemektedir. <sup>55</sup>

ALDH1'in immünohistokimyasal ekspresyonunun metastaz potansiyelli mezenkimal tümörlerden olan soliter fibröz tümörlerde sık görüldüğü ve bu bulgunun baş lokalizasyonunda meningiomlar ve ayrıca sinovyal sarkomdan tanısal ayırmda faydalı olabileceği gösterilmiştir. <sup>56</sup>

## **2.8. Genel Bilgiler Işığında Mezenkimal Tümörlerde Çalışmada İncelenen Belirteçler Açısından Olası Hipotezler**

- Farklı biyolojik davranış paternine sahip mezenkimal tümör grupları arasında EMT/MET belirteçlerinin ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunabilir, çünkü bu belirteçler klinik seyirle ilintilidir. Mezenkimal tümörler kökenleri itibariyle mezenkimal belirteçleri eksprese etme eğilimindedir. Dolayısıyla epitelyal dönüşümün olup olmaması biyolojik davranış açısından anlamlı sonuçlar doğurabilir.
- Aynı tümörün diferansiye ve dediferansiye alanları arasında EMT/MET belirteçlerinin ekspresyonu açısından fark bulunabilir, çünkü bu tümörlerde biyolojik davranışı dediferansiyasyonun varlığı belirleyebilmektedir.
- Aynı tümör tipinin farklı varyantları arasında EMT/MET belirteçlerinin ekspresyonu açısından fark bulunabilir, çünkü bu varyantların tanımlanmasındaki çıkış noktası biyolojik davranış farklılıkları olabilmektedir.
- Bir tümörün primer ve metastatik odaklarında EMT/MET belirteçlerinin ekspresyonu bakımından fark bulunabilir, çünkü metastatik odaklarda metastaz yapabilen fenotipe sahip klonlara rastlamak daha olasıdır. Karsinomlar re-epitelizasyon ile metastaz odaklarında MET

geçirebilmektedir, benzer bir süreç lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda söz konusu olabilir.

- Bir epitelyal belirteç olan keratin ile ekspresyon gösteren sarkomlar diğer sarkomlara kıyasla yüzey molekülleri bakımından da epitelyal transizyon fenotipe sahip klonlardan daha zengin tümörler olabilir.
- Mezenkimal tümörlerde TCF15 ekspresyonu ile ilgili bir çalışma mevcut değildir. Nükleer beta-katenin ile TCF15 ekspresyonunun korelasyonu, neoplastik mezenkimal hücrelerde somitogeneze benzer bir programlanmanın olup olmadığına ışık tutacaktır.
- P-kaderin, meme karsinomlarında geline noktan hareketle lenf nodu metastazı yapan sarkomların metastaz süreçlerinde rol oynayabilir. Ya da genel olarak metastaz potansiyeline sahip olan her türlü yumuşak doku tümöründe metastaz yapabilen hücre fenotipinin ortaya çıkmasında P-kaderin önemli rol oynayabilir, bu yönüyle de önemli bir ayırıcı tanısal belirteç olabilir.
- E-kaderinle asosiy bir membran proteini olarak beta-kateninin membranöz ekspresyonunun mezenkimal tümörlerde MET açısından önemi bilinmemektedir. E-kaderin ekspresyonu ile korelasyonundan hareketle membranöz beta-kateninin MET için spesifitesi ve sensitivitesi tartışılabilir ve mezenkimal tümörlerde metastaz potansiyeliyle ilişkisi daha detaylı irdelenecektir.
- Metastaz potansiyeline sahip olan bir tümör olan SFT'lerde yaygın ekspresyonu olan ve bir kök hücre belirteci olan ALDH1, yumuşak doku tümörlerinde yine metastaz potansiyeli olan diğer histolojik alt tiplerde daha fazla eksprese olabilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. İncelenecek Dokuların Seçimi ve Doku Dizinlerinin (Tissue microarray-TMA) Dizinlerinin Oluşturulması

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı bünyesinde prospektif ayağı da olan retrospektif bir laboratuvar çalışması olarak planlandı ve Eylül 2019 ile Ekim 2020 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmanın üç ana ayağı olup bunların lenf nodu metastazı yapan sarkomlar, dediferansiyasyon gösteren sarkomlar ve genel mezenkimal tümör spektrumu olması hedeflendi. Çalışmaya 1997-2019 tarihleri arasında mezenkimal tümör, karsinom ve malign melanom tanıları alan 527 olgunun dahil edilmesi için üniversitemiz etik kurulundan onay alındı (GO 19/886).

2016 ve öncesinde tanı alan, aralarında malign melanomların da bulunduğu 340 olgu için proje yürütücüsü Doç. Dr. Kemal Kösemehmetoğlu'nun malign mezenkimal tümörlerde PDL-1 ekspresyonunu konu alan araştırmasına ait TMA bloklarından yararlanıldı<sup>57</sup> ve çalışmaya dahil edildi. Bu araştırmada temsil edilmeyen veya sayıca arttırılması planlanan tümör tipleri belirlendi. Bu amaçla 2016-2019 yılları arasında mezenkimal tümör ve karsinom tanıları alan vakarın bilgilerine hastane otomasyon sistemi üzerinden ulaşıldı ve içlerinden 181 vaka seçildi. Mümkün olduğunca primer lokalizasyonda tanı verilen, kor biyopsi niteliğinde olmayan, tedavi almamış, canlı tümör içeren örnekler seçildi. Seçilen olgular arasında 2 adet lenf nodu metastazı yapan sarkom mevcuttu, ayrıca lenf nodu metastazı yapan ve 2002-2015 yılları arasında tanı alan diğer 7 sarkom olgusuna yazılı diğer kayıtlar üzerinden ulaşıldı ve bunlar da çalışmaya dahil edildi. Böylece toplamda 188 olguya ait preparatlar yeniden incelendi, toplam 9 lenf nodu metastazı yapan sarkom vakası da çalışmaya katılmış oldu. Lenf nodu metastazı yapan sarkomlar dışındaki tüm olgularda preparatlar üzerinde temsili tümör alanları işaretlendi. Seçilen vakalar arasında 16 adet dediferansiye liposarkom olgusu mevcuttu. Dediferansiye liposarkom olgularında diğerlerinden farklı olarak hem iyi diferansiye hem de dediferansiye alanlar işaretlendi ve her iki alanın ayrı ayrı değerlendirilmesi planlandı. %10 formaldehitte fikse parafine gömülü

dokular arşivden çıkarıldı ve bu alanlardan 3 mm çaplı punch biyopsi iğnesi yardımıyla şablon parafin bloklar üzerinde TMA doku dizinleri oluşturuldu. Lenf nodu metastazı yapan sarkomların hem primer hem de metastaz odaklarından seçilen dokuların tam yüzey incelenmesine karar verildi ve bunlara ait parafin bloklar da arşivden çıkarıldı. Bütün dokular İHK yanı sıra hematoxilen-eozin (H&E) ile de boyandı; temsili olmayan örnekler değerlendirme dışı bırakıldı. Çalışmaya dahil edilen olguların tanıları ve vaka sayıları Tablo 1’de ve Tablo 2’de gösterilmiştir. Teknik problemler (doku dökülmesi vb.) nedeniyle her antikor için bu olguların bir kısmını değerlendirmek mümkün olmuştur.

**Tablo 1.** Lenf nodu metastazı yapan sarkom olguları ve histolojik tanıları

Tanı	Vaka Sayısı (n)
Anjiosarkom	2 *
Dediferansiye Kondrosarkom	1
Parakordoma	1
Az diferansiye sinovyal sarkom	2
Myoepitelyal karsinom	1
Rabdomyosarkom	1
Şeffaf hücreli sarkom	1 *

\* Bir anjiosarkom ve bir şeffaf hücreli sarkom vakasının primer dokularına ulaşılammıştır.

**Tablo 2.** Çalışma için seçilen mezenkimal tümörler ve vaka sayıları

BENİGN MEZENKİMAL TÜMÖRLER		ARA DAVRANIŞLI MEZENKİMAL TÜMÖRLER	
<i>Anjiomyofibroblastom (1)</i>	Mikzoma (3)	Agresif anjiomikzom (2)	Kaposi sarkomu (5)
<i>Dermatofibrom (6)</i>	Myofibroblastom (1)	Atipik fibroksantom (1)	Parakordoma (4)
<i>EBV ilişkili düz kas tümörü (4)</i>	Myofibrom (6)	Desmoid fibromatozis (17)	Soliter fibröz tümör (20)
<i>Hemanjiom (6)</i>	Nörofibrom (12)*	Atipik lipomatöz tümör/iyi	Anjiomatoid fibröz histiyositom (13)
<i>Hibrit schwannom-perinörom (3)</i>	Schwannom (10)	diferansiye liposarkom (15)	Dermatofibrosarkoma protuberans (5)
	Yüzeysel fibromatozis (6)		
	Leiomyom (2)		
MALİGN MEZENKİMAL TÜMÖRLER			
<i>Alveolar soft part sarkom (3)</i>	Epiteloid sarkom (19)	Düşük dereceli fibromikzoid sarkom (4)	Malign periferik sinir kılıfı tümörü (24)
<i>Andiferansiye pleomorfik sarkom (11)</i>	Ewing sarkom (6)	Sklerozan epiteloid fibrosarkom (5)	Ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom (3)
<i>Anjiosarkom (9) **</i>	Ewing benzeri sarkom (5)	Şeffaf hücreli sarkom (5)**	Epiteloid hemanjiyoendotelyoma (6)
<i>Dediferansiye liposarkom (32)</i>	Fibrosarkomatöz DFSP (4)	Myoepitelyal karsinom (1)	Rabdomyosarkom (16)
<i>Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (9)</i>	Leiomyosarkom (85) ***	Pleomorfik liposarkom (5)	<i>Alveoler (7)</i>
<i>Mikzoid liposarkom (23)</i>	Mikzofibrosarkom (12)	Sinovyal sarkom (49)	<i>Embryonel (6)</i>
<i>Konvansiyonel (17)</i>	Yüksek dereceli (11)	<i>Bifazik (16)</i>	<i>Pleomorfik (2)</i>
<i>Yuvarlak hücreli (6)</i>	Düşük dereceli (1)	<i>Monofazik (21)</i>	<i>İğsi hücreli (1)</i>
		<i>Az diferansiye (12)</i>	
KARSİNOMLAR			
<i>Akciğer adenokarsinomu (3)</i>	Meme karsinomu (5)	Mide adenokarsinomu (3)	Prostatik adenokarsinom (1)
<i>Akciğerin skuamöz hücreli karsinomu (3)</i>	ER (+) (2)	Küçük hücreli karsinom (3)	Rektum adenokarsinomu (3)
<i>Endometrium adenokarsinomu (2)</i>	HER2 (+) (2)	Ürotelyal karsinom (2)	Seröz karsinom (3)
	“Üçlü-negatif” (1)		
<b>Malign Melanom (18)</b>			
<b>Dediferansiye Kondrosarkom **** (1)</b>			
<b>TOPLAM (527)</b>			

\* 2 olgu atipik, 4 olgu pleksiform nörofibrom histolojisindeydi.

\*\* Sadece lenf nodu metastazı ile değerlendirilen bir olgu mevcuttur.

\*\*\* Bunların 55'i uterin leiomyosarkomlardır. Ayrıca 10 olgunun pleomorfik leiomyosarkom histolojisinde olduğu kaydedildi.

\*\*\*\* Bu olgu sadece lenf nodu metastazı yapan sarkomlarla ilişkili olan istatistiksel analizlere dahil edilmiştir.

### 3.2. İmmünohistokimyasal Analiz

Optimizasyon için öncelikle kullanılacak antikolar kontrol dokular üzerinde denendi, sonrasında bu antikoların Tablo 3'te gösterilen şartlarda uygulanmasına karar verildi.

İmmünohistokimyasal analizler formalin fikse parafine gömülü dokulara (TMA ya da tam yüzey) uygulandı. Lenf nodu metastazı yapan sarkomlar dışındaki olgularda immünohistokimyasal değerlendirme için ekspresyonun neoplastik hücrelerdeki varlığı/yokluğu, yaygınlık derecesi veya boyandığı hücre kompartmanı dikkate alındı. (Tablo 4) Skorumalarda kullanılacak eşik değerler için boyalı camların küçük bir kısmından rastgele ön incelemeler yapılarak yaygınlıklarla ilgili genel fikir edinilmeye çalışıldı ve ayrıca literatürde yöntemsel benzerlik içeren (hem karsinomlar hem mezenkimal tümörlere ait) makaleler araştırıldı. EMT transkripsiyon faktörlerinden SLUG, TWIST1 ve ZEB1'in eşik değerleri için literatürde epitelyal ve mezenkimal tümörlerdeki benzer çalışmalar incelendi <sup>4,58,59</sup>. Mezenkimal tümörlerde MET değerlendirilmesinde bu faktörlerle ekspresyonun *kayıbı* önemli olacağından literatürdeki pozitiflik oranlarını %100'e tamamlayan oranlar (ya da buna yakın değerler) pozitiflik için eşik değer kabul edildi ve kaydedildi.<sup>2</sup> (Tablo 4) Bouvier ve ark.'nın soliter fibröz tümörlerde ALDH1 immünohistokimyasını irdeleyen çalışması pozitiflik kriterleri açısından ayrıca yol gösterici oldu <sup>47</sup>.

Tabloda belirtilen hücresel kompartmanlarda boyanma izlenmediğinde ekspresyonun olmadığı kabul edildi. Fokal şüpheli pozitif boyanmalarda yalancı pozitiflik olasılığını dışlayabilmek için büyük büyütmede kriterleri karşılayan en az iki odak bulunmaya çalışıldı. Kenar etkisinin belirgin olduğu olgularda - TMA'lar için aynı hizadaki diğer olgularda da yaygın zemin boyanması olasılığı dışlandıktan sonra - kenardan bir büyütme alanından daha içeride de devam eden boyanmalar pozitif olarak değerlendirildi. Teknik dökülmelerin ya da doku katlanmalarının gözlemlendiği vakalarda en az 100 neoplastik hücrenin değerlendirilebilir olmasına dikkat edildi. Tümörlerde bu belirteçlerle fokal değişikliklerin önemli biyolojik anlamları olabileceği bilgisinden hareketle tüm immünohistokimyasal boyanmalarda ilgili antikora göre "hot-spot" olarak boyanmalar veya boyanma kayıpları esas alındı. Lenf

nodu metastazı yapan sarkomlarda tüm belirteçlerle ekspresyon oranları kantitatif olarak verildi ve derlendi.

Pür membranda yerleşim gösteren bir molekül olan E-kaderin için neoplastik hücrelerdeki herhangi bir çizgisel membranöz boyanma pozitif olarak kabul edildi. Beta-katenin ile boyalı preparatlarda mezenkimal tümörlerin bir kısmında da membranöz boyanma paterninin varlığı dikkati çekti. Literatürde mezenkimal tümörlerde membranöz beta-katenin ekspresyonuna değinen yayınların ender olduğu görüldü ve bu konuyla ilgili belirlenmiş immünohistokimyasal değerlendirme kriterlerine rastlanmadı <sup>60</sup>.

**Tablo 3.** Kullanılan Antikorlar, İmmünohistokimyasal Analizler İçin Tetkik Koşulları ve Ön Denemede Referans Alınan Kontrol Dokular

ANTİKOR	SAĞLAYICI	KLON / KATALOG NUMARASI	DİLÜSYON	ANTİJEN AÇIĞA ÇIKARMA*	ÖRNEK KONTROL VE HÜCRESEL KOMPARTMAN
<b>Anti-E-kaderin</b>	Elabscience Tavşan poliklonal	E-AB-12930	1:200	Sitrat	Kolon epiteli - Membranöz
<b>Anti-SLUG (SNAI2)</b>	Novus Fare monoklonal	OT11A6 NBP2-03886	1:150	EDTA	Tiroid epiteli ve deride fibroblastlar - Nükleer
<b>Anti-TWIST1</b>	Abcam Fare monoklonal	Ab175430	1:1000	EDTA	Serozal bağ doku, fibroblastik hücreler - Nükleer
<b>Anti-ZEB1</b>	Abcam Tavşan monoklonal	EPR17375 Ab203829	1:100	EDTA	Kolonik myofibroblastlar - Nükleer
<b>Anti-P-kaderin</b>	BD Transduction Fare monoklonal	610227	1:400	EDTA	Tonsil epiteli - Membranöz
<b>Anti-TCF15 (PARAXIS)</b>	Abcam Tavşan poliklonal	Ab66371	1:200	EDTA	Nöron - Nükleer
<b>Anti-ALDH1</b>	BD Transduction Fare monoklonal	611195	1:1000	EDTA	Dermal fibroblastlar – Nükleer ve Sitoplazmik
<b>Anti-Beta-Katenin</b>	Dako Cytomation Fare monoklonal	M3539	1:200	EDTA	Kolon epiteli – Membranöz Çalışma dışı bir desmoid fibromatozis olgusu - Nükleer

\* Antijen açığa çıkarma için Leica Bond Max® “kullanıma hazır” kitlerden (“ER1” sitrat, “ER2” EDTA) yararlanılmıştır. Ön işlem süreleri Anti-Beta-katenin dışındaki tüm antikorlarda 20 dk, Anti-Beta-Katenin’de 10 dk olarak belirlenmiştir. Anti-TCF15’te maruziyetin diğer antikorlarla kıyasla daha uzun olması hedeflenmiştir.

\* Saptama sistemi olarak polimer temelli Leica Bond Max® DS9800 hazır kitinden yararlanılmıştır.

**Tablo 4.** İmmünohistokimyasal Çalışmaların Değerlendirme Şeması

Belirteç	Değerlendirme	Kriterler *	Boyanması Beklenen Hücre Kompartmanı
<b>E-kaderin</b>	Var/yok		Hücre membranı
<b>SLUG (SNAI2)</b>	Semikantitatif	Negatif: 0-%80 Pozitif: ≥%80	Nükleus
<b>TWIST1</b>	Semikantitatif	Negatif: 0-%80 Pozitif: ≥%80	Nükleus
<b>ZEB1</b>	Semikantitatif	Negatif: 0-%80 Pozitif: ≥%80	Nükleus
<b>P-kaderin</b>	Var/yok		Hücre membranı
<b>TCF15 (PARAXIS)</b>	Var/yok		Nükleus
<b>ALDH1</b>	Semikantitatif	Negatif: %0 Pozitif: >%0 (Yaygın: ≥%25)	Sitoplazma ve nükleus
<b>Beta-Katenin</b>	Var/yok	Nükleer veya membranöz boyanmanın varlığı spesifik Sitoplazmik boyanma non-spesifik	Hücre membranı / sitoplazma / nükleus

\* Semikantitatif değerlendirilen olgular ilk aşamada skorlanarak gruplanmış, istatistiksel analiz aşamasında bu skorlar yeniden kategorize (var/yok, yaygın/yaygın değil gibi) edilmiştir.

Beta-kateninin hücrenin her üç kompartmanında (nükleus, sitoplazma ve membran) eksprese olabilen bir molekül olması, bu üç kompartmandaki boyanmaların ayrı ayrı fonksiyonel anlamlarının olması ve özellikle işi morfoloji sergileyen hücrelerde nükleus ve membranın birbirine oldukça yaklaşması, sitoplazmik alanın daralması nedeniyle membranöz pozitiflik aşığıdaki öznel kriterlere göre değerlendirildi:

- Hücrenin sitoplazmik sınırlarının en az 2/3'ünü kesintisiz ve intens olarak çizen
- Çekirdekle arasındaki sitoplazmik mesafesi ayırt edilebilen
- Dokudaki kenar artefaktından bağımsız olarak da seçilebilen boyanma.



Membranöz beta-katenin değerlendirmesi sırasında endotel pozitifliğinin dışlanması özellikle dikkat edildi. Beta-katenin ile değişken yaygınlık ve intensitede sitoplazmik boyanma çok sık gözlemlendiğinden (sitoplazmik beta-katenin havuzuna bağlı olarak), kantitatif analizlerle birleştirilmeksizin bu bulgunun immünohistokimyada tek başına anlamı olmadığı düşünüldü ve değerlendirmeye alınmadı.

ZEB1 değerlendirmesi sınırlı bir grup vakada yapılabilmektedir. (bkz. Tablo 5)

### 3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS (IBM SPSS Statistics 23) ve R Studio (DescTools paketi kullanılmıştır) paket programları kullanılarak yapılmıştır. Sayısal değişkenlere ilişkin dağılımların normal dağılıma uyup uymadığını test etmek için Shapiro – Wilk uyum iyiliği testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler verilmiştir. Normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenler için ise ortanca ve çeyrekler arası dağılım aralığı gibi tanımlayıcı istatistikler verilmiştir. Kategorik değişkenler için yüzde değerleri ve frekans tabloları verilmiştir.

#### 3.3.1. Tüm Mezenkimal Tümör Grubunun İstatistiksel Analizleri

Bu grup dediferansiye liposarkom olgularının dediferansiye örneklerini, lenf nodu metastazı yapan yumuşak doku sarkomlarının primer örneklerini, primer dokusuna erişilemeyen metastatik sarkom örneklerini ve bunların haricindeki bütün mezenkimal tümör örneklemine kapsamaktadır.

Tüm mezenkimal tümör grubunda olgular aşağıdaki ana kategorik değişkenler altında yeniden kategorize edilmiştir:

- Biyolojik davranış ve metastaz potansiyeline göre: Benign, lokal agresif intermedier, nadiren metastaz yapan intermedier ve malign
- WHO 2020 kemik-yumuşak doku tümörlerinin farklılaşmalarına göre sınıflanması: Lipojenik, fibroblastik/myofibroblastik, düz kas farklılaşması gösteren, çizgili kas farklılaşması gösteren, sinir kılıfı,

perisitik, vasküler, andiferansiye küçük yuvarlak hücreli ve histogenezi belirsiz tümörler

- Keratin ekspresyonu gösterdiği bilinen sarkomlar: Alveoler soft part sarkom, anjiosarkom, desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör, epitelooid hemanjiöendotelyoma, epitelooid sarkom, Ewing sarkom, leiomyosarkom, myoepitelyal karsinom, parakordoma ve sinovyal sarkom.
- Gündelik pratikte ayırıcı tanısı sıkıntı yaratabilen başlıca antiteler: Malign periferik sinir kılıfı tümörü (MPNST) ve monofazik sinovyal sarkom, dediferansiye liposarkom ve mikzofibrosarkom vb.

EMT transkripsiyon faktörleri ve E-kaderin'i bir araya getiren sentez bir mezenkimal-epitelyal transizyon parametresi oluşturulmuştur: "MET profili". Mezenkimal tümörler üç ayrı MET profiline göre kategorilere ayrılmıştır:

1. MET<sup>high</sup>: Mevcut antikorlarla mezenkimal-epitelyal transizyon eğiliminin immünohistokimyasal açıdan kuvvetle desteklendiği olguları tanımlamıştır. E-kaderin (+), SLUG (-) ve TWIST1 (-) olgular bu kategoriye alınmıştır.
2. MET<sup>neg</sup>: Mevcut antikorlarla mezenkimal-epitelyal transizyon eğilimi açısından immünohistokimyasal kanıtın bulunmadığı "mezenkimal-benzeri fenotipteki" olguları tanımlamıştır. E-kaderin (-), SLUG (+) ve TWIST1 (+) olgular bu kategoriye alınmıştır.
3. MET<sup>low</sup>: MET<sup>high</sup> veya MET<sup>neg</sup> grubunda olmayan immünohistokimyasal profillere sahip tüm olguları tanımlamıştır. Bu tanıma göre E-kaderin kazanımı veya mezenkimal belirteç kaybı açısından heterojen profil sergileyen olgular bu kategoriye alınmıştır.

Her üç antikorla da değerlendirilebilmiş olgular MET profil analizlerine dahil edilebilmiştir. ZEB1, bu antikor panelinde yer alabilecek bir EMT-TF olmasına karşın bu antikorla sınırlı sayıda olguda incelenebildiğinden örnekleme daraltmamak amacıyla panele eklenmemiştir.

Mezenkimal tümör kategorileri arasında ve mezenkimal tümörler ile diğer tümör kategorileri arasında antikor değişkenleriyle pozitiflik bakımından farklılık olup olmadığı, antijen ekspresyon statülerinin kendi aralarındaki

ilişkileri Ki-Kare ( $\chi^2$ ) testi ile incelenmiştir. Çok gözlü ki-kare testi ile yapılan analizlerde farklılık yaratan grup ya da grupları belirlemek için compare column proportions (z testi) sonuçları incelenmiştir.

### **3.3.2. Bağımlı Örneklemelerin (lenf nodu metastazı yapan sarkomlar ile dediferansiye liposarkomların diferansiye ve dediferansiye alanları) İstatistiksel Analizleri**

MET profilleri de dahil olmak üzere tüm mezenkimal tümör grubunda kullanılan antikor değişkenlerinden bu gruplar için de faydalanılabilmektedir.

Çalışmaya seçilen lenf nodu metastazı yapan sarkom olgularından 7'sinin hem primer hem metastaz örneklerine ulaşılabildiğinden analizlere bu vakalar dahil edilmiştir, ulaşılamayan 2 olgu tüm mezenkimal tümör grubunun analizlerinde değerlendirilmiştir. Lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda primer ve metastaz odakları arasında ekspresyon yaygınlıkları bakımından farklılık olup olmadığı, örneklem büyüklüğü düşük olduğu için, parametrik olmayan testlerden Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile değerlendirilmiştir. MET profilleri bakımından farklılık olup olmadığı McNemar testi ile incelenmiştir.

Dediferansiye liposarkomların diferansiye ve dediferansiye alanları arasında ekspresyon varlığı/yokluğu, ekspresyon skorları ve MET profillerinin prevalansı bakımından farklılık olup olmadığı McNemar testi ve McNemar testinin kxk kategorili tablolar için genelleştirilmiş durumu olan Marjinal Homojenlik Testi (Stuart - Maxwell) ile incelenmiştir.

İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

#### **4. BULGULAR**

Tüm mezenkimal tümör grubunda gözlenen immünohistokimyasal ekspresyon yüzdeleri Tablo 5 ve Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Tüm mezenkimal tümörlerde, karsinomlarda ve malign melanomlarda EMT/MET belirteçleri ile MET profillerinin ekspresyon prevalansları

TANI (n)	EMT/MET Belirteçleri (%)									
	E-kaderin	SLUG* +	SLUG** >%80+	TWIST* +	TWIST** >%80+	ZEB1* +	ZEB1** >%80+	MET <sup>high</sup>	MET <sup>low</sup>	MET <sup>neg</sup>
<b>Karsinomlar (17-23)</b>	100	100	73,9	82,6	34,8			5,9	94,1	0
<b>Malign melanomlar (11-16)</b>	92,9	71,4	28,6	60	46,7			36,4	63,6	0
<b>Mezenkimal Tümörler (108-391)</b>	51,8	81,3	46,8	80,3	37,4	86,1	35,2	19	71,1	9,8
<b>Benign (23-53)</b>	46,9	85,1	55,3	81,1	22,6	69,6	4,3	11,6	83,7	4,7
Anjiomyofibroblastom (1)	100	100	100	100	100			0	100	0
Dermatofibrom (4-6)	66,7	100	100	100	83,3			0	83,3	16,7
EBV ilişkili düz kas tümörü (4)	0	100	25	75	25			0	75	0
Hemanjiom (6)	83,3	100	100	100	16,7			0	100	0
Hibrit schwannom-perinörom (3)	0	100	33,3	100	0	100	33,3	0	100	0
Leiomyom (2)	50	100	100	100	0			0	100	0
Mikzoma (3)	33,3	100	100	33,3	0			0	100	0
Myofibroblastom (1)	0									
Myofibrom (5-6)	66,7	100	80	100	0			25	75	0
Nörofibrom (2-11)	100	60	0	100	22,2	90,9	0	50	50	0
Schwannom (9-10)	30	50	0	30	0	33,3	0	30	70	0
Yüzeyel fibromatozis (2-4)	25	100	100	100	50			0	100	0
<b>İntermedier - lokal agresif (7-23)</b>	9,1	82,6	43,5	80	50			0	57,1	42,9
Agresif anjiomikzom (1)	0	0	0							
Desmoid fibromatozis (4-12)	16,7	72,7	45,5	91,7	83,3			0	25	75
Atipik lipomatöz tümör/iyi diferansiye liposarkom (4-8)	0	100	45,5	62,5	0			0	100	0
<b>İntermedier - nadir metastaz yapan (36-42)</b>	57,9	90,5	54,8	75,6	20			22,2	66,7	11,1
Atipik fibroksantom (1)	100	100	0	100	100			0	100	0
Anjiomatoid fibröz histiyositom (6-10)	14,3	100	90	77,8	55,6			0	66,7	33,3
Dermatofibrosarkoma protuberans (4)	0	75	0	100	75			0	100	0
Kaposi sarkomu (5)	80	100	80	100	60			0	100	0
Parakordoma (4)	75	75	0	25	0			75	25	0
Soliter fibröz tümör (16-18)	76,5	88,9	55,6	72,2	44,4			31,3	56,3	12,5

<b>Malign (85-305)</b>	<b>52,8</b>	<b>79,9</b>	<b>44,7</b>	<b>80,4</b>	<b>36,8</b>	<b>90,6</b>	<b>43,5</b>	<b>20,1</b>	<b>70,5</b>	<b>9,4</b>
Alveolar soft part sarkom (3)	0	66,7	0	66,7	66,7			0	100	0
Andiferansiye pleomorfik sarkom (11)	54,5	63,6	18,2	72,7	36,4			18,2	72,7	9,1
Anjiosarkom (3-7)	20	57,1	28,6	75	75			33,3	33,3	33,3
Dediferansiye liposarkom *** (16-30)	53,3	90,9	68,2	83,3	36,7	87,5	43,8	15	65	20
Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (7-8)	75	85,7	71,4	85,7	14,7			14,3	85,7	0
Düşük dereceli fibromikzoid sarkom (2-3)	100	100	33,3	0	0			50	50	0
Ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom (3-6)	100	100	33,3	66,7	0			66,7	33,3	0
Epiteloid hemanjiyotelyoma (4-6)	50	50	25	60	0			25	75	0
Epiteloid sarkom (11-19)	42,1	77,8	16,7	81,8	27,3			27,3	63,6	9,1
Ewing sarkom (4-6)	0	75	0	66,7	16,7			0	100	0
Ewing benzeri sarkom (3-5)	0	100	100	100	60			0	100	66,3
Fibrosarkomatöz dermatofibrosarkoma protuberans (3-4)	25	66,7	0	66,7	33,3			33,3	66,7	0
Leiomyosarkom (11-80)	53,3	80	45	78,2	43,6	72,7	36,4	19,7	69	11,3
Malign periferik sinir kılıfı tümörü (17-22)	81,8	47,6	28,6	100	54,5	100	41,2	30	70	0
Mikzofibrosarkom (8-10)	40	90	0	88,9	66,7			12,5	87,5	0
Mikzoid liposarkom (15-21)	42,1	76,2	57,1	80	15	86,7	60	6,3	87,5	6,3
Myoepitelyal karsinom (1)	100	100	100	100	100			0	100	0
Pleomorfik liposarkom (5)	40	100	100	100	20			0	80	20
Rabdomyosarkom (12-15)	93,3	85,7	42,9	60	26,7			58,3	41,7	0
Sinovyal sarkom (22-50)	50	94	64,6	82,6	34,8	95,5	40,9	13,6	75	11,4
Sklerozan epiteloid fibrosarkom (1-5)	20	0	0	100	0			0	100	0
Şeffaf hücreli sarkom (2-4)	100	100	0	100	25	100	25	50	50	0

\* EMT-TF ile herhangi bir yaygınlıkta ekspresyon gösteren olguların prevalans yüzdeleri temsil etmektedir. Bu sütunda temsil edilen oranlar literatürdeki immünohistokimyasal çalışmalarda gözlenen değerlere benzerdir. <sup>17</sup>

\*\* EMT-TF ile %80'in üzerinde ekspresyon gösteren (bu çalışmada pozitif olarak değerlendirilen) olguların prevalans yüzdeleri temsil etmektedir.

\*\*\* Dediferansiye liposarkom grubunun içinde hem diferansiye ve dediferansiye alanları bir arada değerlendirilen olgular hem de bu değerlendirmeye alınamamış vakalar temsil edilmektedir. Bu tablodaki istatistiksel analizlerde, diferansiye-dediferansiye karşılaştırması yapılan olguların sadece dediferansiye odakları kullanılmıştır.

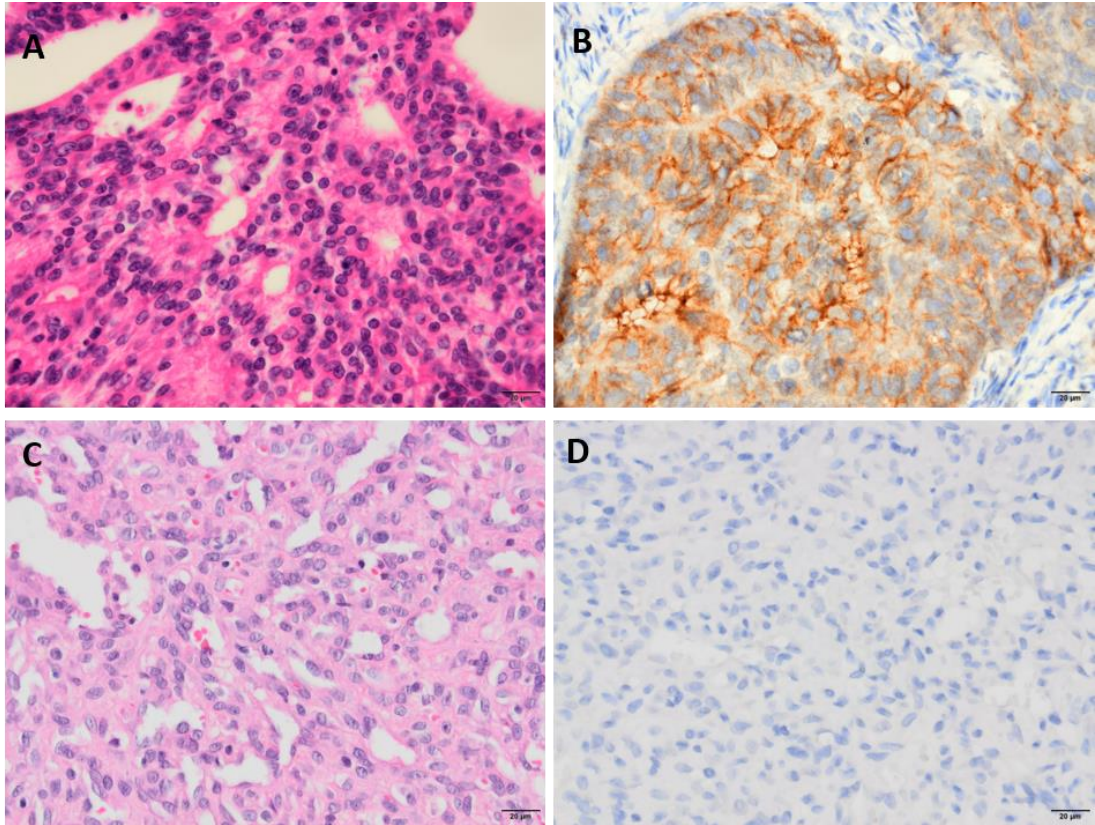
#### 4.1. Karsinomlarda EMT Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerin Ekspresyonu

Tüm karsinom olgularında E-kaderin (n=21) ekspresyonu saptanmıştır. SLUG ekspresyonu karsinomların %73,9'unda saptanmıştır. İncelenen her iki ürotelyal karsinom olgusu negatif bulunmuştur.

TWIST1 ekspresyonunun prevalansı %34,8 olarak saptanmıştır.

P-kaderin ekspresyonu olguların %60'ında görülmüştür. Akciğerin skuamöz hücreli karsinomu olgularının tümünde ekspresyon izlenirken (n=3) küçük hücreli karsinom olgularında ekspresyon saptanmamıştır (n=2). (Şekil 4)

PARAXIS (TCF15) ekspresyonu gösteren tek olgu küçük hücreli karsinom histolojisindedir.



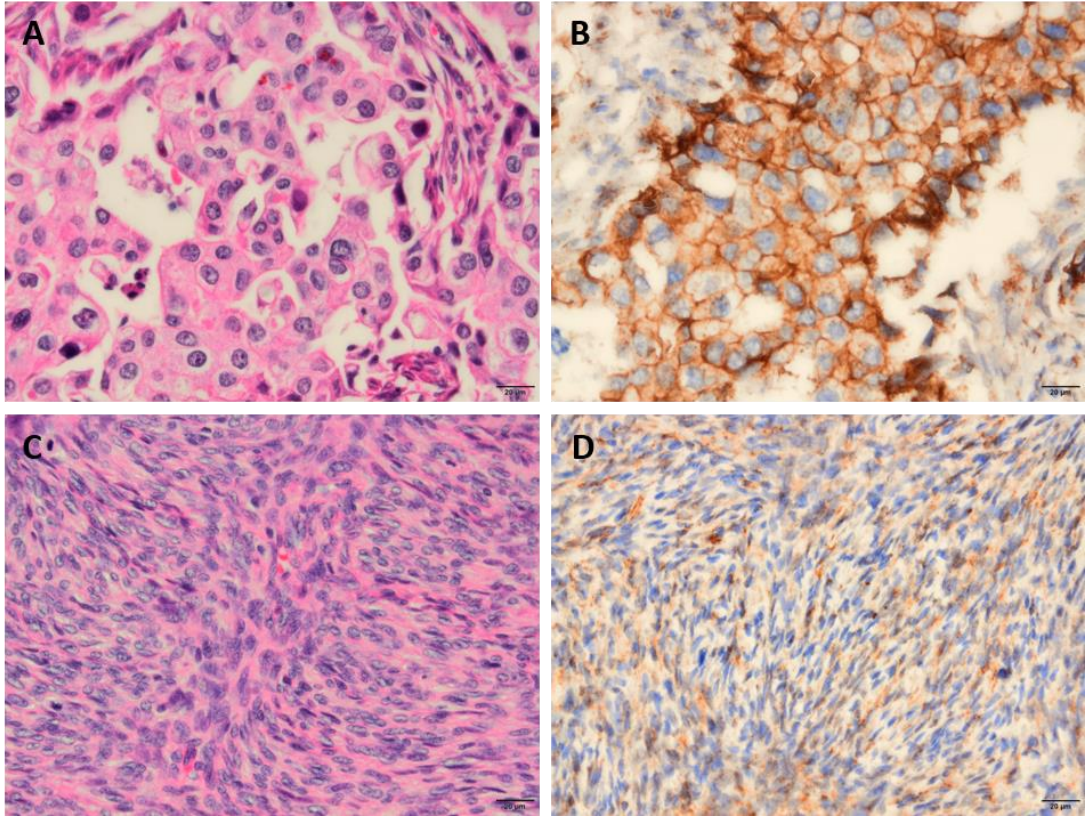
**Şekil 4.** P-kaderin. Karsinom olgularında (özellikle malign) mezenkimal tümörlere kıyasla ekspresyon prevalansı yüksek bulunmuştur. P-kaderin ile membranöz immünohistokimyasal reaksiyon veren endometrium adenokarsinomu olgusu (A,B) ve boyanma göstermeyen epitelooid hemanjoendotelyoma olgusu (C,D).



ALDH1 olguların %52,6'sında pozitiftir. Prostatik adenokarsinom (n=1) ve küçük hücreli karsinomlarda (n=2) pozitifliğe rastlanmazken mide adenokarsinomlarında %100 ekspresyon mevcuttur (n=2).

Beta-katenin ile olguların hiçbirinde nükleer ekspresyon görülmemiştir (n=24). Olguların çok büyük kısmında (%95,8) membranöz beta-katenin ekspresyonu gözlenmiştir, membranöz beta-katenin ekspresyonunun saptanmadığı tek olgu ürotelyal karsinom histolojisindedir. (Şekil 5) Ayırıcı tanıda önemli olabilecek nokta:

- P-kaderin ve membranöz beta-katenin karsinomlardaki prevalansı (sırasıyla %60 ve 95,8) mezenkimal tümörlere kıyasla (sırasıyla %8,6 ve %22,7) yüksektir (p=0.00).



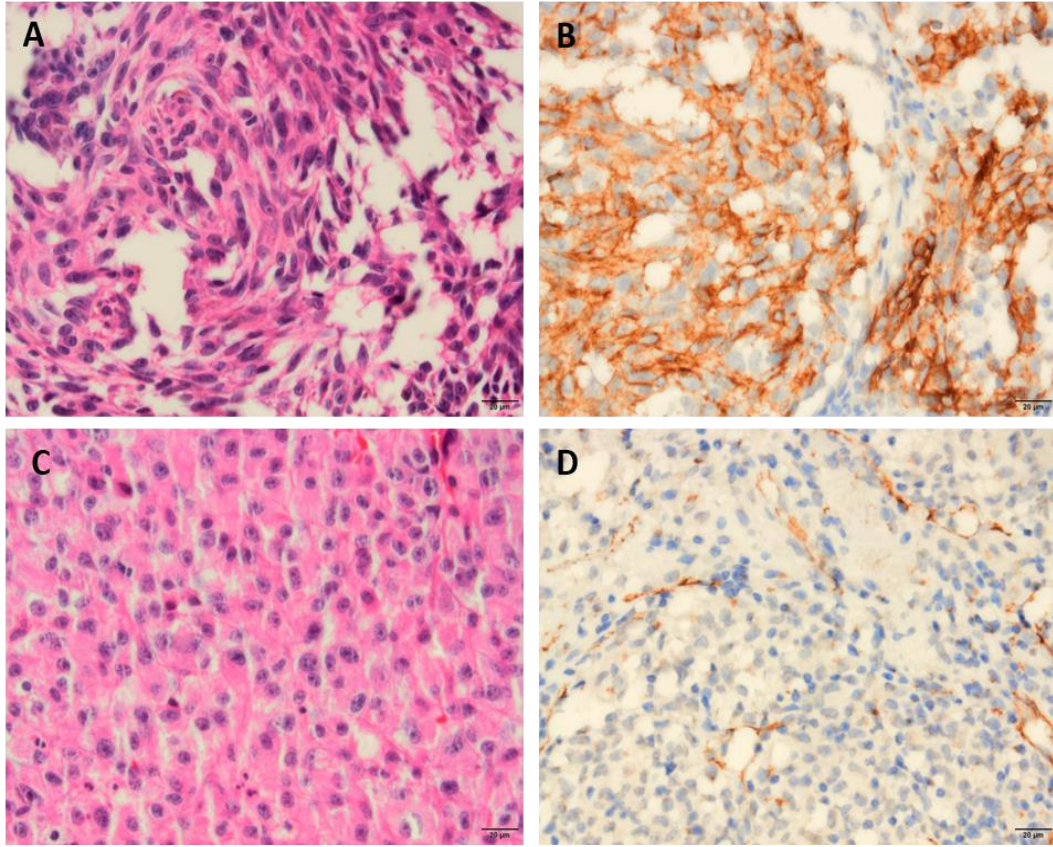
**Şekil 5.** Beta-katenin. Karsinom olgularında mezenkimal tümörlere kıyasla membranöz ekspresyon prevalansı yüksek bulunmuştur. Beta-katenin ile membranöz immünohistokimyasal reaksiyon veren akciğer adenokarsinomu olgusu (A,B) ve özgün olmayan sitoplazmik boyanma gösteren fibrosarkomatöz DFSP olgusu (C,D).



#### 4.2. Malign Melanomlarda EMT Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerin Ekspresyonu

Malign melanomlarda E-kaderin (%92,9), membranöz beta-katenin (%95,8) ile ekspresyon prevalansı yüksek bulunmuştur; ALDH1 (%40), TWIST (%34,8), SLUG (%28,6), TCF15 (%28,6) ve P-kaderin (%6,3) ile düşüktür. Nükleer beta-katenin ekspresyonu gözlenmemiştir (n=16). (Şekil 6) Ayırıcı tanıda önemli olabilecek noktalar;

- Malign melanomda membranöz beta-katenin (%95,8) pozitivitesi sarkomlara kıyasla (%26,2) yüksek bulunmuştur. (p=0.00)



**Şekil 6:** Beta-katenin. Malign melanom olgularında mezenkimal tümörlere kıyasla ekspresyon prevalansı yüksek bulunmuştur. Beta-katenin ile membranöz pozitif malign melanom (A,B) ve özgül olmayan sitoplazmik boyanma gösteren alveolar soft part sarkom olgusu (C,D).

### 4.3. Mezenkimal Tümörlerde EMT Belirteçlerinin Ekspresyonu

#### 4.3.1. SLUG

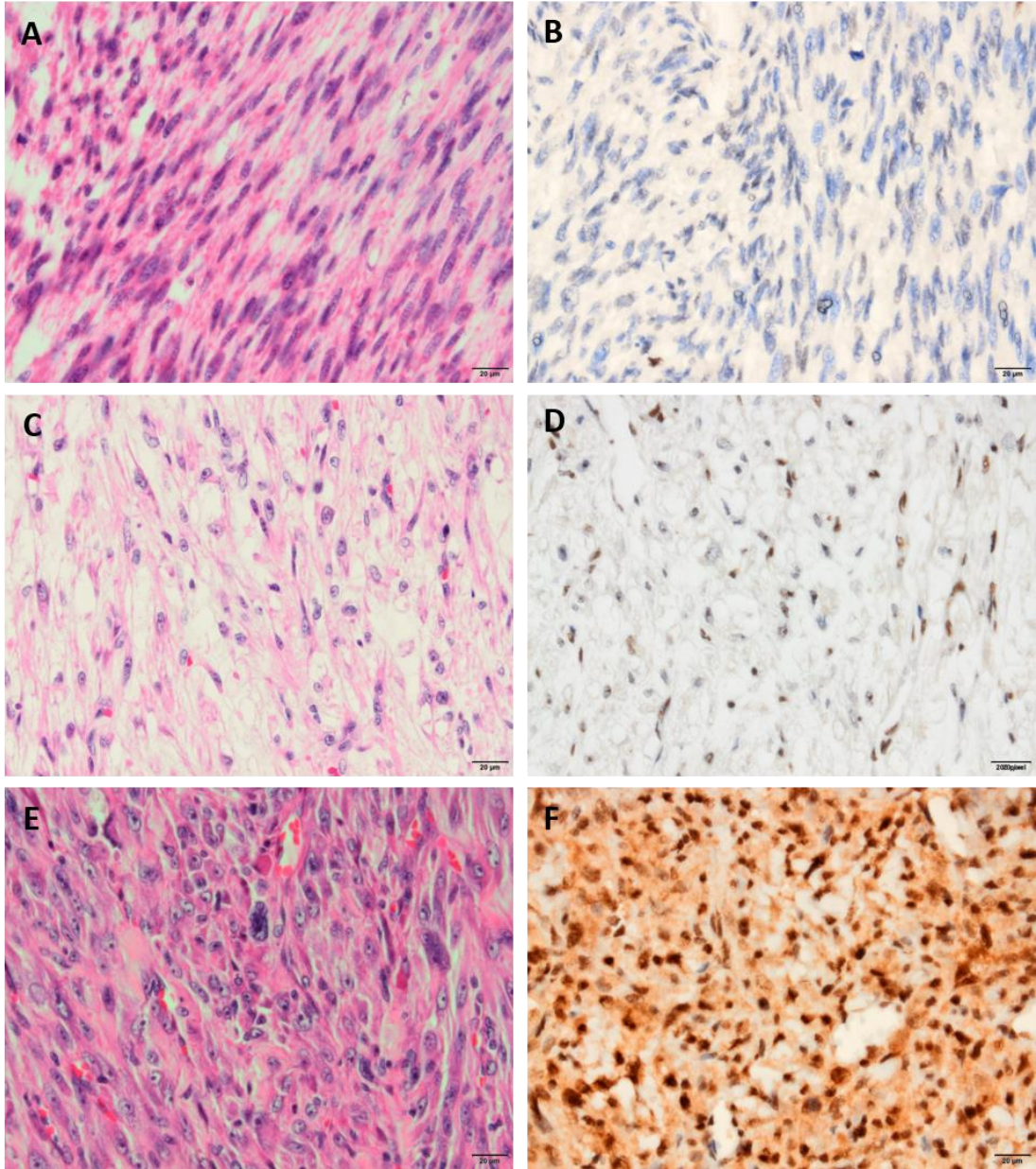
Mezenkimal tümörlerde ekspresyon prevalansı %46,8 olup benign tümörlerde %55,3, lokal agresiflerde %43,5, metastaz yapabilen ara davranışlı tümörlerde %54,8 ve malign tümörlerde %44,7'dir.

Benign tümörlerden anjiomyofibroblastom (n=1), dermatofibrom (n=6), hemanjiom (n=6), leiomyom (n=2), mikzoma (n=3) ve yüzeysel fibromatozis (n=2); malign tümörlerden Ewing-benzeri sarkom (n=3), myoepitelyal karsinom (n=1) ve pleomorfik liposarkom (n=5) olgularının tümünde ekspresyon izlenmiştir. Ayrıca benign tümörlerden myofibrom (%80); ara davranışlı tümörlerden anjiomatoid fibröz histiyositom (%90), Kaposi sarkomu (%80) ve soliter fibröz tümör (%55,6); malign tümörlerden andiferansiye pleomorfik sarkom (%68,2), desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (%71,4) ve sinovyal sarkomda (%64,6) da ekspresyon prevalansı rölatif olarak yüksektir.

Nörofibrom (n=5), Schwannom (n=10), agresif anjiomikzom (n=1), atipik fibroksantom (n=1), DFSP (n=4), parakordoma (n=4), alveoler soft part sarkom (n=3), Ewing sarkom (n=4), fibrosarkomatöz DFSP (n=3), sklerozan epiteloid fibrosarkom (n=1) ve şeffaf hücreli sarkom (n=2) olgularının tümü negatif olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 7)

Ayırıcı tanıda önemli olabilecek noktalar;

- Dediferansiye liposarkomlarda (%68,2) ve mikzoid liposarkomda (%57,1) SLUG ekspresyonunun prevalansı mikzofibrosarkomlara (%0) kıyasla yüksek bulunmuştur (p=0,00).
- Ewing-benzeri sarkomlar (%100) ve az diferansiye sinovyal sarkomlarda (%91,2) SLUG ekspresyonunun prevalansı Ewing sarkomuna (%0) kıyasla yüksektir (p=0,03).



**Şekil 7.** SLUG (SNAI2). Mezenkimal tümörlerde ekspresyonu değişken yaygınlıkta olabilmektedir. Resimlerde total ekspresyon kaybı gösteren bir leiomyosarkom olgusu (A,B) ile parsiyel kayıp gösteren bir mikzofibrosarkom olgusu (C,D) temsil edilmektedir. Her iki ekspresyon paterni negatif olarak sınıflandırılmıştır. Dediferansiye liposarkom olgularında (E,F) neoplastik hücrelerde sıklıkla >%80 oranında boyanma gözlenmiştir (pozitif reaksiyon).

### 4.3.2. TWIST1

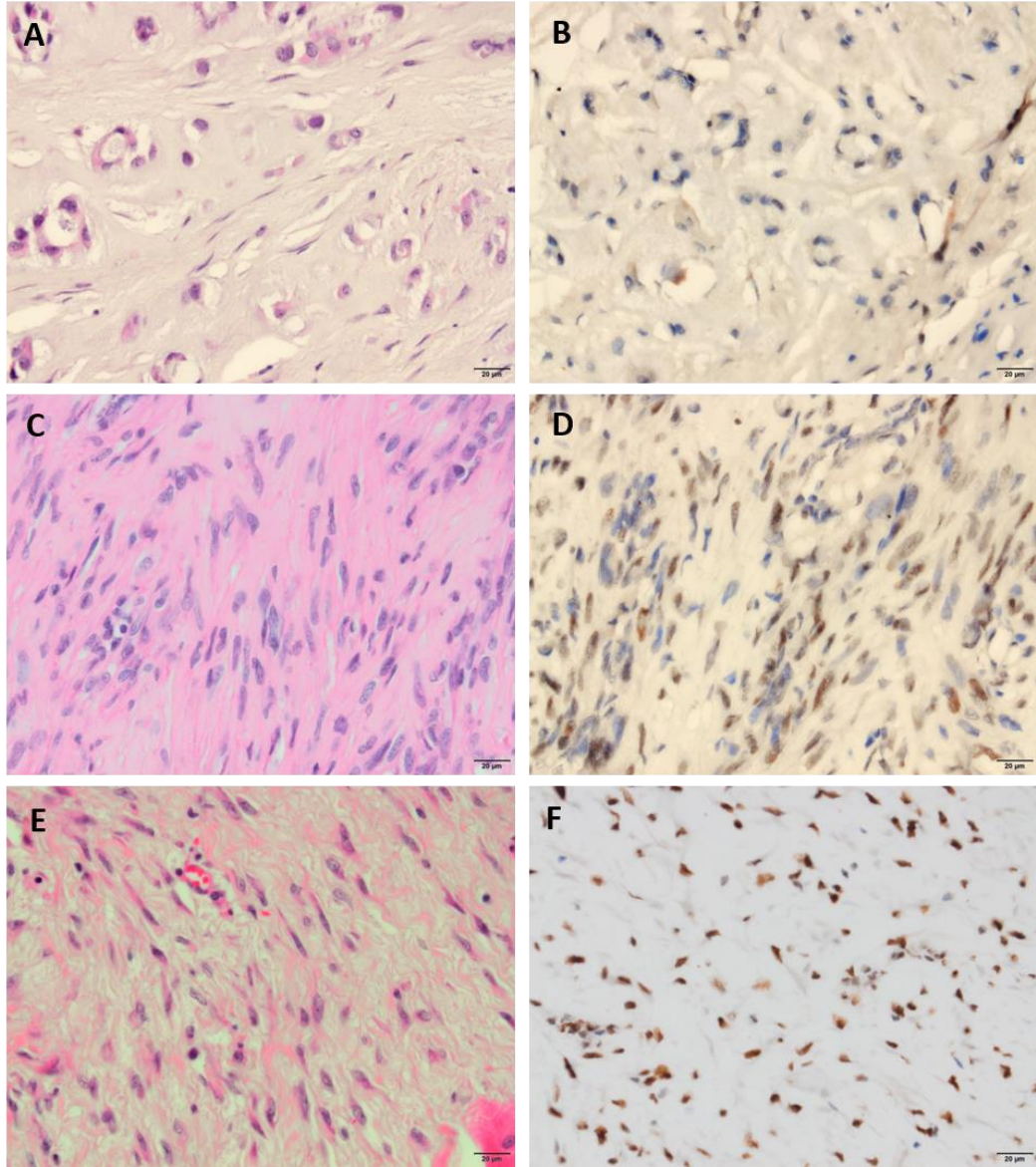
Mezenkimal tümörlerde ekspresyonunun prevalansı %37,4 olarak saptanmıştır. Benign tümörlerdeki prevalansı %22,6, lokal agresif ara davranışlı tümörlerde %50, nadiren metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde %20 ve malign tümörlerde %36,8'dir.

Benign tümörlerden anjiomyofibroblastom (n=1), nadiren metastaz yapan ara davranışlı tümörlerden atipik fibroksantom (n=1) ve malign tümörlerden myoepitelyal karsinom (n=1) olgularında ekspresyon mevcuttur. Ayrıca benign tümörlerden dermatofibromlarda (%83,3); ara davranışlı tümörlerden desmoid fibromatozis (%83,3), DFSP (%75) ve Kaposi sarkomunda (%60); malign tümörlerden alveoler soft part sarkom (%66,7), Ewing-benzeri sarkom (%60), MPNST (%54,5) ve mikzofibrosarkomlarda da (%66,4) ekspresyon prevalansı yüksektir. (Şekil 8)

Ayırıcı tanıda önemli olabilecek noktalar;

- Desmoid fibromatoziste TWIST1 ekspresyonu (%83,3) monofazik sinovyal sarkoma kıyasla (%28,6) yüksektir (p=0,01).
- Mikzoid liposarkomda TWIST1 ekspresyonu (%15) mikzofibrosarkoma kıyasla (%66,4) düşüktür (p=0,00).



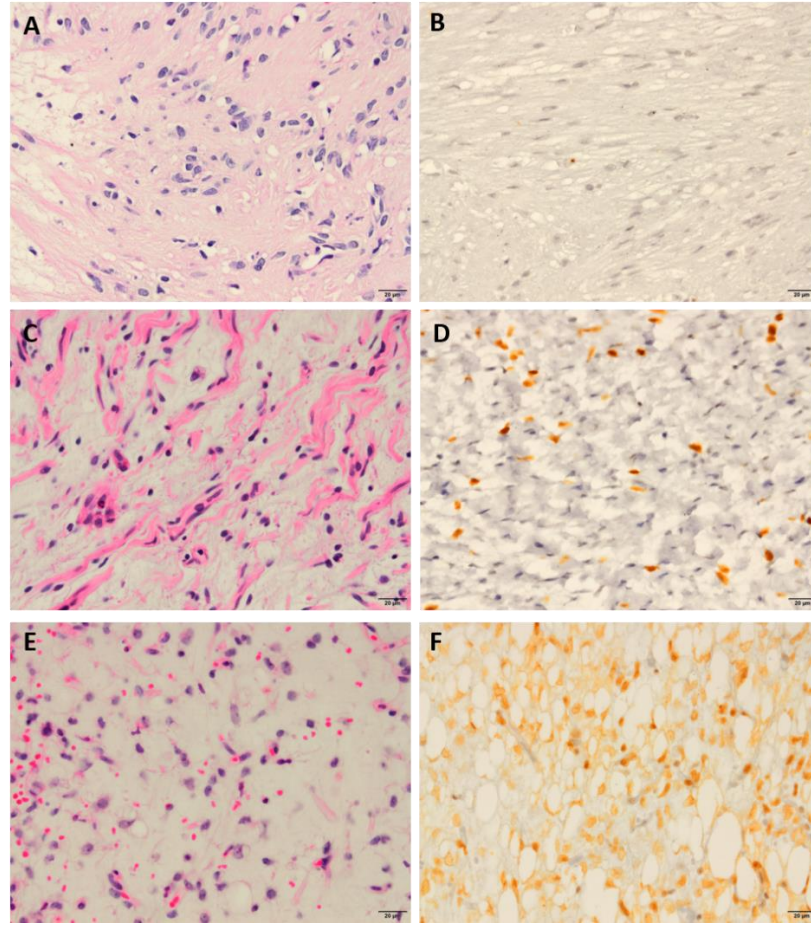


**Şekil 8:** TWIST1. Mezenkimal tümörlerde ekspresyonu değişken yaygınlıkta olabilmektedir. Resimlerde total ekspresyon kaybı gösteren bir parakordoma olgusu (A,B) ile parsiyel kayıp gösteren bir monofazik sinovyal sarkom olgusu (C,D) temsil edilmektedir. Her iki ekspresyon paterni negatif olarak sınıflandırılmıştır. Desmoid fibromatoziste (E,F) neoplastik hücrelerde sıklıkla  $> \%80$  oranında boyanma gözlenmiştir (pozitif reaksiyon).

### 4.3.3. ZEB1

Sınırlı bir grup vakada incelenmiştir. Mezenkimal tümörlerde ekspresyon prevalansı %35,2'dir. ZEB1 ile değerlendirilen olgular ya benign tümörler ya da sarkomlar kategorisindedir, ara davranışlı tümörler değerlendirilememiştir.

Sarkomlardaki ekspresyon prevalansı (%43,5) benign tümörlere kıyasla (%4,3) yüksektir ( $p=0,00$ ). Mikzoid liposarkomlarda ekspresyonun (%60) yüksek olduğu dikkati çekmektedir. (Şekil 9)



**Şekil 9.** ZEB1. Mezenkimal tümörlerde ekspresyonu değişken yaygınlıkta olabilmektedir. Resimlerde total ekspresyon kaybı gösteren bir Schwannom olgusu (A,B) ile parsiyel kayıp gösteren bir pleksiform nörofibrom olgusu (C,D) temsil edilmektedir. Her iki ekspresyon paterni negatif olarak sınıflandırılmıştır. Mikzoid liposarkomlarda (E,F) neoplastik hücrelerde sıklıkla  $>\%80$  oranında boyanma gözlenmiştir (pozitif reaksiyon).

#### 4.3.4. E-kaderin

Mezenkimal tümörlerin yarıya yakınında ekspresyon izlenmiştir, ekspresyon daha sıktır (%51,8). Benign tümörlerde prevalans %46,9, nadiren metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde %52,8, malignlerde ise %57,9 olarak kaydedilmiştir. Lokal agresif ara davranışlı tümörlerde prevalans diğer gruplara kıyasla düşüktür (%9,1, p=0.00).

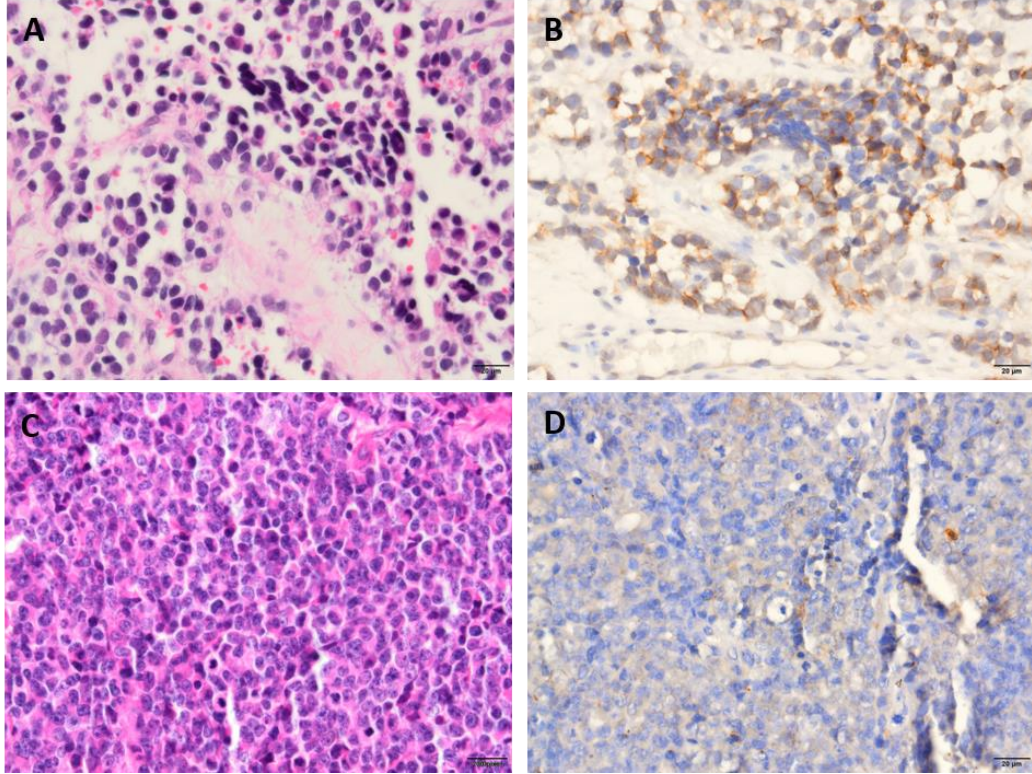
Benign tümörlerden EBV-ilişkili düz kas tümörü (n=4), hibrit schwannom-perinörom (n=3) ve myofibroblastom (n=1) olgularında negatif bulunmuştur. Lokal agresif grupta sadece bir desmoid fibromatozis olgusunda pozitiflik izlenmiş olup bunun dışındaki tüm olgular negatif olarak değerlendirilmiştir (n=11). Anjiomatoid fibröz histiyositomlarda (%14,3) prevalans düşüktür, tüm dermatofibrosarkoma protuberans (DFSP) olguları (n=4) negatiftir. Malign grup içerisinde alveoler soft part sarkom (n=3), Ewing sarkom (n=6) ve Ewing benzeri sarkom (n=5) olgularının tümü E-kaderin negatif olarak değerlendirilmiştir. Epiteloid sarkom (%42,1), mikzoid liposarkom (%42,1), pleomorfik liposarkom (%40), mikzofibrosarkom (%40), fibrosarkomatöz DFSP (%25), anjiosarkom (%20) ve sklerozan epiteloid fibrosarkomda (%20) prevalans düşüktür.

Nörofibrom (n=3), anjiomyofibroblastom (n=1), atipik fibroksantom (n=1), düşük dereceli fibromikzoid sarkom (n=3), ekstraskletal mikzoid kondrosarkom (n=3), myoepitelyal karsinom (n=1) ve şeffaf hücreli sarkom (n=2) olgularının tümü pozitif olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 10)

Ayırıcı tanıda faydalı olabilecek noktalar;

- Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörde E-kaderin ekspresyonu %75 oranında izlenirken Ewing sarkomda ekspresyon saptanmamıştır (p=0,01).
- Alveoler rabdomyosarkomda E-kaderin ekspresyonu %100 iken Ewing sarkomda %0'dır (p=0,00).





**Şekil 10.** E-kaderin. Neoplastik hücre sınırlarındaki komplet veya inkomplet çizgisel boyanmalar pozitif olarak değerlendirilmiştir. E-kaderin ekspresyonu gösteren bir alveoler rabdomyosarkom olgusu (A,B) ile negatif bir Ewing sarkom olgusu (C,D).

#### 4.3.5. Mezenkimal Tümörler ve MET profilleri

##### 4.3.5.1. Mezenkimal Tümörler ve METHigh

Mezenkimal tümörlerin %19'u MET<sup>high</sup> profili sergilemektedir. Benign tümörlerde %11,6, nadir metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde %22,2 ve malign tümörlerde %20,1 olarak saptanmıştır. MET<sup>high</sup> profiline sahip lokal agresif tümör yoktur (n=7). Parakordoma (%75), ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom (%66,7) ve rabdomyosarkomlarda (%58,3) prevalansı rölatif olarak yüksek bulunmuştur. Benign tümörlerden nörofibrom, schwannom ve myofibrom olgularında saptanmış olmasına karşın prevalansları düşüktür ( $\leq$ %50).



#### 4.3.5.2. Mezenkimal Tümörler ve MET<sup>low</sup>

Mezenkimal tümörlerin büyük kısmı MET<sup>low</sup> profili sergilemektedir (%71,1). Benign tümörlerde %83,7, lokal agresiflerde %57,1, nadir metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde %66,7 ve malign tümörlerde %70,5 oranında saptanmıştır. Desmoid fibromatozis (%25), parakordoma (%25), rabdomyosarkom (%41,7) ve ekstrasketal mikzoid kondrosarkom (%33,3) olgularında prevalansı görece düşüktür.

#### 4.3.5.3. Mezenkimal Tümörler ve MET<sup>neg</sup>

Mezenkimal tümörlerde nadir olarak MET<sup>neg</sup> profili gözlenmektedir (%9,8). Benign tümörlerde %4,7, lokal agresiflerde %42,9, nadir metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde %11,1 ve malign tümörlerde %9,4 oranında saptanmıştır. Desmoid fibromatoziste (%75) ve Ewing-benzeri sarkomlarda prevalansı görece yüksektir (%66,3). Benign tümörler içinde görüldüğü tek olgu dermatofibrom histolojisindedir (%16,7).

Lokal agresif tümörlerde MET<sup>neg</sup> prevalansı (%42,9), diğer yumuşak doku tümörlerindeki kıyasla (%8,3) yüksek bulunmuştur (p=0,02). Lokal agresif grupta MET<sup>neg</sup> bulunan vakaların tümünün desmoid fibromatozis histolojisinde olduğu dikkati çekmektedir (n=3).

**Tablo 6.** Tüm mezenkimal tümörlerin diğer belirteçlerle ekspresyon oranları

TANI (n)	P-kaderin	TCF15	ALDH1	Beta-katenin (nükleer)	Beta-katenin (membranöz)
<b>Karsinomlar (19-25)</b>	<b>60</b>	<b>4,8</b>	<b>52,6</b>	<b>0</b>	<b>95,8</b>
<b>Malign melanomlar (14-16)</b>	<b>6,3</b>	<b>28,6</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>81,3</b>
<b>Mezenkimal Tümörler (382-403)</b>	<b>8,9</b>	<b>13,4</b>	<b>33,5</b>	<b>4,4</b>	<b>23,2</b>
<b>Benign (37-52)</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>56</b>	<b>0</b>	<b>10,8</b>
Anjiomyofibroblastom (1)	0	100	100		
Dermatofibrom (6)	0	50	100		
EBV ilişkili düz kas tümörü (4)	0	0	0	0	0
Hemanjiom (3-6)	0	66,7	16,7	0	100
Hibrit schwannom - perinörom (3)	0	66,7	100	0	0
Leiomyom (2)	0	0	50	0	50
Mikzoma (1-2)	0	0	50	0	0
Myofibroblastom (1)			100		
Myofibrom (5-6)	0	16,7	16,7	0	0
Nörofibrom (3-10)	0	0	66,7	0	0
Schwannom (7-10)	0	20	100	0	0
Yüzeysel fibromatozis (1-6)	0	0	16,7	0	0
<b>İntermedier - lokal agresif (5-23)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>0</b>
Agresif anjiomikzom (1)	0				
Desmoid fibromatozis (4-11)	0	0	50	100	0
Atipik lipomatöz tümör/iyi diferansiye liposarkom (1-11)	0	0	0	0	0
<b>İntermedier - nadir metastaz yapan (36-43)</b>	<b>2,4</b>	<b>9,3</b>	<b>58,5</b>	<b>5,1</b>	<b>15,4</b>
Atipik fibrosantom (1)	0	0	0	0	100
Anjiomatoid fibröz histiyositom (8-10)	12,5	10	88,9	0	25
Dermatofibrosarkoma protuberans (3-5)	0	0	0	0	0
Kaposi sarkomu (4-5)	0	0	50	0	40
Parakordoma (3-4)	0	0	0	0	25
Soliter fibröz tümör (18-20)	0	15	70	11,1	0
<b>Malign (85-305)</b>	<b>11,6</b>	<b>12,8</b>	<b>26</b>	<b>3</b>	<b>26,2</b>
Alveolar soft part sarkom (3)	0	0	33,3	0	33,3
Andiferansiye pleomorfik sarkom (9-11)	11,1	10	40	0	18,2
Anjiosarkom (2-7)	0	14,3	0	0	0
Dediferansiye liposarkom* (27-31)	3,2	25	27,6	3,7	3,7
Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (7)	0	0	57,1	0	85,7
Düşük dereceli fibromikzoid sarkom (1-4)	0	0	0	0	0
Ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom (3)	0	33,3	0	66,7	33,3
Epiteloid hemanjiyoendotelyoma (3-5)	0	0	40	0	60
Epiteloid sarkom (15-18)	33,3	22,2	40	0	31,3
Ewing sarkom (4-6)	0	0	25	0	66,7
Ewing benzeri sarkom (3-5)	0	66,7	0	0	60
Fibrosarkomatöz dermatofibrosarkoma protuberans (3-4)	0	0	0	0	0
Leiomyosarkom (76-83)	17,1	13,4	20	1,2	20,5
Malign periferik sinir kılıfı tümörü (21-23)	9,1	8,7	59,1	0	19
Mikzofibrosarkom (6-10)	0	0	22,2	20	0
Mikzoid liposarkom (17-21)	0	10,5	61,1	0	0
Myoepitelyal karsinom (1)		0	100	100	100
Pleomorfik liposarkom (5)	0	20	20	0	0
Rabdomyosarkom (13-16)	18,8	7,1	7,7	0	68,8
Sinovyal sarkom (47-49)	12,2	8,3	8,2	4,3	31,9
Sklerozan epiteloid fibrosarkom (1-2)	0	0		0	0
Şeffaf hücreli sarkom (2-4)	50	33,3	0	0	100

\* Dediferansiye liposarkom grubunun içinde hem diferansiye ve dediferansiye alanları bir arada değerlendirilen olgular hem de söz konusu değerlendirmeye alınmamış vakalar temsil edilmektedir. Bu tablodaki istatistiksel analizlerde, diferansiye-dediferansiye karşılaştırması yapılan olguların sadece dediferansiye odakları kullanılmıştır.

#### 4.4. Mezenkimal Tümörler ve Beta-Katenin

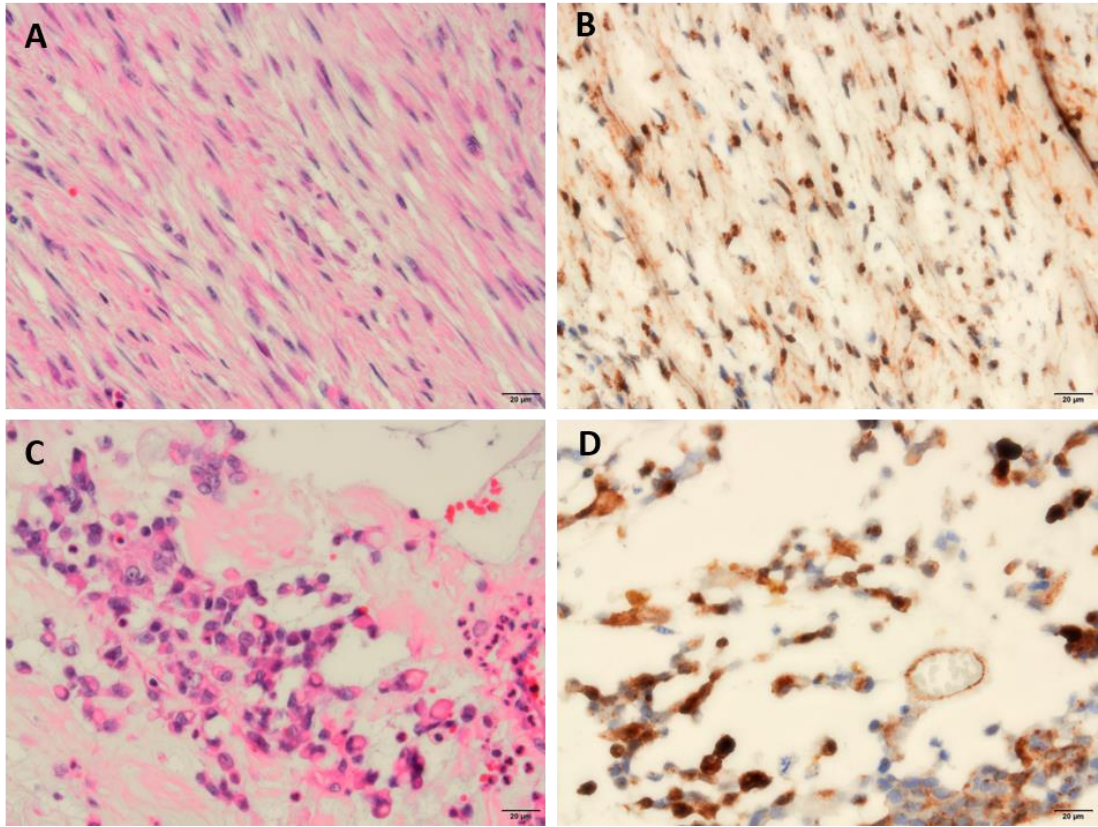
##### 4.4.1. Nükleer Beta-katenin Ekspresyonu

Nükleer beta-katenin ekspresyonu incelenen tüm olgular içerisinde toplam 17 vakada saptanmış olup prevalansı oldukça düşüktür (%4,4). Prevalans malign tümörlerde %3, nadiren metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde %5,1 olup lokal agresif ara davranışlı tümörlerde %40'a yükselmektedir. Benign tümörlerde ekspresyon izlenmemiştir.

Lokal agresif tümör grubunda sadece desmoid fibromatoziste ve bu tanıyı almış olguların tümünde nükleer ekspresyon izlenmiştir (n=6). İncelenen iki ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom olgusunda (%66,7) mevcuttur (n=3). Serideki tek myoepitelyal karsinom olgusunda hem membranöz hem nükleer ekspresyon dikkati çekmiştir. Pozitif saptandığı diğer antitelerde (Tablo 7) ekspresyon oranı %50'den küçüktür. (Şekil 11)

**Tablo 7.** Mezenkimal Tümörlerde Nükleer Beta-Katenin Ekspresyonu

<b>Nükleer Beta-Katenin Ekspresyonu İzlenen Tümörler</b>
<b>Ara Davranışlı</b>
Desmoid fibromatozis
Soliter fibröz tümör
<b>Malign</b>
Dediferansiye liposarkom
Ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom
Leiomyosarkom
Mikzofibrosarkom
Myoepitelyal karsinom
Sinovyal sarkom



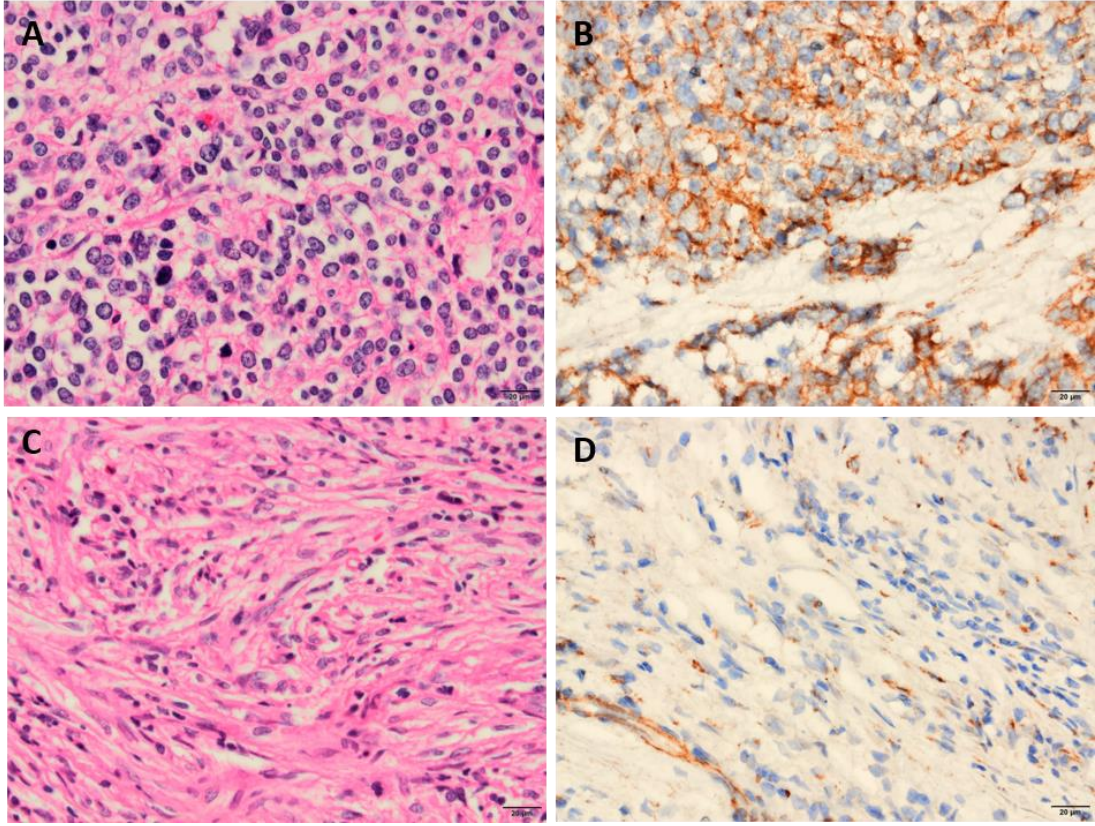
**Şekil 11.** Beta-katenin. Neoplastik hücrelerde nükleer boyanma gözlenen olgularda sıklıkla paranükleer damlacık tarzı yoğun sitoplazmik boyanmalar da eşlik etmektedir. Nükleer beta-katenin ekspresyonu gösteren desmoid fibromatozis (A,B) ve myoepitelyal karsinom olgusu (C,D).

#### 4.4.2. Membranöz Beta-katenin Ekspresyonu

Mezenkimal tümör olgularında membranöz beta-katenin ekspresyonunun prevalansı düşüktür (%23,2). Prevalanslar benign tümörlerde %10,8; nadiren metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde %15,4 ve malignlerde %26,2 olarak gözlenmiştir. Lokal agresif grupta membranöz beta-katenin ekspresyonu izlenmemiştir (n=15).

Benign tümörler arasında hemanjiomların tümünde (n=3) ve bir leiomyom olgusunda (n=2) pozitiflik saptanmıştır. Ara davranışlı tümör grubunda atipik fibroksantomda pozitif bulunmuştur (n=1). Malign tümörler arasında desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (%85,7), rabdomyosarkom (%68,8) ve Ewing sarkomda (%66,7) yüksek oranda

ekspresyon mevcuttur. Serideki tek myoepitelyal karsinom olgusu hem membranöz hem nükleer ekspresyon göstermektedir. (Şekil 12)



**Şekil 12.** Beta-katenin. Neoplastik hücrelerde sitoplazmik sınırların en az üçte ikisini belirginleştiren, nükleus ve membran arasındaki mesafenin ayırt edilebildiği boyanmalar pozitif kabul edilmiştir. Membranöz beta-katenin ekspresyonu gösteren desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör (A,B) olgusu ile özgün olmayan sitoplazmik boyanma gözlenen myofibrom olgusu (C,D). Endotel hücrelerinde membranöz boyanmalarla sıklıkla karşılaşılmıştır.

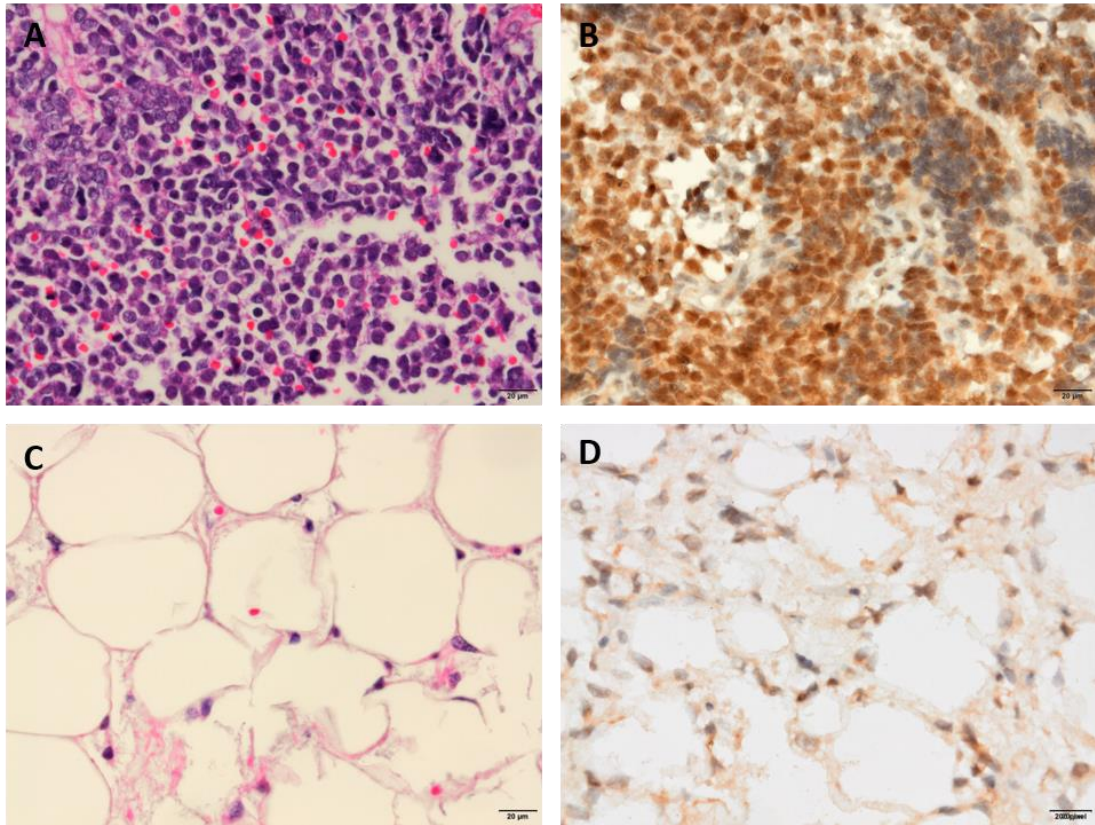
#### 4.5. Mezenkimal Tümörler ve TCF15 (PARAXIS)

Mezenkimal tümör ekspresyon prevalansı düşük bulunmuştur (%13,4). Benign yumuşak doku tümörlerinde TCF15'in prevalansı diğer yumuşak doku tümörlerine kıyasla yüksektir (%25, p=0,02). Prevalans nadir metastaz yapan ara davranışlı yumuşak doku tümörlerinde %9,3, malignlerde %12,8 olarak



saptanmıştır. Lokal agresif olguların tümü negatif olarak değerlendirilmiştir (n=18).

Benign tümörlerden hemanjiomlarda prevalans rölatif olarak yüksektir (%66,7). Dermatofibrom olgularının yarısında ekspresyon gözlenmiştir. İncelenen üç hibrit schwannom-perinörom olgusunun ikisinde ve bir anjiomyofibroblastom olgusunda da ekspresyon mevcuttur. Malign tümörler içerisinde üç Ewing-benzeri sarkom olgusunun ikisinde pozitiflik gözlenmiştir. (Şekil 13)



**Şekil 13.** TCF15 (PARAXIS). Nükleer ekspresyon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ekspresyon gösteren bir Ewing-benzeri sarkom olgusu (A,B) ve negatif bir atipik lipomatöz tümör olgusu (C,D).

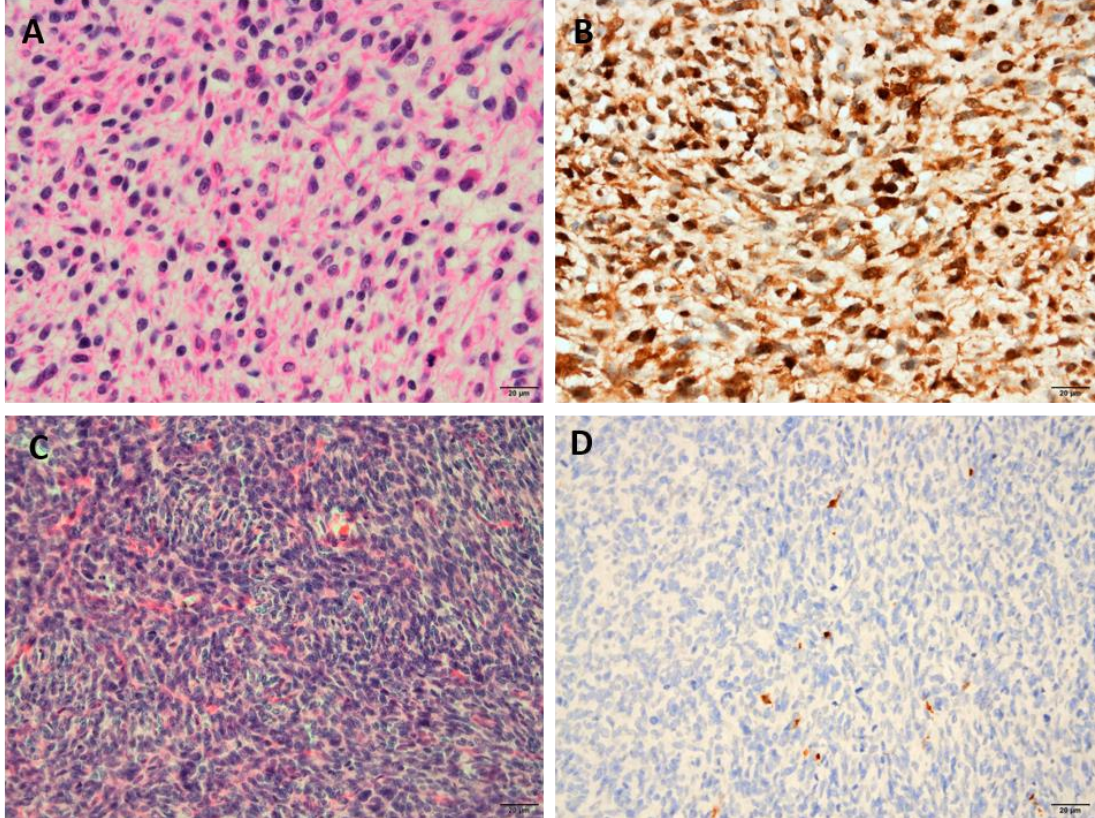
#### 4.6. Mezenkimal Tümörler ve ALDH1

Mezenkimal tümörlerin yaklaşık üçte birinde ekspresyon gözlenmiştir (%33,5). Prevalans benign tümörlerde %56 ve metastaz yapabilen davranışlı tümörlerde %58,5 olup yarıdan fazladır. Lokal agresif (%40) ve malign tümörlerde (%26) daha düşüktür.

Benign tümörler arasında tüm dermatofibrom (n=6) ve Schwannom (n=10) vakalarında ekspresyon gözlenmiştir. Metastaz yapabilen ara davranışlı tümörlerden anjiomatoid fibröz histiyositom (%88,7) ve soliter fibröz tümörde (%70); malign tümörlerden mikzoid liposarkom (%61,1), malign periferik sinir kılıfı tümörü (%59,1) ve desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörde (%57,1) prevalans yüksek bulunmuştur. (Şekil 14)

Ayırıcı tanıda faydalı olabilecek noktalar:

- Sinir kılıfı tümörlerinde ALDH1 ekspresyonun prevalansı (%73,7) diğer yumuşak doku tümörlerine (%27,9) kıyasla prevalansı yüksektir.
- Soliter fibröz tümörde ALDH1 ekspresyonun prevalansı %70 iken monofazik sinovyal sarkomda %9,5'tur (p=0,00).
- Malign periferik sinir kılıfı tümöründe ALDH1 ekspresyonun prevalansı %59,1 iken monofazik sinovyal sarkomda %9,5'tur (p=0,00).
- Mikzoid liposarkomda yaygın (neoplastik hücrelerin >%25'inde) ALDH1 ekspresyonun prevalansı %61,1 oranında görülürken, mikzofibrosarkomda %11,1'dir (p=0,02).

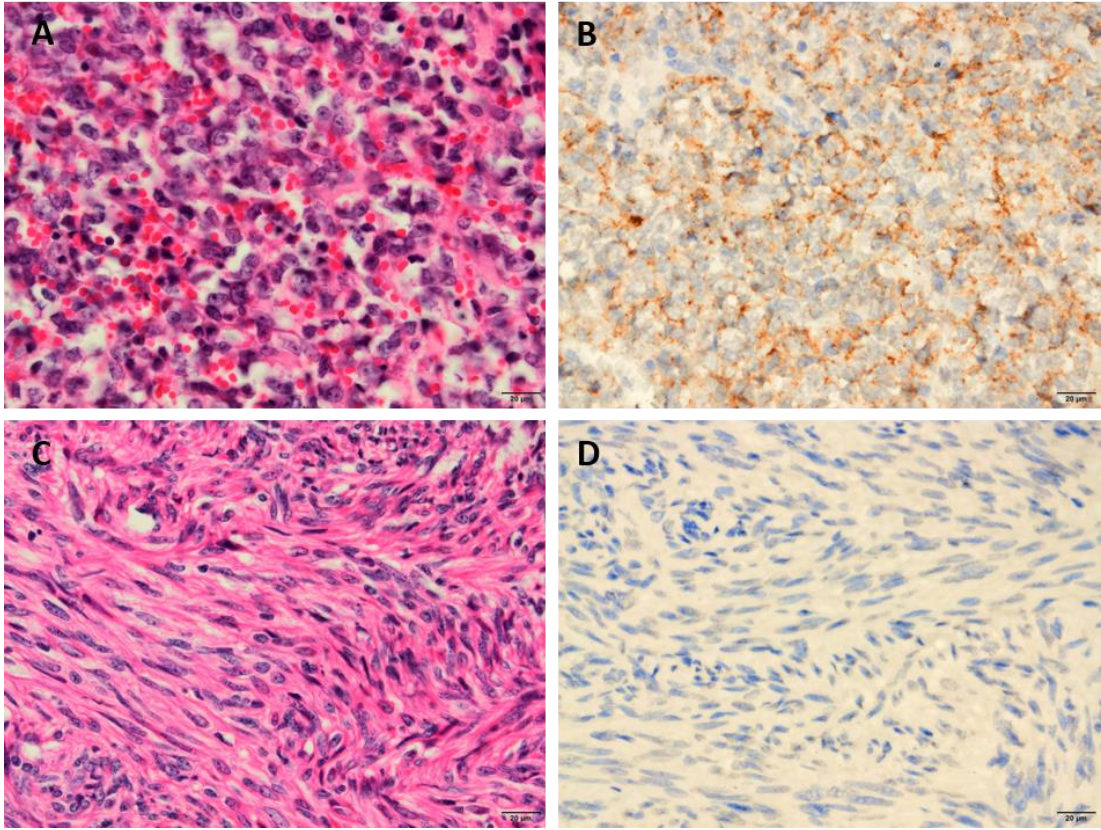


**Şekil 14.** ALDH1. Sitoplazmik ve nükleer ekspresyon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ekspresyon gösteren bir MPNST olgusu (A,B) ve negatif bir monofazik sinovyal sarkom olgusu (C,D). Mezenkimal tümörlerde sıklıkla neoplazma eşlik eden dendritik hücreleri belirginleştirmiştir.

#### **4.7. Mezenkimal Tümörler ve P-kaderin**

Mezenkimal tümörlerde ekspresyon prevalansı oldukça düşüktür (%8,9). Sarkomlarda P-kaderin pozitifliğinin prevalansı %11,6 iken diğer mezenkimal tümörlerde %0,9 bulunmuştur ( $p=0,00$ ). Sarkom kategorisinde olmayıp P-kaderin ekspresyonu saptanan tek olgu anjiomatoid fibröz histiyositom histolojisinde olup bu antite de metastaz potansiyeline sahip tümörler arasındadır. Ekspresyon prevalansının en yüksek bulunduğu tümör grubu epiteloid sarkomdur (%33,3). Benign ya da lokal agresif tümörlerde ekspresyon görülmemiştir. (Şekil 15)





**Şekil 15:** P-kaderin. Hücre sınırlarını komplet veya inkomplet belirginleştiren membranöz ekspresyon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ekspresyon gösteren bir epitelooid sarkom olgusu (A,B) ve negatif bir leiomyom olgusu (C,D).

**Tablo 8.** Mezenkimal Tümörlerde P-kaderin Ekspresyonu (n≥5)

P-kaderin Ekspresyonu Saptanan Mezenkimal Tümörler
<b>İntermedier/nadiren metastaz yapan</b>
Anjiomatoid Fibröz Histiyositom
<b>Malign</b>
Şeffaf hücreli sarkom
Dediferansiye liposarkom
Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör
Epitelooid sarkom
Leiomyosarkom
Malign periferik sinir kılıfı tümörü
Rabdomyosarkom
Sinovyal sarkom
Andiferansiye pleomorfik sarkom

#### **4.8. Lenf Nodu Metastazı Yapan Sarkomlarda Primer ve Metastaz Odaklarının EMT/MET Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerle Ekspresyonu**

Lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda immünohistokimyasal analizlerde antikorların ekspresyon yaygınlığı kantitatif olarak verilmiştir. Ayrıca bu olgular MET profilleri bakımından kategorik olarak (var/yok) da değerlendirilmiştir.

Bütün antikorlarla primer ve metastaz odaklarında ekspresyon yaygınlığı açısından fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). TWIST1 ekspresyonu için p değeri 0,066 olup eşik değere yakındır. Bu bulgu, örneklem sayısının daha geniş tutulabilmesi halinde metastaz odaklarında TWIST1 ekspresyonun anlamlı olarak daha yüksek bulunabileceğini de düşündürmektedir. (Tablo 9)

**Tablo 9.** Lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda EMT/MET belirteçleri ve diğer belirteçlerle ekspresyon yaygınlıklarının primer ve metastaz odaklarında karşılaştırılması

Analiz (n=7)	Ekspresyon (Pozitif olgu/n) Primer*	Ekspresyon (Pozitif olgu/n) Metastaz*	Medyan Primer	Medyan Metastaz	Çeyrekler arası (25.-75. persentil) dağılım aralığı Primer	Çeyrekler arası (25.-75. persentil) dağılım aralığı Metastaz	P
E-kaderin	7/7	6/7	0,02	0,19	0,19	0,05	0,138
SLUG	2/7	4/7	0,48	0,61	0,8	0,8	0,108
TWIST1	1/7	4/7	0,50	0,70	0,70	0,40	0,066
P-Kaderin	3/7	4/7	0	0	0,01	0,05	0,715
ALDH1	2/7	1/7	0	0	0,95	0	0,180
TCF15 (PARAXIS)	2/7	2/7	0	0	0,01	0,01	0,854
Beta-katenin (membranöz)	4/7	6/7	0,01	0,12	0,05	0,94	0,08
Beta-katenin (nükleer)	1/7	0/7	0	0	0	0	0,317

\* Primer ve metastaz odaklarında ekspresyon varlığı bakımından da herhangi bir belirteçle fark saptanmamıştır. (p>0,05)

Primer ve metastaz odaklarında ya MET<sup>low</sup> (primerdeki prevalansı %57,1, metastazdaki prevalansı %77,8) ya da MET<sup>high</sup> (primerdeki prevalansı %42,9, metastazdaki prevalansı %22,2) profile sahip vakalar görülmüştür. İki odak arasında MET profilleri bakımından fark izlenmemiştir (p>0,05). (Tablo 10)

**Tablo 10.** Lenf nodu metastazı yapan sarkomlarında primer ve metastaz odaklarının MET profilleri açısından karşılaştırılması

MET profili (n=7)	Primer Met <sup>-</sup> (n)	Primer Met <sup>+</sup> (n)	Primer <sup>+</sup> Met <sup>-</sup> (n)	Primer <sup>+</sup> Met <sup>+</sup> (n)	P değeri
MET <sup>high</sup>	4	0	2	1	0,479
MET <sup>low</sup>	1	2	0	4	0,479
MET <sup>neg</sup>	7	0	0	0	*

\* Hiçbir olguda MET<sup>neg</sup> profil saptanmadığından karşılaştırma yapılamamaktadır

#### 4.9. Dediferansiye Liposarkomlarda Diferansiye ve Dediferansiye Odakların EMT/MET Belirteçleri ve Diğer Belirteçlerle Ekspresyonu

Dediferansiye liposarkom olgularında ekspresyon statüleri kategorik (var/yok) olarak değerlendirildi.

Ekspresyon prevalansları:

- E-kaderin ile diferansiye odaklarda %69,2, dediferansiye odaklarda %56,3
- SLUG ile diferansiye odaklarda %58,3 , dediferansiye odaklarda %64,3
- TWIST1 ile ekspresyon prevalansı diferansiye odaklarda %33,3, dediferansiye odaklarda %50
- ALDH1 ile diferansiye odaklarda %30,8, dediferansiye odaklarda %35,7
- TCF15 ile diferansiye odaklarda %20, dediferansiye odaklarda %42,9
- Nükleer beta-katenin ile diferansiye odaklarda %7,1, dediferansiye odaklarda %7,7 olarak saptandı.

Olguların hiçbirinde, gerek diferansiye gerek dediferansiye odakta, membranöz beta katenin veya P-kaderin ekspresyonu izlenmedi.

Diferansiye ve dediferansiye odaklar arasında ekspresyon prevalansları bakımından hiçbir antikorla fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). MET profilleri açısından her üç antikorla (E-kaderin, SLUG ve TWIST1) bir arada değerlendirilebilmiş olan 7 olgu analize dahil edilebildi. MET<sup>neg</sup> profil diferansiye odaklarda görülmeyip sadece dediferansiye odaklarda saptanabildiğinden karşılaştırma yapılamadı. MET<sup>low</sup> ve MET<sup>high</sup> bakımından odaklar arasında fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). (Tablo 11)

**Tablo 11.** Dediferansiye liposarkomlarda diferansiye ve dediferansiye odakların MET profilleri ve immünohistokimyasal ekspresyon statüleri açısından karşılaştırılması

Analiz	Dif- Dedif- (n)	Dif- Dedif+ (n)	Dif+ Dedif- (n)	Dif+ Dedif+ (n)	P değeri
E-kaderin (n=13)	2	2	4	5	1
SLUG (n=12)	4	1	1	6	1
TWIST1 (n=10)	3	3	0	4	0,248
ALDH1 (n=12)	7	2	1	2	1
P-kaderin (n=13)	13	0	0	0	*
TCF15 (n=13)	6	4	1	2	0,371
Membranöz beta-katenin (n=12)	12	0	0	0	**
Nükleer beta-katenin (n=12)	11	1	0	0	***
MET <sup>high</sup> (n=7)	6	0	0	1	1
MET <sup>low</sup> (n=7)	1	0	3	3	0,248
MET <sup>neg</sup> (n=7)	4	3	0	0	*

\* Diferansiye odaklarda MET<sup>neg</sup> profil saptanmadığından karşılaştırma yapılamamaktadır.

\*\*Hiçbir olguda membranöz beta katenin veya P-kaderin ekspresyonu saptanmadığından karşılaştırma yapılamamaktadır.

\*\*\*Diferansiye odaklarda nükleer beta-katenin ekspresyonu saptanmadığından karşılaştırma yapılamamaktadır.

#### 4.10. İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Kendi Aralarındaki İlişkilerinin Değerlendirilmesi

ZEB1 ve MET profilleri arasındaki ilişki irdelenmiştir. MET<sup>neg</sup> profile sahip olguların %100'ünde, MET<sup>low</sup> 'ların %42,4'ünde ve MET<sup>high</sup> 'ların %21,4'ünde ZEB1 ekspresyonu mevcuttur ( $p=0,03$ ). Bu durum MET profilleriyle mezenkimal bir belirteç olan ZEB1 ekspresyonunun anlamlı bir paralellik gösterdiğine işaret etmektedir.

MET<sup>neg</sup> profili olan olguların %14,3'ünde nükleer beta katenin ekspresyonu gözlenirken MET<sup>high</sup> veya MET<sup>low</sup> olguların %2,5'unda saptanmıştır (p=0,01).

Membranöz beta-katenin ekspresyonu olan olguların %80'inde E-kaderin ile de pozitiflik saptanırken, olmayan olguların %46,9'u E-kaderin pozitifdir. (p=0,00).

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması, ilk defa geniş bir mezenkimal tümör spektrumunda immünohistokimyasal olarak EMT-TF'leri, P-kaderin'i, ALDH1'ı ve sarkom dışı mezenkimal tümörlerde immünohistokimyasal E-kaderin ekspresyonunu analiz eden bir çalışmadır. Ayrıca embriyolojik gelişim makalelerinde ismi daha çok anılan TCF15 (PARAXIS) immünohistokimyasını herhangi bir tümör grubunda ilk defa ele alması ve mezenkimal tümörlerde membranöz beta-kateninin ekspresyonuna yönelik MET perspektifinden daha derin bir kavrayış sunmayı hedef almasıyla da özgün niteliktedir.

Sarkomlardaki EMT çalışmaları bu tümörlerin EMT perspektifinden moleküler imzalarını skorlamayı gündeme getirmiş, yeni sınıflamaların önünü açmaya başlamıştır. Daha kötü klinik seyirle ilişkilendirilen mezenkimal-benzeri sarkomlar ile daha iyi seyirli epitelyal-benzeri sarkomların öne sürülmesi buna örnektir. <sup>61</sup> Şüphesiz ki moleküler veriler her zaman immünohistokimyasal ekspresyon sonuçları ile birebir örtüşmemektedir. Bu bağlamda çalışmamızın da - literatürden destek alarak – immünohistokimya bazlı olarak kendi öznel sınıflamasını ortaya koyduğu söylenebilir (ör. MET<sup>high</sup>'ın "immünohistokimyasal epitelyal benzeri"yi temsil ettiği düşünülebilir). Öte yandan çalışma, malign olmayan biyolojik davranışlı tümörleri de bu yönden ele alması ile de özgündür.

Neoplazi spektrumunda gözlenen moleküler patolojilerle EMT arasında önümüzdeki yıllarda daha fazla köprüler kurulacaktır. Çalışmamızın da kurulacak bu köprülerin anlamlandırılmasında, bir diğer deyişle tümör gelişimi ve evriminin izinin sürülmesine rehberlik etmesi beklenebilir.

Tez kapsamına alınan veri seti oldukça büyüktür. Tümör tipi bazında bu verilerin açılımlarını bu çalışma kapsamına almak mümkün görülmemiştir. Yine de yer verilen referans tabloların yardımıyla spesifik tümör tipleri üzerine çalışmalar, literatürdeki bilgi birikiminin de artmasıyla, derinleştirilebilir. Dolayısıyla temel bilgilerden hareketle genel olarak mezenkimal tümörleri anlamaya yönelik soru başlıkları sunulacak, belirteçler bu başlıklar altında tartışılacaktır. Buna ek olarak patoloji pratiğinde sık karşılaşılan ayırıcı tanı

zorluklarına da yer verilerek bulgular pragmatik bir bakış açısıyla da ele alınacaktır.

### **5.1. MET Belirteçlerinin İmmünohistokimyasal Ekspresyonları İle Mezenkimal Tümörlerin Biyolojik Davranışı Arasında Nasıl Bir İlişki Mevcuttur?**

Mezenkimal epitelyal transizyon, mezenkim fenotipindeki bir hücrenin epitelyal fenotipe dönüşümünü ifade etmektedir. Bu dönüşüm; varlığı ya da yokluğuna tek hücre düzeyinde gözlemsel kriterler dahilinde hükmedilebilen bir fenomendir. Mezenkimal epitelyal transizyonun; düzenleyici sinyal yolları, transkripsiyon faktörleri ve yapısal moleküllerin her birinin kendine ait özgün rollerinin bulunduğu karmaşık bir intraselüler ağın nihai çıktısı olduğu belirtilmektedir. Hücresel plastisitenin birbirine karşıt duran bu “ayarları” koşullara bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. İmmünohistokimyasal analizin buradaki rolü klinik bağlamın içerisinde bu ayarların nasıl değişebileceğini ön görmek ve bu değişiklikler ile ilişkili olabilecek olası moleküler, biyokimyasal, fizyopatolojik süreçler konusunda rehberlik etmektir.

EMT/MET parametrelerindeki bireysel değişikliklerin fenotip üzerinde doğrudan dönüştürücü bir etki göstermeyebileceğini akılda tutmak gerekir.<sup>62</sup> Bir diğer deyişle hücresel plastisitenin belirlenmesinde, hücrenin kendi nitelikleri ve mikroçevresi başta olmak üzere bağlamın önemi vazgeçilmezdir.

MET’in kendisi ile MET literatüründe rastlanan “MET-benzeri fenomen” kavramlarını da birbirinden ayırmak gerekir. “MET-benzeri fenomen” ile mezenkimal dönüşümün susturulduğu ve/veya epitelyal dönüşümün uyarıldığı, ancak bunun epitelyal lehine fenotipik bir çıktısının bulunmadığı ya da bu parametrelerdeki değişikliklerle fenotip korelasyonunun kurul(a)madığı durumlar kastedilmektedir, geniş bir spektrumdur. MET’i destekleyici immünohistokimyasal bulgular hücrelerde minimum MET-benzeri fenomenlerin varlığına, dolayısıyla MET eğilimine/kapasitesine işaret edebilmektedir, ancak tek başına MET anlamına gelmemektedir.

Mezenkimal-epitelyal-transizyonun mezenkimal tümörlerdeki biyolojik anlamıyla ilgili literatürde yer yer çelişen ifadeler bulunmaktadır, bir diğer



deyişle bu tümörlerde MET varlığının biyolojik davranışı ne yönde değiştirdiği kesin olarak bilinmemektedir. Sarkomlarda MET transkripsiyon profilinin ve E-kaderin ekspresyonunun daha *iyi prognozla* ilişkilendirildiği yayınlar olduğu gibi <sup>1,63</sup>, mezenkimal hücrelerdeki MET'in bu hücrelerden hibrit, olumsuz mikroçevre koşullarına dirençli, dolayısıyla *metastaz yapabilecek* hibrit fenotipleri oluşturabileceği de bildirilmiştir.<sup>14</sup> Bu karmaşanın altında yatan başlıca nedenler şunlardır:

- Klinik bağlam içerisinde belirteçlerin kantitasyonuna ilişkin olarak neyin epitelyal neyin mezenkimal fenotip lehine yorumlanması gerektiği konusunda bir standardizasyon bulunmamaktadır. Bu durum literatürdeki kantitatif temelli yayınların güvenilirliğini kısıtlayabilmektedir. Nitekim çalışmamızda kullanılan kriterler de subjektiftir.
- Yayınlar sıklıkla MET'i referans alsa da sarkomlarda MET yanı sıra <sup>32</sup> EMT'nin de görülebileceğini destekleyen yayınlar mevcuttur. <sup>24,25</sup> Erişkindeki multipotent kök hücrelerin de EMT geçirebileceğini modelleyen çalışmaların da bulunduğu dikkate alınırca, bu görüş mantığa aykırı değildir. <sup>64</sup> Karsinomlarda EMT ve MET tümörün evrimi içerisinde birbirini takip edebilmektedir. Embryolojik gelişimde de benzer bir ardışıklıktan bahsetmek mümkündür. <sup>64</sup> Teorik olarak karsinomlarda olduğu gibi hem EMT hem MET tümörün progresyonu sırasında farklı aşamalarda devreye girebilir ve bu anlamda prognozu hangi sürecin belirlediğini kestirmek güç olabilir.
- EMT/MET; tümör imzası olan genetik değişikliğin doğrudan hedefi olabilmektedir (ör. SYT-SSX füzyonlarının SNAIL'i baskılayabilmesi ya da p53 mutasyonlarının EMT ilişkili miRNA'ları modüle ederek ZEB1 ekspresyonunu artırması gibi <sup>65</sup>). Söz konusu değişiklikler paralel olarak tümör progresyonunu kolaylaştırabilecek diğer hücre içi sinyalleri de etkileyebileceğinden onkojenik aktivasyonun etkileri EMT programlarının etkileriyle iç içe geçmektedir. Bu durum prognostik belirleyiciyi ayırt etmede güçlük yaratmaktadır. <sup>15,22,34</sup>

Dolayısıyla bu çalışma farklı biyolojik davranışlara sahip mezenkimal tümörleri bir arada değerlendirerek bunlardaki MET-benzeri fenomenleri keşfetmeyi ve irdelemeyi hedeflemiş, söz konusu ikilemlere kendi olanakları ölçüsünde netlik kazandırmayı amaçlamıştır.

Çalışmaya EMT/MET'le doğrudan ilişkisi bilinen üç belirteç alınmıştır: E-kaderin, SLUG ve TWIST1. *E-kaderin*'in kemik ve yumuşak doku sarkomlarındaki ekspresyon prevalanslarını 90'larda Sato ve ark. çalışmıştır.<sup>30</sup> Bu çalışmada özellikle epiteloid morfoloji sergileyen tümörlerde ekspresyon sık bulunmuş, E-kaderin'in bu neoplazmlarda hücre mimarisini desteklemede görev alabileceği öne sürülmüştür. Mevcut tez çalışmasında E-kaderin, epiteloid morfolojili bazı tümörler de dahil olmak üzere her tür biyolojik davranışa sahip mezenkimal tümörde ve hatta mezenkimal tümör popülasyonunun yarıya yakınında saptanmıştır. Bu bulgu normal şartlar altında mezenkimde ekspresyonu beklenmeyen E-kaderin'in mezenkimal tümör bağlamında hiç de seyrek olmadığını ve tümörün epitelyal dönüşümünde azımsanamayacak bir role sahip olduğunu desteklemektedir. Ewing sarkomlarında E-kaderin ile ekspresyon saptanmamıştır, bu bulgu yine literatürde Ewing sarkomlarında birçok epitelyal belirteci immünohistokimyasal olarak bir arada çalışan bir yayınla uyumludur.<sup>33</sup> *SLUG* 'ı geniş mezenkimal tümör serilerinde çalışan bir yayına rastlanmamış olmakla birlikte gastrointestinal stromal tümörlerdeki KIT mutasyonlarının akış aşağı etkileri arasında *SLUG* aşırı ekspresyonunun bulunduğu ve bunun nüksüz sağkalım bakımından olumsuz prognostik bir belirteç olduğunu bildirilmiştir.<sup>2</sup> *TWIST1* ekspresyonu karsinom çalışmalarında agresif biyolojik davranışla ilişkili bulunmuş ve birçok karsinom alt tipinde de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.<sup>66</sup> Belli sarkomlarda *TWIST1*'in immünohistokimyasal ekspresyonunun sık olduğu gözlenmekle birlikte karsinomların aksine bu bulgunun klinik bağlam içinde tek başına olumsuz prognostik bir anlamı olup olmadığı bilinmemektedir.<sup>22</sup> *SLUG* veya *TWIST* ile herhangi bir düzeyde immünohistokimyasal ekspresyon gösteren mezenkimal tümör olguları %80'i aşmaktadır. Bu bulgu mezenkimal tümörlerde sıklıkla bazal bir mezenkimal düzeneğin hücre içerisinde işletilmeye devam ettiğine işaret etmektedir. Buna

karşın bu belirteçlerle ekspresyon kayıpları her ikisi için %50'yi aşmaktadır ki bu da hücrelerdeki fenotipik değişim eğilimlerinin çoğunlukla bulunduğu işaret etmektedir.

Hücre içi EMT-düzenleyici ağların nihai çıktısı hücre fenotipinde belirleyicidir. Bu nedenle bu çalışmada EMT/MET parametrelerini tek başlarına değerlendirmek yerine *bir araya getirilerek* MET profillerinin oluşturulması ihtiyacı doğmuştur. Elbette hücre içerisindeki EMT “fabrikasının” bu üç parametreden daha fazlası olduğunu belirtmek gerekir. Dolayısıyla çalışmamız özellikle mezenkimal tümörlerde bildirilen diğer epitelyal/mezenkimal belirteçler de eklenerek ileride daha da rafineleştirilebilir. Nitekim EMT/MET’te kritik bir düzenleyici olarak anılan ZEB1<sup>67</sup> ekspresyonu ile bu çalışmadaki MET profilleri arasında kurulan istatistiksel paralellikler ZEB1’in böyle bir çalışma için aday belirteç olduğunu göstermektedir.

Bu antikor paneli, mezenkimal tümörlerdeki güvenilirliğini konuyla ilgili temel bilgiler ve referans makalelerden almaktadır.<sup>7</sup> Nitekim mezenkimal tümörlerde bugünkü bilgi birikimiyle tümör tipi bazlı spesifik kanıtlara dayalı bir kurgu yapmak güçtür. Bu güçlüğü altında; teknik sınırlılıkları olan hücre çalışmalarının az sayıda sarkom tipine odaklanabilmesi ve hücreler üzerindeki deneysel etkilerin klinik bağlamla ne derecede örtüştüğünün iyi bilinmemesi yatmaktadır. Ancak literatürdeki şu çalışmalardan da destek almak mümkündür: Yang ve ark.’nın leiomyosarkom hücreleri ile yaptıkları; immünohistokimya, protein analizi ve hücre kültürü gibi tetkikleri bir araya getirdikleri çalışmalarında siRNA aracılıklı SLUG susturmasının gerçekten de E-kaderinin downregülasyonuna neden olduğu, yanı sıra hücrelerde iğsi fenotipten ovaloid fenotipe geçişi sağladığı gösterilmiştir.<sup>1</sup> Guo ve ark.’nın Saos-2 osteosarkom hücreleri üzerindeki çalışmalarında çözünebilir Lrp5 (sLrp5) transfeksiyonunun Wnt sinyali blokajı üzerinden SLUG ve TWIST’in downregülasyonuna, membranda E-kaderin artışına ek olarak fenotipik olarak da epitelyal dönüşüme yol açtığı gösterilmiştir.<sup>68</sup>

Bu çalışmadaki “MET profilleri” aslında sadece, farklı tümörlerin MET programlarını ne derecede kullanabileceklerini ortaya koyabilir. Tümörlerin biyolojik davranışlarına göre yapılan histopatolojik sınıflamalar aslında birer

potansiyeli ifade etmekle birlikte bu potansiyellerin her zaman pratik bir karşılığı olmak zorunda değildir. Dolayısıyla bu belirteçlerin biyolojik davranışa etkilerini tartışabilmek için incelenen her bir tümörün klinik seyir verilerine ihtiyaç vardır, ki bu çalışmanın kapsamı dışında kalmıştır. Yine de söz konusu verilerin eklenmesiyle çalışmamız zenginleştirilebilir.

Neden “EMT profilleri” değil de “MET profilleri” sorusunun cevabı, yukarıda belirtilen yayınların da ışığında, zaten normal şartlar altında mezenkimal hücrelerde sıklıkla eksprese olduğu bilinen bu moleküllerde anlamlı farkların ekspresyon kaybını temel alan MET perspektifinden elde edilebileceği ön görüştür. Ancak MET, EMT'nin resiproku olduğundan elde edilen veriler, ters ilgi kurularak EMT gözüyle de okunabilir.

Bu çalışmada E-kaderin ekspresyonuna ek olarak hem SLUG hem TWIST ekspresyonunda kayıp görülen olgular **MET<sup>high</sup>** olarak sınıflandırılmıştır. MET<sup>high</sup> olguları, her üç belirteci kullanarak MET veya MET-benzeri programlanmalar gösterme eğilimine/kapasitesine sahip olgular olarak tanımlamak mümkündür. E-kaderin ekspresyonu göstermeyen ve ek olarak SLUG ve de TWIST ile ekspresyon kaybı göstermeyen olgular **MET<sup>neg</sup>** olarak sınıflandırılmıştır. MET<sup>neg</sup> ile; bu belirteçler bakımından normal mezenkime benzeyen bir profil sergileyen, epitelyal dönüşüme eğilim göstermediği düşünülen olgular tanımlanmıştır. **MET<sup>low</sup>** ile bu iki sınıfa giremeyen tüm olgular tanımlanmıştır. Bu tanım MET ya da MET-benzeri programlanmalar gösterme konusunda kısmen istekli kısmen isteksiz olan olgular olarak düşünülebilir. Bu çalışmada incelenen tüm mezenkimal tümör olgularında bu profile uyan vakalara rastlanmıştır.

MET'in mezenkimal tümörler açısından (ve aslında EMT'nin de karsinomlar açısından) en önemli biyolojik anlamı metastazdır. Ancak bu çalışmalarda MET profillerini yorumlarken dikkatli olunmalı; mezenkimal tümörlerde tümör-mikroçevre etkileşimi, onkojenik aktivasyonların alternatif akış aşağı etkileri gibi MET-dışındaki metastaz belirleyicilerinin de sürecin içinde olduğunu akılda tutmak gerekir.

MET<sup>neg</sup> prevalansı lokal agresif olgularda diğer mezenkimal tümörlere kıyasla yüksek bulunmuştur. Lokal agresif olgularda bu farkı yaratan olguların

desmoid fibromatozis histolojisinde olduğunu söylemek mümkündür, nitekim bu gruptaki diğer tümörler olan atipik lipomatöz tümörlerde MET<sup>neg</sup> e rastlanmamıştır. Desmoid fibromatozislerde aktive edici beta-katenin mutasyonları çok sık görülmektedir ve bu durum Wnt/beta-katenin üzerinden MET<sup>neg</sup> profile zemin hazırlayabilir. Bugüne kadar aktive edici beta-katenin mutasyonu üzerinden EMT geçirebildiği bildirilen başka bir mezenkimal tümör mevcut değildir. Dolayısıyla söz konusu istatistiksel farkın hem lokal agresiflerdeki örneklem küçüklüğü (n=7) hem de desmoid fibromatozisin özgün moleküler imzasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bir diğer deyişle MET<sup>neg</sup> bakımından - desmoid fibromatozisleri bir kenara koyarsak - aslında biyolojik davranışlarına göre mezenkimal tümör grupları arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

MET<sup>low</sup> olgulara tüm mezenkimal tümör tiplerinde rastlanması dikkat çekici bir bulgudur. Bu durum aslında biyolojik davranışından bağımsız olarak tüm mezenkimal tümör olgularında MET benzeri fenomenlerin görülebileceğine işaret etmektedir.

Özgün bir diğer bulgu da MET<sup>high</sup> ve MET<sup>low</sup> profillere benign mezenkimal tümörlerde sık rastlanmış olmasıdır. Benign mezenkimal tümörlerde minimum MET-benzeri diyebileceğimiz fenomenlerin olması ne anlama gelmektedir? Literatürde benign mezenkimal tümörlerin gelişimindeki hücre programlanmalarda hücresel plastisitenin ne derecede rolünün olabileceğini irdeleyen bir çalışma bulunamamıştır. Bu tümörlerin gelişiminde hem progenitör hem de matür hücreler suçlanabilmektedir.<sup>69,70</sup> Literatürde somatik mezenkimal hücrelerin (fare fibroblastları) yeniden programlanmaları sırasında MET ile pluripotent kök hücrelerin oluşabildiğine ve bundan sonra da hücrelerin hangi yöne farklılaşacağıının belirlenebildiğine değinilmektedir.<sup>71,72</sup> Dolayısıyla benign mezenkimal tümörlerde MET<sup>high</sup> ve MET<sup>low</sup> profil tümörün farklılaşma göstermeden önceki erken gelişimsel süreciyle ilişkili olabilir. Buna karşıt olarak MET<sup>neg</sup> profildeki benign olgular, hücresel plastisiteden/kök hücre programlarından bağımsız olarak matür hücre düzeyinde tümör supresyon kontrolü bozulmuş ve/veya onkojenik aktivasyona uğramış olguları temsil ediyor olabilir. Ancak bunların her biri birer hipotezdir ve bu konunun

aydınlatılması için benign mezenkimal tümörlerde hücrenel yeniden programlanmanın mekanizmaları ile ilgili derleme çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Malign/metastaz potansiyelli ara davranışlı MET<sup>neg</sup> tümör olgularına rastlanmış olması da kayda değerdir. Bu olgularla ilgili şu yorumlarda bulunabilir:

- Bu grupta EMT mekanizmaları aşırı aktif, agresif ve infiltratif olguları temsil ediliyor olabilir ve bu olguların klinik metastaz verilerine erişilmelidir.
- Bu grup MET bakımından çekinik, muhtemelen fokal olarak bu eğilimi barındıran, yine de bu eğilimin immünohistokimya ile tespit edilemediği olguları temsil ediyor olabilir. Bir diğer deyişle immünohistokimya (ya da çalışmamızda uygulanan panel) bu olguların MET potansiyellerine yeterince sensitif değildir.
- Bu grupta metastaz kapasitesinin esas belirleyicisi MET dışı süreçler olabilir.

Özetle bu bulgular ışığında çalışmamızın önerileri şunlar olabilir:

- Desmoid fibromatozisler de dahil olmak üzere tüm mezenkimal tümörlerde MET benzeri fenomenler olabilmektedir. Dolayısıyla her mezenkimal tümörle MET'e ilişkin hücre çalışması denemeleri yapılabilir.
- Başta en az aydınlatılmış olan benign mezenkimal tümörler olmak üzere mezenkimal tümörlerde görülen moleküler sapmaların spektrumu ile MET arasında daha fazla köprü kurulması gerekmektedir.
- Bu çalışmada; GİST örneğinden hareketle SLUG ekspresyonunun sıklıkla korunduğu (ör. pleomorfik liposarkomlar), karsinomlardan hareketle TWIST1 ekspresyonunun korunduğu (ör. anjiosarkomlar) ve MET<sup>neg</sup> prevalansının yüksek bulunduğu sarkomlarda (ör. Ewing-benzeri sarkomlar) klinikopatolojik analizler yapılabilir. Bu çalışmalar ışığında transkripsiyon faktörlerinin susturulmasının bir tedavi seçeneği olup olamayacağı tartışmaya açılabilir.

## 5.2. Mezenkimal Tümörlerdeki Dediferansiyasyonla MET Belirteçlerinin Ekspresyonu Arasında Bir İlişki Mevcut Mudur?

Her ne kadar EMT ile hücrelerin kaderinde kritik değişiklikler olabilse de, epitelyalden mezenkimal fenotipe EMT-ilişkili *hücresele değişikliklerin* hücrenin diferansiyasyonu ya da dediferansiyasyonundan bağımsız olduğu vurgulanmaktadır. <sup>5</sup> Diğer deyişle hem diferansiye hem dediferansiye tümörlerde her türlü fenotipik değişikliğe rastlamak mümkündür.

Mezenkimal tümör gelişiminde diferansiyasyon temeldir, bugünkü terminolojimizde de hala önemini korumaktadır. Sarkomlarda sarkomagenezi başlatan genetik değişiklikler büyük oranda translokasyonlar veya kompleks karyotip oluşumlarıdır. Özellikle translokasyonlar neticesinde ortaya çıkan onkojenik aktivasyonların mezenkimal kök hücrelerden spesifik bir yöne farklılaşmaya başlamış (“lineage-committed”) ancak farklılaşmayı tam başaramamış hücrelerin oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir. Yönlenmiş bu hücrelerin yeni mutasyonlar kazanması, yeni eksternal sinyaller alması ve embryonik/kök hücre özelliklerini elde etmesiyle de malign transformasyon geçirdiği düşünülmektedir. Böylece kendini yenileme kapasitesine sahip olan kanser kök hücreleri ve yeni sinyallerle bunlardan tümör hücreleri oluşabilmektedir. <sup>73</sup> Onkojenik aktivasyonlar neticesinde ortaya çıkan füzyon onkoproteinleri genom üzerinde global olarak etki gösterebilmektedir, dolayısıyla bunların EMT programları üzerine de etkiyebileceği düşünülebilir. Nitekim sinovyal sarkomlardaki SYT-SSX füzyonunun SNAIL ve SLUG üzerindeki modifikasyonları bunun bir temsili niteliğindedir. <sup>15</sup> Ewing sarkomlarda tümör kitlesi içerisindeki rastgele (“stokastik”) EWSR1-FLI1 ekspresyonlarının; düşük olduğunda mezenkimal-benzeri, yüksek olduğunda ise hücre-hücre bağlantılarına sahip andiferansiye popülasyonların ortaya çıkışını belirlediği ifade edilmektedir. <sup>74</sup> Öte yandan Castellon ve ark.’nın 2014 yılında yayınlarındaki çalışmalarında EMT-TF’lerden SNAIL’in fibroblastlara transfeksiyonunun tümörojenik etki gösterebildiğini saptamışlardır ve SNAIL’e, bir diğer deyişle EMT’ye, sarkomagenez için ihtiyaç duyulduğunu öne sürmüşlerdir. <sup>25</sup> Genel olarak sarkomlarda tümörün temel genetik değişiklikleri

ile EMT yolaklarının etkileşimi daha nice çalışmalara gebe önemli bir araştırma sahasıdır.

Dediferansiyasyon ise, EMT-TF'lere bağımlı olabilen veya olmayabilen, tümörün farklılaşma programlarını bozan kompleks genetik anomalilerin neoplastik sürece eklendiği bir durumdur. <sup>3</sup> Bu çalışmada değerlendirilen dediferansiye liposarkomların patogeneziyle ilgili günümüzde aşama kaydedilmiştir. Dediferansiye liposarkomlarla, bunun diferansiye karşılığı olarak değerlendirilen atipik lipomatöz tümör/iyi diferansiye liposarkomlar arasında başta *MDM2* amplifikasyonu olmak üzere genetik aberasyonlar bakımından ortaklıklar sıklıdır. Dediferansiye liposarkomlarda buna ek olarak karyotipik anomaliler (*11q22-q24* kaybı gibi) ve kopya sayısı değişiklikleri gibi karmaşık genomik olaylar bulunmaktadır. <sup>75</sup> Diferansiyasyon yolaklarındaki epigenetik susturulmaların da bu tümörlerde liposarkomogeneze katkıda bulunduğunu belirten çalışmalar yayınlanmıştır. <sup>76</sup> Liposarkomlarda söz konusu değişikliklerin EMT/MET ile etkileşimine değinen bir yayına rastlanmamıştır.

Biyolojik davranışından bağımsız olarak tüm mezenkimal tümörlerde hibrit fenotiplerin izine rastlamak beklenebilir, çünkü epitelyal-mezenkimal akstaki hibrit fenotipler aynı zamanda diferansiyasyon ve dediferansiyasyonun da kavşak noktasında bulunmaktadır. <sup>64</sup> Nitekim çalışmamızda da tüm mezenkimal tümörlerle bu beklentiyi destekleyebilecek bulgular elde edilmiştir. Ancak yine de atipik lipomatöz tümörlerin dediferansiyasyon geçirmesiyle sistemik yayılım kapasitesi kazanması ve anaplastik tiroid karsinomu, glioblastom gibi dediferansiye histolojiye sahip diğer kanserlerde EMT-TF'lerin yüksek oranda eksprese olabilmesinden hareketle <sup>3</sup> dediferansiye liposarkomların dediferansiye alanlarında EMT belirteçlerinin ekspresyonunun daha fazla görülebileceği savunulabilir.

Bu çalışmada, bu tümörlerin diferansiye ve dediferansiye odaklarında gerek bireysel olarak MET belirteçleri bakımından gerekse MET profilleri açısından fark saptanmamıştır. Bir diğer deyişle dediferansiye odaklardaki hücreler MET/EMT bakımından diferansiye odaklardakilerine kıyasla daha istekli/kapasiteli bulunmamıştır. Dolayısıyla liposarkomlarda



dediferansiyasyon süreçlerinin çalışılan EMT faktörleriyle etkileşebileceğini destekleyecek bulgu elde edilmemiştir.

### **5.3. Lenf Nodu Metastazı Yapan Sarkomlarla Karsinomlar Arasında MET Belirteçleri Bakımından Bir İlgisi Mevcut Mudur?**

Karsinomlarda lenf nodu metastazı hastalığın önemli bir prognostik belirteçidir. Sarkomlarda ise lenf nodu metastazı nadirdir. Lenf nodu metastazı yapabildiği bilinen sarkom alt tipleri de bütün sarkom spektrumu içerisinde küçük bir grubu oluşturmaktadır. Bunların arasında epitelooid sarkom gibi keratin eksprese edebilen epitelooid morfolojili tiplerin bulunabilmesi de akla bu tümörlerde karsinom benzeri bir davranış paterni olabileceğini getirmektedir.

Karsinomlarda lenf nodu metastaz süreci primer odakta çeşitli etmenlerin belirleyici olduğu kompleks bir süreçtir. Bunların arasında primer odaktaki interstisyel sıvı basıncının gelgit etkisi, intratümöral lenfanjiogenez ve immün sistemden kaçış bulunmaktadır.<sup>77</sup> Bunun yanı sıra etkin bir metastazın gerçekleşebilmesi için en kritik olduğu bildirilen final basamağının, yani lenf nodu metastazlarında lenf nodundaki mikroçevrenin de belirleyici olduğu vurgulanmalıdır.<sup>78</sup>

Sarkomların lenf nodu metastazı mekanizmaları, muhtemelen olguların da seyrek görülmesi nedeniyle, bugün itibariyle net olarak ortaya konmamıştır. Bu olgulara sıklıkla hematogen metastaz yapan sarkomlara benzer tedavi protokolleri uygulanmaktadır.<sup>79</sup>

EMP ve metastaz arasındaki ilişki, yeni çalışmalarla git gide daha çok anlaşılmaktadır. Bu alanda da çalışılan vaka örnekleminin çoğunu epitelyal malignansiler oluşturmaktadır. Farelerdeki pankreatik adenokarsinom modellerinde ZEB1'in etkili bir invazyon ve metastaz için, SNAIL'in karsinom hücrelerinin yayılması için gerekli olduğu gösterilmiştir.<sup>19,80</sup> EMT'nin en önemli indükleyici sinyal yolağı olan TGF- $\beta$  aracılıklı EMT, tümör hücrelerinde CCR7 gibi kemokin reseptörlerinin ekspresyonunu artırabilmektedir.<sup>81</sup> Böylece, normalde lenfatik endotelden salgılanan ve dendritik hücrelerin lenfatik sisteme girişine aracı olan kemoatraktan molekülleri kullanarak, tümör hücreleri de lenfatik dolaşıma geçebilmektedir. Deneysel çalışmalarda SLUG

ekspresyonunun da normal şartlar altında metastaz potansiyeli olmayan meme epitel hücrelerinde metastaz gücünü artırabildiği gösterilmiştir.<sup>82</sup> Twist'in özellikle tümör invazyonu, intravazasyon ve ekstravazasyonda rolü olduğu bilinmektedir ve sinovyal sarkom progresyonunda önemli bir belirteç olduğu ifade edilmiştir.<sup>20,22</sup> Osteosarkomlarda normal kemiğe kıyasla tümör içerisinde ve primer odağa kıyasla metastaz odaklarında (kantitatif analizlerle) daha yüksek ZEB1 ekspresyonlarına rastlanmıştır.<sup>24</sup> Ewing sarkom hücreleri üzerinde yapılan siRNA aracılıklı ZEB2 susturma deneylerinde, epitelyal fenotipin baskılanıp metastazı teşvik edici etkilerin ortaya çıktığı kantitatif ve immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir.<sup>83</sup> Non-epitelyal, az diferansiye bir malign tümör olan glioblastomun yayılımında da EMT programlarının rolü olabileceğine işaret eden çalışmalar yayınlanmıştır.<sup>84</sup> Bunlara karşılık uterin karsinosarkomlar ve bifazik sinovyal sarkom gibi agresif biyolojik davranışı olan histolojik tiplerdeki mikst epitelyal-mezenkimal morfoloji, *hibrit epitelyal-mezenkimal fenotipin* metastazla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.<sup>14</sup>

Çalışmamızda tüm mezenkimal tümör grubunda EMT/MET belirteçlerinin ekspresyonları veya MET profilleri ile metastaz potansiyeli olan histolojik alt tipler arasında ilişki saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). MET<sup>neg</sup> (immünohistokimyasal mezenkimal-benzeri olan olgular); sarkomlar ve metastaz yapabilen ara davranışlı tümörlerde en düşük prevalanslı profildir. Bu durum en az MET-benzeri denebilecek, hücreleri epitelyal transizyona yönlendiren fenomenlerin bu tümörlerde sıklıkla meydana geldiğine işaret etmektedir. Çalışmamızda MET<sup>neg</sup> olarak değerlendirilen 33 olgunun sadece 3'ü ZEB1 ile de değerlendirilebilmiştir. ZEB1 sarkom metastazında kritik olabilecek bir belirteçtir. Her ne kadar mevcut şartlarda ZEB1 ekspresyonu ile MET profilleri arasında paralellik dikkati çektiyse de tüm seride ZEB1 değerlendirmesi yapılmaksızın MET<sup>neg</sup> grubunun prevalansında bir azalma olup olmayacağını kestirmek güçtür. Bir diğer deyişle MET-benzeri fenomenlerin prevalansının bu çalışmada gösterilenden daha yüksek olması da olasılık dahilindedir.

Lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda gerek primer odaklar gerekse metastaz odaklarında MET<sup>neg</sup> olguya rastlanmamıştır. Bu bulguyu biraz açtığımızda şu tabloyla karşılaşmaktayız: E-kaderin ekspresyonunun

tümördeki yaygınlığının medyanı primerde %2 metastazda %19 bulunmuştur, yani fokal de olsa mevcuttur. SLUG ekspresyon yaygınlığının medyanı primerde %48 metastazda %61 olup her iki değer de ekspresyon kaybı aralığındadır. TWIST ekspresyonu yaygınlığı primerde %50, metastazda %70'tir ve bu değerler de ekspresyon kaybı aralığındadır. Primer ve metastaz odakları arasında da bu bakımdan istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. ( $p>0,05$ ) Toparlarsak; lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda da metastaz potansiyeli taşıyan tüm mezenkimal tümör olguları gibi MET-benzeri eğilimler görülmektedir, ancak MET özellikleri bakımından primer ve metastaz odaklarındaki tümörler birbirinden farklı görünmemektedir. Bu yönleriyle mezenkimal tümörlerdeki genel resmin karsinomlara benzemediği çıkarımı yapılabilir.

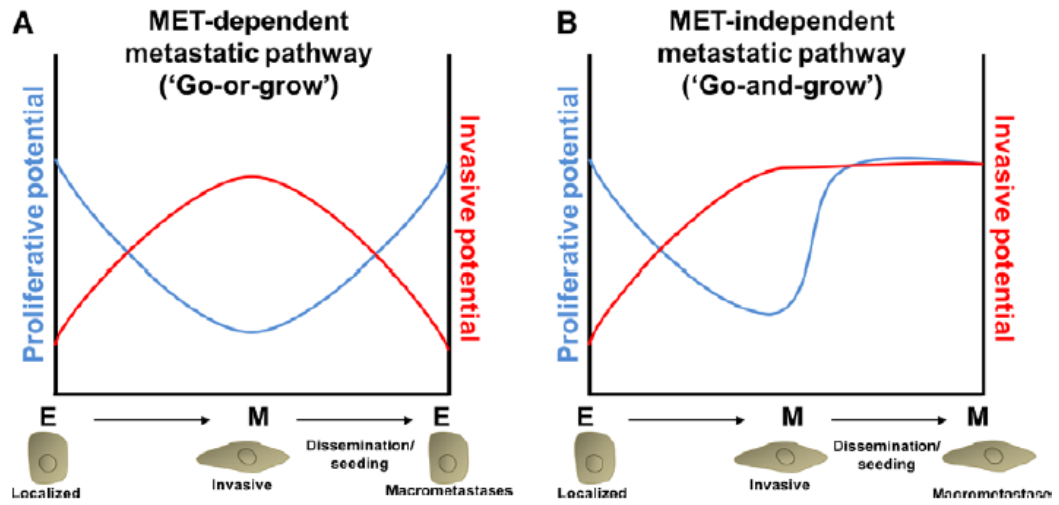
MET-benzeri fenomenlerin sarkomlar dahil metastaz yapabilen ara davranışlı mezenkimal tümörlerde prevalansının yüksek olmasının metastazla bir ilgisi olabilir mi? Bunu anlamak için şu soruyu sormak gerekmektedir: "MET'ten bağımsız bir metastaz süreci mümkün müdür?" Bu soruların cevabına Jolly ve ark.'nın 2017 tarihli Molecular Oncology'de yayınları aracılığıyla yaklaşılabilmektedir.<sup>85</sup>

EMT literatüründeki önemli araştırmacılardan Thomas Brabletz tarafından kanserlerde metastaz sürecinin hem MET'e bağımlı hem de MET'ten bağımsız olarak gerçekleşebileceği öne sürülmüştür.<sup>86</sup> MET'ten bağımsız metastaza prostatik adenokarsinom gibi epitelyal kanserlerde, MET bağımlı metastaza karsinosarkom gibi mezenkimal kanserlerde rastlanabilse de<sup>87</sup> genellikle sarkom metastazı için **MET'ten bağımsız** metastaz süreçlerinin rol sahibi olduğu ifade edilmektedir.<sup>85</sup>

Karsinomlarda sık görülen MET bağımlı metastazda ("ya göç et ya büyü"), yayılmış olan hücreler EMT-TF'ler ya da mikroRNA'lar aracılıklı olarak epitelyal fenotip kazanarak makrometastazlar oluşturabilmektedir. EMT'nin hücre proliferasyonunu arreste uğratan etkisi bu odaklarda tersine çevrilmektedir.

MET bağımsız mekanizmalarda ise (“göç et ve büyü”) tümörögenезin başlangıcında neoplastik hücreler **intrinsik olarak** hücresel plastisiteden bağımsız metastaz için donanımlı hale geçmektedir. Deneysel çalışmalarda hücre proliferasyon kontrolü bozulmuş hücrelerde gerçekleşen EMT'nin genomik instabilite birikimine neden olduğu bilgisinden <sup>88</sup> de hareketle, bu grup tümörlerin instabil genomlara sahip dediferansiye tümörlerle örtüştüğü düşünülmektedir. Benzer şekilde bu mekanizmaların kompleks karyotip oluşumları ya da translokasyonlarla ortaya çıkan, karsinomlara kıyasla genel sağkalımı daha düşük olan malign mezenkimal tümörler için de geçerli olması akla yatkın görünmektedir. Karsinomlarda hız sınırlayıcı basamak sıklıkla makrometastazlar için hücre proliferasyonunun sürdürülebilir olması, yani MET'tir. Buna karşılık sarkomlarda hız sınırlayıcı basamağın, tümörü başlatan değişikliğin kendisi olduğu düşünülmektedir.<sup>85</sup> (Şekil 16)

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar bu önermeyle birebir örtüşmemektedir. Çünkü normal mezenkimde de eksprese olduğunu bildiğimiz belirteçlerle yaptığımız bu çalışmada mezenkimal tümörlerde sık ekspresyon kaybı yani MET benzeri fenomenler izlenmiştir. Bu durumu açıklamak için ise parsiyel EMT ya da parsiyel MET kavramlarını açmak gerekecektir.



**Şekil 16.** Jolly ve ark.'nın makalesinde<sup>85</sup> belirtilen plastisiteye bağımlı ve plastisiteden bağımsız metastaz yolları. (A) MET bağımlı metastazda, post-EMT-benzeri kanser hücreleri, yayılım ve yerleşme için gerekli olan invaziv programları upregüle etmektedir. Bu programın bir bedeli olmaktadır; EMT indüksiyonu proliferasyon potansiyelinin downregüle olmasına yol açmaktadır. Metastaz bölgesinde epitelyal fenotipin MET ile yeniden oluşturulması makrometastazların oluşumu için gerekli proliferatif potansiyeli yeniden uyandırır. (B) MET bağımsız metastazda tedavi, epigenetik yeniden programlanma, özgün mutasyonların edinimi ve diğer mekanizmalar; tümör hücrelerinde, hücrelerin hem yüksek proliferasyon hem yüksek invazyon fenotipinde fikse kalmasına yol açan bir EMT-sonrası durumu indüklemektedir. MET-bağımsız yollarla metastaz yapan hücreler daha agresif, kök hücre benzeri, kemoterapiye dirençli ve tekrar tekrar ekilmeye eğilimli olabilmektedir.

Karsinomlarda parsiyel EMT ile, eş zamanlı olarak hem intrinsik epitelyal fenotipin yani proliferatif aktivitenin korunması hem de invaziv özellik kazanımı metastaz yapabilen bir fenotipin oluşması sağlanmaktadır. Bu fenotipin epitelyale daha yakın ama hibrit bir ara form olduğu düşünülebilir. Çünkü epitelyal hücreler bu aks içerisinde mezenkimal zona geçtikleri takdirde

proliferasyon ve kolonizasyon becerilerini dolayısıyla metastatik potansiyellerini kaybedeceklerdir. Şimdi bütün bu tabloyu mezenkimal tümörlerin özelliklerine göre değiştirelim. Sarkomlarda parsiyel MET, metastaz yapabilen fenotiplerin oluşmasına aracı olup intrinsik mezenkimal fenotipin kısmen korunması sayesinde de tümör hücrelerinin metastatik odaklarda invazyon kapasitesinin devamlılığını sağlıyor olabilir. Nitekim çalışmamızın ana şemasına ilham veren Sannino ve ark.'nın önerisi bu olasılıkla daha uyumludur.

Özetle çalışmamızdaki bulguların lenf nodu metastazlarını da potansiyel olarak açıklayabilecek, sarkomlardaki metastaz süreçlerine dair ek araştırma önerisi şu olabilir:

Sarkomlarda immünohistokimyasal olarak sık saptanan MET benzeri fenomenler tümör evrimi içerisinde parsiyel MET'e bağlı metastazla gerçekten ilgili midir? Yoksa tümör başlatıcı genetik mekanizma ve buna sekonder ortaya çıkan EMT'ye karşılık MET, migrasyon durdurucu bir fren mekanizması ve hatta diferansiyasyon penceresi açan bir program olarak mı işlev görmektedir? Buna sarkomlarda görülen özgün genetik değişikliklerle sarkomlardaki MET programları arasında kurulacak köprüler (hücre çalışmaları ve moleküler patern analizleri) açıklık getirebilir. Özellikle MET<sup>high</sup> profile sık rastlanan parakordoma, ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom ve rabdomyosarkom gibi tümörlerin böyle bir çalışma için iyi adaylar olabileceği söylenebilir.

#### **5.4. Mezenkimal Tümörlerde İmmünohistokimyasal TCF15 (PARAXIS)**

##### **Ekspresyonu**

TCF15'in EMT/MET açısından ön plana çıkması embriyogenezde somitik epitelyalizasyonda rol almasından ileri gelmektedir. Karsinomlardaki immünohistokimyasal ekspresyonu hakkında da önceden bir çalışma bulunmayan bu molekülün bu çalışma ile mezenkimal tümörlerde eksprese olabileceği gösterilmiştir. Bu bulgunun mezenkimal tümörlerde anlamı nedir?

Linker ve ark. civciv embriyolarıyla gerçekleştirdikleri manipülasyon deneylerinde, ektoderme ilişkisi kesilen rostral segmental plakta, 24 saatlik seri gözlemler sonunda presomitik mezoderm hücrelerindeki somitik

epitelyalizasyonun korunamadığını gözlemlemiştir. Bu gözlemlerini hücrelerde somitogenez ilişkili Wnt ligandlarının ekspresyonu ve beta-katenin-hücre morfolojisi ilişkisi üzerindeki gözlemleriyle de bir araya getirmişlerdir. Neticede ektodermal plak varlığındaki Wnt/beta-katenin – Paraxis aksının somitik epitelyalizasyonun devamlılığı için bir gereklilik olduğunu öne sürmüşlerdir.<sup>89</sup> Bunun patolojik MET açısından anlamı, tümörlerde Paraxis ilişkili ve somitik epitelyalizasyon benzeri bir hücre programlanma olasılığından bahsetmek için kanonik Wnt yolak aktivasyonunun da ispatlamanın önemli olduğudur. Bunun bir temsili olarak da bu çalışmada immünohistokimyasal nükleer beta-katenin ekspresyonu düşünülmüştür. Mevcut seride nükleer beta-katenin ekspresyonu gösteren mezenkimal tümör olgularında Paraxis ekspresyonu daha yüksek bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Paraxis'in Wnt yolağından bağımsız da düzenlenebilir düzenlenemediği kesin bilinmemekle birlikte bu bulgu, mezenkimal tümörlerdeki Paraxis ekspresyonunun Paraxis'in daha ziyade somitik epitelyalizasyon dışı işlevleriyle ilişkili olabileceğini akla getirmektedir.

Sarkomagenezde, tümör gelişiminin tetiğini çeken onkojenik aktivasyonların çok çeşitli gelişimsel transkripsiyon faktörlerini de aktive edebildiği ya da susturabildiği bildirilmiştir.<sup>73</sup> Paraxis'in somitogenez dışında da görev aldığı gösterilen başlıca embriyolojik olaylar arasında şunlar yer almaktadır:

- Embriyolojik hayatın 4.-5. gününde progenitör hücrelerin germ hücrelerine farklılaşması<sup>90</sup>
- Somitogenez dışı morfogenetik (deri, kulak<sup>91</sup> ve kas<sup>92</sup> gelişimi) süreçler

Bu olayların Paraxis'i de kapsayan hücresel mekanizmalarının aydınlatılması, Paraxis'in erişkin matür hücrelerdeki ekspresyonunun anlaşılması ve de geniş mezenkimal tümör serilerinde patogenetik moleküler değişikliklerle gelişimsel transkripsiyon faktörleri arasındaki ilgileri irdeleyen yeni çalışmalar bu ekspresyonun anlamını açığa çıkarabilir. Söz konusu mezenkimal tümör serilerine özellikle benign tümörlerin de dahil edilmesi çalışmamızın bir önerisi olabilir, çünkü Paraxis ekspresyonu bilhassa benign

mezenkimal tümörlerde diğerlerine kıyasla sık bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Rodriguez-Fraticelli ve ark.'nın kemik iliği transplantlarında hematopoetik kök hücrelerde Paraxis'in işlevine işaret ettiği çalışmalarından hareketle bir diğer olasılık da Paraxis'in tümör hücrelerinin yenilenmesinde rolü olabileceğidir. <sup>39</sup>

### **5.5. Mezenkimal Tümörlerde İmmünohistokimyasal P-kaderin Ekspresyonu**

P-kaderin'in normal koşullarda çeşitli epitelyal hücrelerde epitelyal bütünlüğün korunması, kıl foliküllerinin farklılaşması, meme epitelindeki kök hücre fonksiyonlarının korunması vb. homeostatik işlevleri olduğu bilinmektedir. Bunların dışında birçok karsinomda eksprese olabildiği bildirilmiştir. Kanser bağlamında tümör progresyonunu desteklediği meme karsinomu, kolorektal karsinom gibi örnekler olduğu gibi tümör supresyonuna neden olduğu oral skuamöz hücreli karsinom, hepatoselüler karsinom gibi tümör tipleri de bildirilmiştir. <sup>40</sup>

Sarkomlar arasında rabdomyosarkomlarda P-kaderin çalışılmıştır. Alveoler rabdomyosarkomlarda görülen PAX3/7-FOXO1A füzyonunun hedef genlerinden biri de P-kaderin'dir. Bu tümörlerde P-kaderin'in migratuar ve invaziv kapasiteyi arttığı bildirilmektedir. Yanı sıra myoblastik hücrelerde P-kaderin transfeksiyonunun kaderin dönüşümüne yol açtığı, böylece migratuar ve invaziv kapasite elde ettiği gösterilmiştir. <sup>93</sup> Meme karsinomlarına benzer şekilde P-kaderin'in mezenkimal hücrelerde de dinamik hücre-hücre bağlantılarının kazanımı ve kollektif migrasyon kapasitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. <sup>43</sup> Çalışmamızda P-kaderin'in immünohistokimyasal ekspresyonu her ne kadar spesifik bir histolojik alt tipe afinite göstermese de (alveoler rabdomyosarkomlar dahil) sadece metastaz potansiyeli olan tümörlerde ve özellikle sarkomlarda saptanmış, benign ve lokal agresif tümörlerde hiç görülmemiştir.

Bugünkü bilgi birikimiyle bir mezenkimal tümörde P-kaderin ekspresyonunun anlamını doğrudan kestirmek güçtür, çünkü bu ekspresyon tümörün başlangıcıyla ilgili olabileceği gibi ilerleyişle de ilgili olabilir. Alveoler rabdomyosarkom örneğinden gördüğümüz üzere tümör ilişkili translokasyonlar



P-kaderin'i hedef alabilmektedir, benzer bir durum diğer translokasyon sarkomlarında da (örneğin bu çalışmada pozitiflik saptanan şeffaf hücreli sarkom, sinovyal sarkom) söz konusu olabilir. Ancak P-kaderin tümörün evrimi içerisinde sonradan kazandığı, tümör davranışını *modifiye eden* bir belirteç de olabilir ve bu olasılık sarkomlarda neden bu kadar düşük prevalansta görüldüğünü açıklayabilir : Çünkü tümör hücreleri P-kaderini koşullar gerektirirse eksprese ediyordur.

Epitelyal kanserlerde P-kaderin ekspresyonunu arttırabilen diğer süreçler arasında E-kaderin mekanotransdüksiyonu, EMT ve kök hücre sinyalleri bulunmaktadır. Bu ilgilerin sarkomlar açısından da söz konusu olup olmadığı ileri sarkom hücre çalışmalarıyla aydınlanabilir. Çalışmamızda P-kaderin yanı sıra kullanılan antikolarla (ör. E-kaderin, EMT-TF'ler) olan çapraz karşılaştırmalar da bu gibi çalışmaların ışığında anlam kazanabilir.

Literatürde "triple-negatif" meme karsinomlarının gerek primer gerek lenf nodu metastazı odaklarında kök hücre belirteçleriyle birlikte P-kaderin'in immünohistokimyasal ekspresyonunun sık olduğu bildirilmiştir. <sup>94</sup> Çalışmamızdaki lenf nodu metastazı yapan sarkomlarda P-kaderin'e hemen hiç rastlanmamıştır. Dolayısıyla P-kaderin bu grup sarkomların metastaz potansiyeline etkisiz görünmektedir.

Her ne kadar alveoler rabdomyosarkomda P-kaderin tümör agresivitesiyle ilişkili bulunduysa da bunun dışındaki sarkom tiplerinde P-kaderin'in tümörün baskılanmasına yol açıp açmadığının aydınlatılması gereklidir. Çalışmamızın bir diğer önerisi her ne kadar prevalansı düşük de olsa P-kaderin ekspresyonunun rölatif olarak sık görüldüğü (epiteloid sarkom gibi) sarkomlarda - şayet ileriki yıllarda dinamik sarkom hücre çalışmaları da destekler ise - P-kaderin bakımından hedefe yönelik tedavi seçeneklerini gündeme getirmek olabilir.

## 5.6. Mezenkimal Tümörlerde İmmünohistokimyasal ALDH1 Ekspresyonu

Aldehit dehidrojenazlar vücutta çeşitli izoformları bulunan, NAD(P) aracılıklı oksidasyon ve detoksifikasyon reaksiyonlarından sorumlu, hücre içerisinde nükleus, mitokondri veya sitozolde yerleşim gösterebilen bir enzim

ailesidir. ALDH'nın - bir kısmı kanserde rol aldığı bildirilen - çeşitli izoformları bulunmakta olup bunlardan ALDH1A1'in kanser kök hücreleri için daha spesifik bir belirteç olduğu belirtilmektedir.<sup>55</sup> ALDH1'in sarkom hücreleri için de bir kök hücre belirteci olduğu yayınlanmıştır.<sup>54</sup> ALDH1A1'in vücutta erişkin tipi kök hücreler (ör. kolon kriptlerindeki bazal hücreler)<sup>95</sup>, ayrıca Human Protein Atlas verilerine göre periferik sinirler, hepatositler, hematopoetik hücreler, makrofajlar yanı sıra adipositler, fibroblastlar ve endometrial stromal hücreler gibi çeşitli matür mezenkimal hücrelerde de immünohistokimyasal ekspresyonunun bulunabildiği gösterilmiştir.

ALDH1'in kök hücre etkisini, hücre farklılaşması ve proliferasyonunu düzenleyen ara metabolitleri retinoik asitten oluşturarak gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca asetaldehit yıkımını sağlayarak reaktif oksijen radikallerinin kanser kök hücrelerinde apoptozu indüklemesini önlemektedir. Bazı kemoterapötik ilaçların yıkımında da rolü mevcuttur.<sup>55</sup> Kanser kök hücrelerinde de bu yollar üzerinden etkiliyor olabileceğini destekleyen çalışmalar mevcut ise de<sup>96</sup> erişkin tipi kök hücrelerle kanser kök hücrelerinde ALDH1 etkisinin biyokimyasal bakımdan ne ölçüde farklılaştığı kesin olarak bilinmemektedir.<sup>55</sup> ALDH1 ekspresyonunun ayrıca tümör mikroçevresinde bulunan non-neoplastik hücresel elemanlardan eozinofiller, makrofajlar ve dendritik hücrelerde artabildiği kaydedilmiştir. Bu durumun regülatuar T hücre uyarımına ve tümör bağışıklığında bozulmaya yol açtığı ifade edilmektedir.<sup>97</sup> Çalışmamızda da birçok mezenkimal tümörün zemininde, yanı sıra lenf nodu metastazları değerlendirilen olguların lenf nodu örneklerindeki yerli elemanlar arasında, pozitif reaksiyon veren dendritik hücre popülasyonlarıyla sık sık karşılaşılmıştır.

ALDH1'in kök hücre işlevleri yanı sıra hücre farklılaşması ve matürasyonunda rolü olabileceği savunulmaktadır. Tanaka ve ark.'nın hepatoselüler karsinomlarda gerçekleştirdikleri çalışmalarında, mRNA analizlerinde ALDH1A1 düzeylerinde düşüklük görülen tümörlerin; yüksek alfa-fetoprotein düzeyleri, büyük tümör çapı, lenfovasküler invazyon ve daha az diferansiye histopatolojik görünümle ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>98</sup>

Kanserde EMT belirteçleri ve ALDH1 ile immünohistokimyasal ekspresyon arasında da ilişki gösterilmiştir. Nazofarinks karsinomlarında invazyon hattında ALDH1 ekspresyonu yüksek olan olgularda SNAIL ekspresyonunun prevalansı yüksek iken ve E-kaderin ekspresyonunun prevalansı düşük olarak saptanmıştır ( $p < 0,05$ ).<sup>99</sup>

ALDH1 immünohistokimyasını değerlendirirken yukarıda belirtilen durumların dikkate alınması; pozitiflik görülen hücrelerin diferansiye hücreler, erişkin tipi kök hücreler veya kanser kök hücresi olabileceği akılda tutulmalıdır. Bu çalışmada kullanılan ALDH1 klonu her ne kadar literatürdeki karsinom – kanser kök hücresi ilişkisini irdelleyen çalışmalarda kullanılanla aynı ise de<sup>100,101</sup> bu klonun ALDH1A1 için ne derecede spesifik olduğundan emin olunamamıştır.

Çalışmamızda ALDH1'in immünohistokimyasal ekspresyonunun prevalansının genel olarak mezankimal tümör popülasyonunda düşük olduğu gözlenmiştir. Benign ve nadiren metastaz yapan ara davranışlı tümörlerde pozitif olgular hakim iken; lokal agresif ve malign grupta negatif olguların hakim olması metastaz potansiyeliyle ekspresyon arasında bir paralellik bulunmadığına işaret etmektedir. Özellikle malign gruptaki düşük, benign gruptaki yüksek prevalanslar; diferansiyasyon kaybının daha önemli bir belirleyici olabileceğini akla getirmektedir.

2019 yılında Liesche ve ark.'nın yayınladığı bir çalışmada ALDH1'in Schwannom ve nörofibromlarda sıklıkla eksprese olduğu, MPNST'lerde bunlara kıyasla daha düşük görülmeyle birlikte yine yüksek oranlarda saptanabildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla ALDH1'in Schwann hücre farklılaşması gösteren tümörlerin bir belirteci olduğu öne sürülmüştür.<sup>102</sup> Çalışmamızdaki sonuçlar da bunu destekler nitelikte olup Schwannomlar, hibrit schwannom-perinöromların tümü ile nörofibromlar ve MPNST'lerin çoğunda ekspresyon saptanmıştır.

SFT'lerde ALDH1 immünohistokimyasal ekspresyonunun sık görüldüğüne Bouvier ve ark.'nın makalelerinde değinilmiş olup söz konusu çalışma SFT'lerin gen ekspresyon analizlerinde *ALDH1A1*'in sıklıkla aşırı eksprese olduğu verisinden yola çıkılmıştır. SFT'nin imza genetik değişikliği

olan NAB2-STAT6 füzyonunun çeşitli büyüme faktörü sinyallerinin transaktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Bugün itibariyle NAB2-STAT6 füzyonları ile kök hücre programlanması arasında doğrudan bir ilgi bilinmiyorsa da ontolojik analizlerde SFT'ler ile kök hücrelerde gözlenen hücre içi sinyal profilleri arasında benzerlik olduğu bildirilmektedir. <sup>103</sup> Çalışmamızdaki SFT olgularında ALDH1 ile literatürdekine yakın ve yüksek ekspresyon prevalansı gözlenmiştir. Benzer şekilde, kanser kök hücre popülasyonlarından zengin bir histolojik tip olması muhtemel, andiferansiye küçük yuvarlak hücreli bir malign tümör olan desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör olgularının da çoğunda ekspresyon gözlenmiştir.

EMT/MET belirteçleri ve MET profilleri ile ALDH1 ekspresyonu arasında istatistiksel bir ilişki gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Her ne kadar hücre çalışmaları ALDH1'in sarkomlarda önemli bir kök hücre belirteci olduğunu belirtse de malign tümörlerdeki sensitivitesi ve spesifitesi bakımından yeterli destek bulunamamıştır. Öte yandan ALDH1'in mezenkimal tümörlerin farklılaşması konusunda da yol gösterici bir belirteç olabileceği izlenimi alınmıştır.

Çalışmamızın önerisi ALDH1 ekspresyonunun yüksek olarak gözlemlendiği mezenkimal tümör tiplerinin ontolojik analizlerinde sadece kök hücre programlarının değil diferansiyasyon yollarının da incelenmesi olabilir. Örneğin ALDH1 ekspresyonunun prevalansının yüksek bulunduğu translokasyon sarkomlarında (mikzoid liposarkom gibi) bu gözle patogenezi aydınatabilecek, SFT'lerdekine benzer moleküler patern çalışmaları yapılabilir.

## **5.7. Beta-Katenin İle İmmünohistokimyasal Olarak Membranöz**

### **Boyanmaların MET Açısından Anlamı Var mıdır, Varsa Nedir?**

Beta-katenin membranda klasik kaderinlerin (E-kaderin, P-kaderin ve N-kaderin) partneri olan ve alfa-kateninle etkileşerek onun aktin iskeletine bağlanmasını sağlayan, adherens bileşkelere sağlamlık kazandıran bir yapısal moleküldür. <sup>104</sup> Yapısal işlevinin haricinde beta-kateninin fizyolojik şartlarda degradasyon kompleksi tarafından belli bir konsantrasyonda tutulan sitozolik havuzu da bulunmaktadır. Neoplazilerde Wnt/Wingless sinyal yolağının

aktivasyonu ile degradasyonu inhibe olan beta-kateninin nükleusa translokasyonu, c-myc ve cyclin D1 gibi hücre proliferasyonunu yöneten hedef genlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Dolayısıyla bu yönüyle beta-katenin aynı zamanda bir “onkoprotein”dir.

Günümüzde sitozolik beta-katenin havuzu ile membranöz beta-katenin havuzunun birbirinden bağımsız olup olmadığı tam çözülememiştir. Weinberg’in “The Biology Of Cancer” kitabının ikinci edisyonunda, E-kaderin kaybı ile giden bazı kanserlerde nükleer beta-katenin akümüülasyonunun izlenmediği, dolayısıyla bu iki havuzun insanlarda birbirinden ayrı olabileceği ve bağımsız düzenlenebileceği ifade edilmektedir.<sup>105</sup> Beta-kateninle ilgili önemli derleme makalelerden olan Valenta ve ark.’larının yayınında sitoplazmik beta-kateninin üç ayrı akıbetinin olabileceği şemalaştırılmıştır: 1. Serbest APC tarafından tek başına sitoplazmada tutulma, 2. Degradasyon kompleksine girme ve 3. Adherens bileşkelere katılarak hareketsizleştirilme.<sup>106</sup> Nitekim E-kaderinin beta-kateninin nükleer lokalizasyonunu engelleyebildiğini bildiren yayınlar tarafından da E-kaderin’in beta-katenin üzerinde hapsedici bir etki gösterebileceği ifade edilmektedir.<sup>27</sup> Beta-kateninin membrandaki esas partneri E-kaderin olmakla birlikte, aslında tüm kaderinlerin sitoplazmik ünitelerine bağlanabildiği bildirilmiştir.<sup>27,106</sup>

Sarkom çalışmalarında membranöz beta-kateninin daha çok epiteloïd morfolojili tümörlerde gözleendiği ve sitoplazmik/nükleer boyanmanın (yaygınlık ve intensiteyi bir arada değerlendiren skorlar dahilinde) yüksek dereceli sarkomlarda Ki67 proliferatif indeksiyle korele olduğu bildirilmiştir.<sup>60</sup>

Çalışmamızda membranöz beta-katenin ekspresyonu gösteren olgularda (%80), göstermeyenlere kıyasla (%46,9) E-kaderin ekspresyonunun prevalansı yüksek bulunmuştur (p=0.00). Benzer bir ilişki P-kaderin için de geçerlidir (p=0.00), membranöz beta-katenin ekspresyonu gösterenlerde P-kaderin prevalansı göstermeyenlere kıyasla yüksektir. Bu bulgular mezenkimal tümör bağlamı içerisinde membranda beta-katenin ekspresyonu olan tümörlerde E-kaderin veya P-kaderin ile koekspresyon görülme olasılığının arttığına işaret etmektedir (Odds oranları sırasıyla 4,523 ve 5,702).

E-kaderin ekspresyonunun varlığı mezenkimal tümörlerde her ne kadar en az MET-benzeri fenomenlerin varlığına işaret etse de P-kaderin için aynı ilgiyi kurmak mümkün değildir. Hatta karsinomlardan edinilen birikimler P-kaderin'in MET değil EMT programlarında devreye girebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca membranöz beta katenin<sup>+</sup>/E-kaderin<sup>-</sup> olan olgularda P-kaderin ekspresyonunun prevalansı düşük olup (%4,7) bu grupta beta-kateninin partnerleri olasılıkla mezenkimal kaderinlerdir. E-kaderin ekspresyonunun görülmediği olgularda da (E-kaderin dışı epitelyal belirteçlerin ekspresyonu veya EMT-TF'lerin susturulması ile) MET-benzeri bir programlanmanın yine de söz konusu olabileceği akılda tutulmalıdır.

Mevcut bulgular ışığında membranöz beta-kateninin bir MET belirteci olabileceğini destekleyen yeterli veri bulunmamaktadır. Bu konunun aydınlatılmasında çalışmamızın önerileri şunlar olabilir:

- Hücre çalışmalarıyla mezenkimal tümör hücrelerinde E-kaderinin veya P-kaderinin indüklenmesi ile beta-kateninin membrana ko-lokalize olup olmadığının irdelenmesi
- İmmünohistokimyasal olarak farklı kaderin tiplerinin üzerine membranöz beta-katenin ile "double-staining" kantitatif analizler yapılması
- P-kaderin ekspresyonunun mezenkimal tümör hücrelerinde EMT programlarıyla ne yönde bir ilişkisinin olduğunun irdelenmesi

## 5.8. Mezenkimal Tümörlerde Nükleer Beta-Katenin

Literatürde hem yumuşak doku hem de kemik tümörlerinde beta-katenin ile değişken nükleer ekspresyon prevalansları bildirilmiştir. Desmoid fibromatozis bunların içerisinde prevalansın en yüksek olduğu tümör grubudur, nükleer-beta katenin bu grupta tanısal bir belirteç olarak kullanılmaktadır ve altta yatan aktive edici beta-katenin mutasyonları ile ilişkilidir.

Mevcut seride desmoid fibromatozis, soliter fibröz tümör, sinovyal sarkom ve dediferansiye liposarkomlardaki ekspresyon varlığı literatürle paralellik göstermektedir. <sup>45,46</sup> Bunların dışında incelenen üç ekstraskeletal mikzoid kondrosarkom olgusunun ikisinde ve incelenen tek myoepitelyal karsinom olgusunda saptanması özgün bulgulardır.

Aslında ekstraskeletal mikzoid kondrosarkomların gen ekspresyon profillemesinde Wnt/beta-katenin sinyal yolağının bir inhibitörü, morfogenezde rol alan, salgılanan bir protein olan *Dickkopf related protein 1 (DKK1)*'in geninin aşırı eksprese olduğu, hatta bu tümörde Wnt sinyal yolağı modülasyonunun bir tedavi seçeneği olabileceği öne sürülmüştür. <sup>107,108</sup> Çalışmamızda ekstraskeletal mikzoid kondrosarkomlarda gözlenen yüksek nükleer-beta katenin prevalansı literatür bilgileriyle uyumsuzdur ve Wnt sinyalinin diğer düzenleyicileriyle tümörde upregüle olan diğer genlerin ilgisi aydınlanırsa daha iyi anlaşılabilir.

Tükrük bezinin myoepitelyal karsinomlarıyla yumuşak dokunun myoepitelyal karsinomları arasında genetik akrabalıklar bulunmaktadır. Bunların arasında *PLAG1* gen rearanjmanları da bulunmaktadır. *PLAG1* transgenik farelerde gelişen pleomorfik adenomlarda Wnt sinyalinde ve beta-kateninde upregülasyon görülmesinden hareketle <sup>109</sup> tükrük bezinin myoepitelyal karsinomlarında da *PLAG1* – Wnt sinyali ilişkili çalışmalar yapılmıştır. Bugün itibariyle *PLAG1*'in tükrük bezinin myoepitelyal karsinomlarında Wnt üzerinden onkojenik etki gösterdiğini destekleyen bir bulgu mevcut değilse de <sup>110</sup> bu tümörlerde beta-katenin aşırı ekspresyonu sürpriz bir bulgu gibi görünmemektedir.

### **5.9. MET Belirteçleri Ve Çalışmada Kullanılan Diğer Belirteçler Patoloji Pratiğinde Tanısal Araçlar Olarak Kullanılabilir Mi?**

*Mezenkimal tümörler vs. Non-mezenkimal tümörler* : Karsinomlar ve sarkomlar arasında P-kaderin ve membranöz beta-katenin ekspresyonlarının prevalansları bakımından fark bulunmuştur. Bu ayrım sarkomatoid karsinom ve sarkomların ayrımında değerli olabilir. Literatürde bu ayrıma eğilen önemli bir çalışmayı Cates ve ark. gerçekleştirmiştir <sup>17</sup>. Çalışmada aralarında *P-kaderin*'in de bulunduğu geniş bir epitelyal antikor paneliyle iğsi hücreli sarkomlar (n=21) ve sarkomatoid karsinomlar (n=27) karşılaştırılmıştır. Söz konusu ayrımında epitelyal belirteçlerden sadece AE1/AE3 ile fark bildirilmiştir. Her ne kadar bu çalışmadaki sarkom örnekleme beş histolojik alt tip ile sınırlı olsa da bulgular, P-kaderin'in bu ayrımında güvenilir bir araç olmadığını

desteklemektedir. Nitekim bu tez çalışmasında kullanılan karsinom kontrol örneklerinde de sarkomatoid morfolojili olgular yeterince temsil edilmemiştir, dolayısıyla elde edilen fark bununla da ilişkili olabilir. *Membranöz beta-katenin* ekspresyonu açısından elde edilen sonuçlar özgün niteliktedir. Üstelik sarkom-karsinom ayrımı yanı sıra sarkom-melanom ayrımında da fark saptanmıştır. Ancak şunları göz önünde bulundurmak gerekir: 1. Bu çalışmada membranöz beta-katenin pozitifliği için belirlenen kriterler subjektiftir ve bu durum gözlemciler arası fark açısından ek çalışmaları gerekli kılmaktadır. 2. İmmünohistokimyasal incelemede belirgin olarak görülemezse bile immüno floresan incelemelerde mezenkimal hücre membranlarında beta-katenin pozitifliği saptanabilmektedir. Bu nedenle membranöz boyanmanın mezenkimal tümörlerde seyrek görülüşü, immünohistokimyasal pozitifliğin dilüsyondan kolay etkilenebilmesi ile ilişkili de olabilir. <sup>111</sup>

*Dediferansiye liposarkom vs. mikzofibrosarkom:* Dediferansiye liposarkomların çok çeşitli histolojik paternleri olabilmektedir, bunların arasında mikzofibrosarkom-benzeri varyant da yer almaktadır. Her ne kadar mikzofibrosarkomlarda MDM2 ve CDK4 koekspresyonu nadir görülse de, bu tümörlerde MDM2 ekspresyonuna ve nadiren CDK4 ekspresyonuna rastlanabilmektedir. Benzer şekilde mikzofibrosarkomlarda MDM2/CDK4 gen amplifikasyonu görülebilmektedir ve bu durum ayırıcı tanıda tuzak oluşturmaktadır. <sup>112</sup> Mikzofibrosarkom örneğinde çoğunlukla yüksek dereceli olguları taramış olan bu tez çalışmasında SLUG ile ekspresyon kaybının prevalansı mikzofibrosarkomlarda dediferansiye liposarkomlara kıyasla daha sık bulunmuştur. Söz konusu ayırım; rezeksiyon spesimenlerinde, uygun klinik bağlamda, özellikle lipojenik bileşenin tespit edilemediği, yüksek dereceli mikzofibrosarkom histolojisi izlenen olgularda gerekli olabilir. Yine de bu iki antitenin ayrımın öneminin klinikten ziyade akademik olduğu da savunulabilir.

*Ewing sarkom vs. Ewing-benzeri sarkom ve az diferansiye sinovyal sarkom:* Ewing sarkomlarda SLUG ile ekspresyon kaybının prevalansı yine küçük yuvarlak hücreli sarkom ayırıcı tanısında yer alan diğer antitelerden Ewing-benzeri sarkomlar ve az diferansiye sinovyal sarkomlara kıyasla yüksek



bulunmuştur. Ewing-benzeri sarkomlarla Ewing sarkom ayrımında histolojik kriterler ön plana çıkmaktadır, yine de kesin ayırıcı tanı için uygun moleküler tetkikin triajı önemlidir. Benzer şekilde sinovyal sarkomlarda da söz konusu triaj, maliyet etkinlik açısından önemlidir. Nitekim Ewing sarkomlarda olduğu gibi sinovyal sarkomlarda Nkx2.2, sitokeratinler, TLE1 ve CD99 gibi konvansiyonel immünohistokimyasal belirteçler sıklıkla pozitif ya da pozitif olabilmektedir. SLUG ekspresyonunun kaybı bu bağlamda yardımcı olabilir. Ancak bu hipotez için çalışmamızda incelenen Ewing sarkom örneklerinin nispeten sınırlı olduğunu belirtmek gerekir (n=4).

*Desmoid fibromatozis vs. monofazik sinovyal sarkom:* Desmoid fibromatozis olgularında TWIST1 ekspresyonunun prevalansı monofazik sinovyal sarkomlara kıyasla yüksek bulunmuştur. TWIST1 Wnt'in "downstream"inde de aktive olabilecek bir faktördür. Her ne kadar çalışmamızda sinovyal sarkomda nükleer beta-katenin ekspresyonunun prevalansı düşük bulduysa (1/47) da literatürdeki oranlar genellikle bundan daha yüksektir; hatta primer tümörlerde %40, metastatik olgularda %70'e varan değerler bildirilmiştir.<sup>60,113</sup> TWIST1 aşırı ekspresyonunun nükleer beta-katenin ekspresyonu ile korele olduğu, dolayısıyla sinovyal sarkom olgularından nükleer beta-katenin ekspresyonu gösterenlerin yine TWIST1 ekspresyonu göstereceği düşünülebilir. Bu gözle tekrar bakıldığında çalışmamızdaki nükleer beta-katenin ekspresyonu gösteren sinovyal sarkom olgusunda TWIST1 ekspresyonunda kayıp olduğu görülmektedir. Nitekim serideki tüm mezankimal tümörler bir arada değerlendirildiğinde de TWIST1 ekspresyonu ile nükleer beta-katenin ekspresyonu arasında da doğrudan bir ilişki saptanmamıştır (p>0,05). Özellikle kor biyopsilerde desmoid fibromatozisin ayırıcı tanıda ön plana çıktığı olgularda TWIST1'in beta-katenin ve SMA'ya yardımcı bir tetkik olarak kullanılması düşünülebilir.

*Mikzoid liposarkom vs. Mikzofibrosarkom:* Mikzoid liposarkomlarda TWIST1 ekspresyonunun ve ALDH1 ile yaygın ekspresyonunun prevalansı mikzofibrosarkomlara kıyasla yüksek bulunmuştur. Mikzofibrosarkomlarda vasküler çatı mikzoid liposarkomları andırır şekilde pleksiform nitelikte olabilmektedir. Öte yandan mikzoid liposarkomların selüleritesi yüksek,

nükleer derecesinin yükseldiği daha yüksek dereceli formları mevcuttur. Mikzofibrosarkomlarda SMA veya CD34 pozitivitesi görülebilir veya görülmeyebilir. DDIT3 FISH'in uygulanamadığı ya da uygulanmasının maliyet etkin bulunmadığı koşullarda bu iki antitenin ayırımında mikzoid liposarkom tanısına destek olabilecek immünohistokimyasal belirteçler olarak TWIST1 ve ALDH1'in kullanılması düşünülebilir.

*Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör vs. Ewing sarkom:* Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörlerde E-kaderin ekspresyonunun prevalansı Ewing sarkomlara kıyasla yüksek bulunmuştur. E-kaderin desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör olgularının tümünde pozitifken Ewing sarkomların tümünde negatiftir. Desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümör – Ewing sarkomu ayırıcı tanısında epitelyal belirteç olarak kullanılan EMA ekspresyonunun prevalansı Ewing sarkomlarda çok seyrek de olsa bildirilmiştir ve E-kaderin'e kıyasla yüksektir. <sup>114</sup> Ayrıca Ewing sarkom olgularında E-kaderin'in immünohistokimyasal ekspresyonuna hiç rastlanmadığını belirten yayınlar da mevcuttur. <sup>33</sup> Bu bulgu Ewing sarkomundaki MET süreçlerinde, bir adherens bileşke molekülü olan E-kaderin'den ziyade sıkı bileşke proteinlerinin (ZO1, occludin gibi) upregüle olduğu bilgisiyyle de uyumludur. Dolayısıyla bu iki antitenin ayırımında E-kaderin'in EMA'ya kıyasla tanısal gücü daha yüksek bir belirteç olabileceği savunulabilir, ancak geniş örnekleme çalışmaya ihtiyaç vardır.

*Alveoler rabdomyosarkom vs. Ewing sarkom:* Alveoler rabdomyosarkom – Ewing sarkom ayırımında da E-kaderin ekspresyonu bakımından fark bulunmuştur: Tüm alveoler rabdomyosarkom olguları E-kaderin pozitifken Ewing sarkomda ekspresyon saptanmamıştır. Myojenik belirteçler ve moleküler tekniklere yardımcı olarak E-kaderin'in alveoler rabdomyosarkom tanısını desteklemek amacıyla kullanılması düşünülebilir.

*SFT vs. monofazik sinovyal sarkom:* Soliter fibröz tümörlerde ALDH1 ekspresyonu monofazik sinovyal sarkomlara kıyasla yüksek bulunmuştur. Bu fark daha önce Bouvier ve ark.'nın çalışmasında da vurgulanmıştır. <sup>56</sup> Bu çalışmada soliter fibröz tümörlerin tüm genom analizlerinde ALDH1A1 geninin en sık eksprese olan genlerden olduğu bildirilmiştir. Bu bilgi ışığında

SFT'lerdeki immünohistokimyasal ALDH1 ekspresyonunun meningiom ve sinovyal sarkom ayırımında güçlü bir belirteç olduğunu göstermişler, bu bulguyu karşılaştırmalı mRNA analizleriyle de desteklemişlerdir. Söz konusu ayırım için ALDH1 immünohistokimyasının STAT6'ya alternatif ve/veya destekleyici bir belirteç olarak kullanılması savunulabilir.

*MPNST vs. monofazik sinovyal sarkom:* MPNST'de ALDH1 ekspresyonu monofazik sinovyal sarkomlara kıyasla yüksek bulunmuştur. MPNST ve monofazik sinovyal sarkomun immünohistokimya düzeyinde ayırımı güç olabilmektedir. Bugüne kadar bu ayırmada kullanılan belirteçlerin arasında S100, SOX10, H3K27me3 kaybı ve TLE1 bulunmaktadır. Ancak bu belirteçlerin tanısal güvenilirliği sınırlı olabilmektedir. MPNST için S100 ve SOX10'un sensitivitesi düşüktür. H3K27me3 immünohistokimyasının değerlendirmesi ekspresyon kaybını temel almaktadır ve öznel olabileceği savunulabilir. Benzer şekilde TLE1'in sinovyal sarkomlardakinin aksine MPNST'lerde güçlü ve yaygın olmayışı beklenmektedir ki bu da öznel olabilecek bir değerlendirmedir. MPNST'lerde ALDH1 ekspresyonunun prevalansının nispeten yüksek oluşu pozitif bir bulgu olarak önemli görünmektedir. ALDH1'in tümör zemininde yer yer yoğun olarak bulunabilen dendritik hücrelerde de boyanması değerlendirmeyi güçleştirebilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- 1 Yang, J. *et al.* Integrated proteomics and genomics analysis reveals a novel mesenchymal to epithelial reverting transition in leiomyosarcoma through regulation of slug. *Mol Cell Proteomics* **9**, 2405-2413, doi:10.1074/mcp.M110.000240 (2010).
- 2 Pulkka, O. P. *et al.* SLUG transcription factor: a pro-survival and prognostic factor in gastrointestinal stromal tumour. *Br J Cancer* **116**, 1195-1202, doi:10.1038/bjc.2017.82 (2017).
- 3 Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. & Weinberg, R. A. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 128-134, doi:10.1038/nrc.2017.118 (2018).
- 4 Kovecsi, A. *et al.* Paradoxical expression pattern of the epithelial mesenchymal transition-related biomarkers CD44, SLUG, N-cadherin and VSIG1/Glycoprotein A34 in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastrointest Oncol* **9**, 436-443, doi:10.4251/wjgo.v9.i11.436 (2017).
- 5 Yang, J. *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, doi:10.1038/s41580-020-0237-9 (2020).
- 6 Greenburg, G. & Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* **95**, 333-339, doi:10.1083/jcb.95.1.333 (1982).
- 7 Yang, J. *et al.* Mesenchymal to epithelial transition in sarcomas. *Eur J Cancer* **50**, 593-601, doi:10.1016/j.ejca.2013.11.006 (2014).
- 8 Chen, J. *et al.* MicroRNA-130a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma by targeting PTEN. *Oncol Rep* **35**, 3285-3292, doi:10.3892/or.2016.4719 (2016).
- 9 Saito, T., Nagai, M. & Ladanyi, M. SYT-SSX1 and SYT-SSX2 interfere with repression of E-cadherin by snail and slug: a potential mechanism for aberrant mesenchymal to epithelial transition in human synovial sarcoma. *Cancer Res* **66**, 6919-6927, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3697 (2006).
- 10 Pridgeon, M. G., Grohar, P. J., Steensma, M. R. & Williams, B. O. Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr Osteoporos Rep* **15**, 239-246, doi:10.1007/s11914-017-0377-9 (2017).

- 11 Li, C. M. *et al.* Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* **160**, 2181-2190, doi:10.1016/S0002-9440(10)61166-2 (2002).
- 12 Williams, E. D., Gao, D., Redfern, A. & Thompson, E. W. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* **19**, 716-732, doi:10.1038/s41568-019-0213-x (2019).
- 13 Yao, D., Dai, C. & Peng, S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res* **9**, 1608-1620, doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0568 (2011).
- 14 Sannino, G., Marchetto, A., Kirchner, T. & Grunewald, T. G. P. Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Mesenchymal Tumors: A Paradox in Sarcomas? *Cancer Res* **77**, 4556-4561, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0032 (2017).
- 15 Saito, T. The SYT-SSX fusion protein and histological epithelial differentiation in synovial sarcoma: relationship with extracellular matrix remodeling. *Int J Clin Exp Pathol* **6**, 2272-2279 (2013).
- 16 Savagner, P., Yamada, K. M. & Thiery, J. P. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **137**, 1403-1419, doi:10.1083/jcb.137.6.1403 (1997).
- 17 Cates, J. M. *et al.* Markers of epithelial-mesenchymal transition and epithelial differentiation in sarcomatoid carcinoma: utility in the differential diagnosis with sarcoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **16**, 251-262, doi:10.1097/PAI.0b013e318156e9b4 (2008).
- 18 Lee, K. W., Yeo, S. Y., Sung, C. O. & Kim, S. H. Twist1 is a key regulator of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res* **75**, 73-85, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0350 (2015).
- 19 Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 69-84, doi:10.1038/s41580-018-0080-4 (2019).
- 20 Khan, M. A., Chen, H. C., Zhang, D. & Fu, J. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol* **34**, 2497-2506, doi:10.1007/s13277-013-1002-x (2013).

- 21 Choo, S., Wang, P., Newbury, R., Roberts, W. & Yang, J. Reactivation of TWIST1 contributes to Ewing sarcoma metastasis. *Pediatr Blood Cancer* **65**, doi:10.1002/pbc.26721 (2018).
- 22 Lee, K. W., Lee, N. K., Ham, S., Roh, T. Y. & Kim, S. H. Twist1 is essential in maintaining mesenchymal state and tumor-initiating properties in synovial sarcoma. *Cancer Lett* **343**, 62-73, doi:10.1016/j.canlet.2013.09.013 (2014).
- 23 Xu, X. M., Liu, W., Cao, Z. H. & Liu, M. X. Effects of ZEB1 on regulating osteosarcoma cells via NF-kappaB/iNOS. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **21**, 1184-1190 (2017).
- 24 Shen, A., Zhang, Y., Yang, H., Xu, R. & Huang, G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. *J Surg Oncol* **105**, 830-834, doi:10.1002/jso.23012 (2012).
- 25 Alba-Castellon, L. *et al.* Snail1 expression is required for sarcomagenesis. *Neoplasia* **16**, 413-421, doi:10.1016/j.neo.2014.05.002 (2014).
- 26 Chaffer, C. L., Thompson, E. W. & Williams, E. D. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* **185**, 7-19, doi:10.1159/000101298 (2007).
- 27 Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S. & Kemler, R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* **112 ( Pt 8)**, 1237-1245 (1999).
- 28 Liu, Y. N. *et al.* Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene* **24**, 8277-8290, doi:10.1038/sj.onc.1208991 (2005).
- 29 Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K. R. Cadherin switching. *J Cell Sci* **121**, 727-735, doi:10.1242/jcs.000455 (2008).
- 30 Sato, H., Hasegawa, T., Abe, Y., Sakai, H. & Hirohashi, S. Expression of E-cadherin in bone and soft tissue sarcomas: a possible role in epithelial differentiation. *Hum Pathol* **30**, 1344-1349, doi:10.1016/s0046-8177(99)90066-7 (1999).
- 31 Wang, N. *et al.* Down-regulated E-cadherin expression is associated with poor five-year overall survival in bone and soft tissue sarcoma: results of a meta-analysis. *PLoS One* **10**, e0121448, doi:10.1371/journal.pone.0121448 (2015).
- 32 Fitzgerald, M. P. *et al.* Human Chondrosarcoma Cells Acquire an Epithelial-Like Gene Expression Pattern via an Epigenetic Switch: Evidence for Mesenchymal-Epithelial Transition during Sarcomagenesis. *Sarcoma* **2011**, 598218, doi:10.1155/2011/598218 (2011).

- 33 Schuetz, A. N. *et al.* Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Mod Pathol* **18**, 1403-1410, doi:10.1038/modpathol.3800435 (2005).
- 34 Franzetti, G. A. *et al.* Cell-to-cell heterogeneity of EWSR1-FLI1 activity determines proliferation/migration choices in Ewing sarcoma cells. *Oncogene* **36**, 3505-3514, doi:10.1038/onc.2016.498 (2017).
- 35 Folpe, A. L. *et al.* Expression of claudin-1, a recently described tight junction-associated protein, distinguishes soft tissue perineurioma from potential mimics. *Am J Surg Pathol* **26**, 1620-1626, doi:10.1097/00000478-200212000-00010 (2002).
- 36 Ware, K. E. *et al.* Induction of Mesenchymal-Epithelial Transitions in Sarcoma Cells. *J Vis Exp*, doi:10.3791/55520 (2017).
- 37 Rowton, M. *et al.* Regulation of mesenchymal-to-epithelial transition by PARAXIS during somitogenesis. *Dev Dyn* **242**, 1332-1344, doi:10.1002/dvdy.24033 (2013).
- 38 Rowton, M. *The Role of PARAXIS as a Mediator of Epithelial-mesenchymal Transitions During the Development of the Vertebrate Musculoskeletal System*, Arizona State University, (2013).
- 39 Rodriguez-Fraticelli, A. E. *et al.* Single-cell lineage tracing unveils a role for TCF15 in haematopoiesis. *Nature* **583**, 585-589, doi:10.1038/s41586-020-2503-6 (2020).
- 40 Vieira, A. F. & Paredes, J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol Cancer* **14**, 178, doi:10.1186/s12943-015-0448-4 (2015).
- 41 Vieira, A. F. *et al.* P-cadherin: a useful biomarker for axillary-based breast cancer decisions in the clinical practice. *Mod Pathol* **30**, 698-709, doi:10.1038/modpathol.2016.232 (2017).
- 42 Thuault, S. *et al.* P-cadherin is a direct PAX3-FOXO1A target involved in alveolar rhabdomyosarcoma aggressiveness. *Oncogene* **32**, 1876-1887, doi:10.1038/onc.2012.217 (2013).
- 43 Plutoni, C., Bazellieres, E. & Gauthier-Rouviere, C. P-cadherin-mediated Rho GTPase regulation during collective cell migration. *Small GTPases* **7**, 156-163, doi:10.1080/21541248.2016.1173772 (2016).
- 44 Kimelman, D. & Xu, W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**, 7482-7491, doi:10.1038/sj.onc.1210055 (2006).

- 45 Montgomery, E. & Folpe, A. L. The diagnostic value of beta-catenin immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol* **12**, 350-356, doi:10.1097/01.pap.0000194628.58501.71 (2005).
- 46 Ng, T. L. *et al.* Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol* **18**, 68-74, doi:10.1038/modpathol.3800272 (2005).
- 47 Rakheja, D., Molberg, K. H., Roberts, C. A. & Jaiswal, V. R. Immunohistochemical expression of beta-catenin in solitary fibrous tumors. *Arch Pathol Lab Med* **129**, 776-779, doi:10.1043/1543-2165(2005)129[776:IEOCIS]2.0.CO;2 (2005).
- 48 Agaimy, A. & Haller, F. CTNNB1 (beta-Catenin)-altered Neoplasia: A Review Focusing on Soft Tissue Neoplasms and Parenchymal Lesions of Uncertain Histogenesis. *Adv Anat Pathol* **23**, 1-12, doi:10.1097/PAP.000000000000104 (2016).
- 49 Kim, W. K. *et al.* beta-catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers. *Sci Rep* **9**, 18440, doi:10.1038/s41598-019-54890-9 (2019).
- 50 Sládek, N. E., Kollander, R., Sreerama, L. & Kiang, D. T. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother Pharmacol* **49**, 309-321, doi:10.1007/s00280-001-0412-4 (2002).
- 51 Magni, M. *et al.* Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood* **87**, 1097-1103 (1996).
- 52 Hingorani, P. *et al.* Preclinical activity of palifosfamide lysine (ZIO-201) in pediatric sarcomas including oxazaphosphorine-resistant osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**, 733-740, doi:10.1007/s00280-008-0922-4 (2009).
- 53 Ricardo, S. *et al.* Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol* **64**, 937-946, doi:10.1136/jcp.2011.090456 (2011).
- 54 Lohberger, B. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma. *PLoS One* **7**, e43664, doi:10.1371/journal.pone.0043664 (2012).
- 55 Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. & Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* **7**, 11018-11032, doi:10.18632/oncotarget.6920 (2016).



- 56 Bouvier, C. *et al.* ALDH1 is an immunohistochemical diagnostic marker for solitary fibrous tumours and haemangiopericytomas of the meninges emerging from gene profiling study. *Acta Neuropathol Commun* **1**, 10, doi:10.1186/2051-5960-1-10 (2013).
- 57 Kosemehmetoglu, K., Ozogul, E., Babaoglu, B., Tezel, G. G. & Gedikoglu, G. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Malignant Mesenchymal Tumors. *Turk Patoloji Derg* **1**, 192-197, doi:10.5146/tjpath.2017.01395 (2017).
- 58 Jorgensen, C. L. T. *et al.* Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers and phenotypes during breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* **181**, 369-381, doi:10.1007/s10549-020-05627-0 (2020).
- 59 Merikallio, H. *et al.* Expression of snail, twist, and Zeb1 in malignant mesothelioma. *APMIS* **121**, 1-10, doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02931.x (2013).
- 60 Kuhnen, C. *et al.* Beta-catenin in soft tissue sarcomas: expression is related to proliferative activity in high-grade sarcomas. *Mod Pathol* **13**, 1005-1013, doi:10.1038/modpathol.3880181 (2000).
- 61 Somarelli, J. A. *et al.* Mesenchymal-Epithelial Transition in Sarcomas Is Controlled by the Combinatorial Expression of MicroRNA 200s and GRHL2. *Mol Cell Biol* **36**, 2503-2513, doi:10.1128/MCB.00373-16 (2016).
- 62 Jolly, M. K. *et al.* E-Cadherin Represses Anchorage-Independent Growth in Sarcomas through Both Signaling and Mechanical Mechanisms. *Mol Cancer Res* **17**, 1391-1402, doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-0763 (2019).
- 63 Saad, A. G. & Collins, M. H. Prognostic value of MIB-1, E-cadherin, and CD44 in pediatric chordomas. *Pediatr Dev Pathol* **8**, 362-368, doi:10.1007/s10024-005-1127-z (2005).
- 64 Wang, H. & Unternaehrer, J. J. Epithelial-mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: At the Crossroads of Differentiation and Dedifferentiation. *Dev Dyn* **248**, 10-20, doi:10.1002/dvdy.24678 (2019).
- 65 Chang, C. J. *et al.* p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol* **13**, 317-323, doi:10.1038/ncb2173 (2011).
- 66 Zhu, Q. Q., Ma, C., Wang, Q., Song, Y. & Lv, T. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol* **37**, 185-197, doi:10.1007/s13277-015-4450-7 (2016).

- 67 Drapela, S., Bouchal, J., Jolly, M. K., Culig, Z. & Soucek, K. ZEB1: A Critical Regulator of Cell Plasticity, DNA Damage Response, and Therapy Resistance. *Front Mol Biosci* **7**, 36, doi:10.3389/fmolb.2020.00036 (2020).
- 68 Guo, Y. *et al.* Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells. *J Orthop Res* **25**, 964-971, doi:10.1002/jor.20356 (2007).
- 69 Helbing, D. L., Schulz, A. & Morrison, H. Pathomechanisms in schwannoma development and progression. *Oncogene* **39**, 5421-5429, doi:10.1038/s41388-020-1374-5 (2020).
- 70 Bischoff, J. Progenitor cells in infantile hemangioma. *J Craniofac Surg* **20 Suppl 1**, 695-697, doi:10.1097/SCS.0b013e318193d6ac (2009).
- 71 Esteban, M. A. *et al.* The mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* **22**, 423-428, doi:10.1016/j.gde.2012.09.004 (2012).
- 72 Pei, D., Shu, X., Gassama-Diagne, A. & Thiery, J. P. Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming. *Nat Cell Biol* **21**, 44-53, doi:10.1038/s41556-018-0195-z (2019).
- 73 Eid, J. E. & Garcia, C. B. Reprogramming of mesenchymal stem cells by oncogenes. *Semin Cancer Biol* **32**, 18-31, doi:10.1016/j.semcancer.2014.05.005 (2015).
- 74 Grunewald, T. G. P. *et al.* Ewing sarcoma. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 5, doi:10.1038/s41572-018-0003-x (2018).
- 75 Board, W. C. o. T. E. *Soft Tissue and Bone Tumours*. (International Agency for Research on Cancer, 2020).
- 76 Taylor, B. S. *et al.* Frequent alterations and epigenetic silencing of differentiation pathway genes in structurally rearranged liposarcomas. *Cancer Discov* **1**, 587-597, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0181 (2011).
- 77 Nathanson, S. D. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* **98**, 413-423, doi:10.1002/cncr.11464 (2003).
- 78 Kawada, K. & Taketo, M. M. Significance and Mechanism of Lymph Node Metastasis in Cancer Progression. *Cancer Research* **71**, 1214-1218, doi:10.1158/0008-5472.Can-10-3277 (2011).
- 79 Network®, N. C. C. *NCCN Guidelines for Patients® Soft Tissue Sarcoma*. (National Comprehensive Cancer Network® (NCCN®), 2020).

- 80 Krebs, A. M. *et al.* The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol* **19**, 518-529, doi:10.1038/ncb3513 (2017).
- 81 Karlsson, M. C., Gonzalez, S. F., Welin, J. & Fuxe, J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Mol Oncol* **11**, 781-791, doi:10.1002/1878-0261.12092 (2017).
- 82 Guo, W. *et al.* Slug and Sox9 Cooperatively Determine the Mammary Stem Cell State. *Cell* **148**, 1015-1028, doi:10.1016/j.cell.2012.02.008 (2012).
- 83 Wiles, E. T., Bell, R., Thomas, D., Beckerle, M. & Lessnick, S. L. ZEB2 Represses the Epithelial Phenotype and Facilitates Metastasis in Ewing Sarcoma. *Genes Cancer* **4**, 486-500, doi:10.1177/1947601913506115 (2013).
- 84 Iwadate, Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* **11**, 1615-1620, doi:10.3892/ol.2016.4113 (2016).
- 85 Jolly, M. K., Ware, K. E., Gilja, S., Somarelli, J. A. & Levine, H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol* **11**, 755-769, doi:10.1002/1878-0261.12083 (2017).
- 86 Brabletz, T. To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer* **12**, 425-436, doi:10.1038/nrc3265 (2012).
- 87 Somarelli, J. A. *et al.* Distinct routes to metastasis: plasticity-dependent and plasticity-independent pathways. *Oncogene* **35**, 4302-4311, doi:10.1038/onc.2015.497 (2016).
- 88 Comaills, V. *et al.* Genomic Instability Is Induced by Persistent Proliferation of Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep* **17**, 2632-2647, doi:10.1016/j.celrep.2016.11.022 (2016).
- 89 Linker, C. *et al.* beta-Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis. *Development* **132**, 3895-3905, doi:10.1242/dev.01961 (2005).
- 90 Davies, O. R. *et al.* Tcf15 primes pluripotent cells for differentiation. *Cell Rep* **3**, 472-484, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.017 (2013).
- 91 Burgess, R., Rawls, A., Brown, D., Bradley, A. & Olson, E. N. Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature* **384**, 570-573, doi:10.1038/384570a0 (1996).
- 92 Delfini, M. C., Hirsinger, E., Pourquie, O. & Duprez, D. Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development* **127**, 5213-5224 (2000).

- 93 Plutoni, C. *et al.* P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces. *J Cell Biol* **212**, 199-217, doi:10.1083/jcb.201505105 (2016).
- 94 Ribeiro, A. S. & Paredes, J. P-Cadherin Linking Breast Cancer Stem Cells and Invasion: A Promising Marker to Identify an "Intermediate/Metastable" EMT State. *Front Oncol* **4**, 371, doi:10.3389/fonc.2014.00371 (2014).
- 95 Huang, E. H. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* **69**, 3382-3389, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4418 (2009).
- 96 Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A. & Lee, P. W. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* **10**, 1378-1384, doi:10.4161/cc.10.9.15486 (2011).
- 97 Bazewicz, C. G., Dinavahi, S. S., Schell, T. D. & Robertson, G. P. Aldehyde dehydrogenase in regulatory T-cell development, immunity and cancer. *Immunology* **156**, 47-55, doi:10.1111/imm.13016 (2019).
- 98 Tanaka, K. *et al.* ALDH1A1-overexpressing cells are differentiated cells but not cancer stem or progenitor cells in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **6**, 24722-24732, doi:10.18632/oncotarget.4406 (2015).
- 99 Luo, W. R. & Yao, K. T. Cancer stem cell characteristics, ALDH1 expression in the invasive front of nasopharyngeal carcinoma. *Virchows Arch* **464**, 35-43, doi:10.1007/s00428-013-1508-z (2014).
- 100 Rasheed, Z. A. *et al.* Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* **102**, 340-351, doi:10.1093/jnci/djp535 (2010).
- 101 Wakamatsu, Y. *et al.* Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int* **62**, 112-119, doi:10.1111/j.1440-1827.2011.02760.x (2012).
- 102 Liesche, F., Griessmair, M., Barz, M., Gempt, J. & Schlegel, J. ALDH1 - A new immunohistochemical diagnostic marker for Schwann cell-derived tumors. *Clin Neuropathol* **38**, 168-173, doi:10.5414/np301190 (2019).
- 103 Bertucci, F. *et al.* Gene expression profiling of solitary fibrous tumors. *PLoS One* **8**, e64497, doi:10.1371/journal.pone.0064497 (2013).

- 104 Huber, A. H. & Weis, W. I. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* **105**, 391-402, doi:10.1016/s0092-8674(01)00330-0 (2001).
- 105 Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*. (W.W. Norton, 2013).
- 106 Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J* **31**, 2714-2736, doi:10.1038/emboj.2012.150 (2012).
- 107 Drilon, A. D. *et al.* Extraskeletal myxoid chondrosarcoma: a retrospective review from 2 referral centers emphasizing long-term outcomes with surgery and chemotherapy. *Cancer* **113**, 3364-3371, doi:10.1002/cncr.23978 (2008).
- 108 Subramanian, S. *et al.* The gene expression profile of extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *J Pathol* **206**, 433-444, doi:10.1002/path.1792 (2005).
- 109 Declercq, J., Van Dyck, F., Van Damme, B. & Van de Ven, W. J. Upregulation of Igf and Wnt signalling associated genes in pleomorphic adenomas of the salivary glands in PLAG1 transgenic mice. *Int J Oncol* **32**, 1041-1047 (2008).
- 110 Dalin, M. G. *et al.* Multi-dimensional genomic analysis of myoepithelial carcinoma identifies prevalent oncogenic gene fusions. *Nat Commun* **8**, 1197, doi:10.1038/s41467-017-01178-z (2017).
- 111 Tejpar, S. *et al.* Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene* **18**, 6615-6620, doi:10.1038/sj.onc.1203041 (1999).
- 112 Binh, M. B. *et al.* MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. *Am J Surg Pathol* **29**, 1340-1347, doi:10.1097/01.pas.0000170343.09562.39 (2005).
- 113 Horvai, A. E., Kramer, M. J. & O'Donnell, R. Beta-catenin nuclear expression correlates with cyclin D1 expression in primary and metastatic synovial sarcoma: a tissue microarray study. *Arch Pathol Lab Med* **130**, 792-798, doi:10.1043/1543-2165(2006)130[792:CNECWC]2.0.CO;2 (2006).
- 114 Machado, I. *et al.* Epithelial marker expression does not rule out a diagnosis of Ewing's sarcoma family of tumours. *Virchows Arch* **459**, 409-414, doi:10.1007/s00428-011-1138-2 (2011).