

Atipik Teratoid Rabdoid Tümörlü Olgularda Demografik, Klinik, Patolojik Özelliklerin ve HSNF5 (SMARCB1)/INI1 Gen Mutasyonlarının Araştırılması

Investigation of Demographic, Clinical, Pathological Features and HSNF5 (SMARCB1)/INI1 Gene Mutations in Patients Diagnosed as Atypical Teratoid Rhabdoid Tumors

Elif KIYMET^a, Tahir ATİK^b, Esra IŞIK^b, Bilçağ AKGÜN^b, Nazan ÇETİNGÜL^c, Taner AKALIN^d, Ferda ÖZKINAY^b

^aEge Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, İzmir, TÜRKİYE

^bEge Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Genetik Hastalıkları BD, İzmir, TÜRKİYE

^cEge Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Onkoloji BD, İzmir, TÜRKİYE

^dEge Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji ABD, İzmir, TÜRKİYE

ÖZET Amaç: Atipik teratoid/rabdoid tümör (AT/RT), çocukluk çağı santral sinir sistemi (SSS) tümörlerinden olan embriyonel tümörlerin nadir bir alt grubunu oluşturmaktadır. 22q11.2'de lokalize SMARCB1/INI1 geninde somatik dokularda oluşan değişikliklerin (delesyon, nokta mutasyonu, heterozigosite kaybı), AT/RT'lerin yaklaşık %75-98'inde bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca AT/RT'li hastaların 1/3'ünde SMARCB1/INI1 geninde germline mutasyonlar bildirilmiştir. Bu çalışmada, AT/RT tanısı alan hastalarda bu tümör ile ilişkili bir tümör supresör gen olan SMARCB1/INI1 mutasyonlarının araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada, 2010-2015 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinde, AT/RT tanısı almış olguların demografik, klinik, patolojik özellikleri ve SMARCB1/INI1 mutasyonları değerlendirildi. Olguların hepsinin tümör dokusuna ait patoloji preparatlarından ve ulaşılabilen olguların periferik kanlarından DNA izole edilerek, SMARCB1/INI1 geni için tüm ekzonik bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı, jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Tespit edilen varyasyonların patojenitesi, Amerikan Tıbbi Genetik Koleji 2015 kriterlerine göre değerlendirildi. **Bulgular:** Çalışmaya alınan 10 hastanın 7'si SSS'nin AT/RT'si, 2'si yumuşak dokuda RT, biri renal RT tanılıydı. Hastaların %77'sinde tümör dokusunda immünohistokimyasal yöntemler ile SMARCB1/INI1 protein ekspresyonu kaybı saptandı ve bu hastaların ortanca sağkalm süresinin 5 ay (1-69 ay, SE: 9,29 ay) olduğu görüldü. Dört hastanın tümör dokusunda SMARCB1/INI1 geninde, mutasyon saptandı ve bu hastaların ortanca sağkalm süresi 5,5 ay (1-15 ay, SE: 2,95 ay) olarak saptandı. SMARCB1/INI1 geninde mutasyon saptanmayan hastaların ortanca sağkalm süresi 10,5 ay (1-81 ay, SE: 14,6 ay) olarak saptandı. **Sonuç:** Tümör dokusunda SMARCB1/INI1 geninde mutasyon saptanan hastaların ortanca sağkalm sürelerinin, mutasyon saptanmayanlara göre daha kısa olduğu gözlenmiştir. Önceki yayınlardan farklı olarak AT/RT tanılı hasta grubumuzda, hiçbir hastada SMARCB1/INI1 geninde germline mutasyon saptanmamıştır.

ABSTRACT Objective: Atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) is a rare subgroup of embryonal tumors of childhood central nervous system (CNS) tumors. It has been reported that approximately 75-98% of patients with AT/RT have somatic changes (deletion, point mutation, loss of heterozygosity) in the SMARCB1/INI1 gene localized in 22q11.2 and also one-third of the patients have germline mutations. This study aimed to investigate the SMARCB1/INI1 mutations, a tumor suppressor gene associated with this tumor, in patients with AT/RT. **Material and Methods:** The demographic, clinical, pathological features and SMARCB1/INI1 mutations of patients diagnosed at Ege University between 2010-2015 were evaluated. DNA was isolated from pathological preparations of tumor tissue of all cases and peripheral blood of accessible patients, and all exonic regions for the SMARCB1/INI1 gene were reproduced by polymerase chain reaction, and DNA sequence analysis was performed after control by gel electrophoresis. Pathogenicity of the variations found was evaluated according to American College of Medical Genetics 2015 criteria. **Results:** 7/10 patients were diagnosed as AT/RT of CNS, 2/10 as soft tissue RT, and 1/10 as the renal RT. In 77% of the patients, loss of SMARCB1/INI1 protein expression was detected by immunohistochemical methods in tumor tissue and mean survival was 5 months (1-69 months, SE: 9.29 months). The mutation was detected in SMARCB1/INI1 in tumor tissue of four patients and median survival was 5.5 months (1-15 months, SE: 2.95 months). The median survival of patients without a mutation in the SMARCB1/INI1 gene was found to be 10.5 months (1-81 months, SE: 14.6 months). **Conclusion:** The median survival time of the patients with SMARCB1/INI1 mutation seems to be shorter than the ones without the mutation. Unlike previous publications, in our patient group diagnosed as AT/RT, no germline mutation was detected in the SMARCB1/INI1 gene.

Anahtar Kelimeler: Santral sinir sistemi neoplazileri; tümör baskılayıcı genler; SMARCB1 protein; rabdoid tümör

Keywords: Central nervous system neoplasms; tumor suppressor genes; SMARCB1 protein; rhabdoid tumor

Correspondence: Elif KIYMET
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, İzmir, TÜRKİYE/TURKEY
E-mail: elifkiymet_1264@hotmail.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Pediatrics.

Received: 11 Dec 2019

Received in revised form: 20 Jul 2020

Accepted: 19 Aug 2020

Available online: 17 Sep 2020

2146-8990 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Gelişmekte olan tülkelerde, çocukluk çağında en sık görülen ilk 3 malignite lösemi, lenfoma ve sant-ral sinir sistemi (SSS) tümörüdür.¹ Atipik teratoid/rabdoid tümör (AT/RT), pediatrik SSS tümörlerinin nadir görülen bir alt tipidir. İlk olarak 1987 yılında Rorke ve ark. tarafından tanımlanmıştır.^{2,3} Sıklıkla 3 yaşından küçük çocuklarda görülür ve infant yaş grubundaki çocuklarda görülen SSS tümörlerinin %10'unu oluşturmaktadır.^{3,4} SSS'nin AT/RT'si, oldukça agresif seyirli olup, prognozu diğer malign beyin tümörleri ile karşılaştırıldığında son derece kötüdür. SSS'nin AT/RT'si tanısı alan hastalarda, 5 yıllık sağkalım %39,5 olarak bulunmuştur ve bildirilen yaşam süreleri 0,5-11 ay arasında değişmektedir.³⁻⁵

SSS'nin AT/RT'si, histolojik özellikleri nedeni ile sıklıkla primitif nöroektodermal tümör, medulloblastom, germ hücreli tümör, koroid pleksus karsinomu ile karışabilmektedir.^{4,5} Bu nedenle daha spesifik belirteçlere ihtiyaç duyulmuştur. İlk olarak Kalpana ve ark. tarafından 1994 yılında tanımlanan *SMARCB1/INI1* (*601607) geni, zaman içinde AT/RT ile ilişkili bir tümör supresör gen olarak belirlenmiştir ve günümüzde AT/RT ile ilişkili en yaygın bilinen tümör supresör gen ve tanısal biyolojik belirteç olarak tanımlanmıştır.⁶⁻⁸

SMARCB1/INI1, *SWI/SNF* kromatin "remodeling" kompleksinin bir bileşenidir ve bir tümör supresör gen olarak işlev görür. Bu işlevini, diferansiyasyon ve apoptoz genlerini hedef alıp, ökar-yotik genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek yaptığı düşünülmektedir. *SMARCB1/INI1*'in ve komşu genlerin alterasyonu, delesyonu ve mutasyonu SSS, böbrek ve yumuşak dokularda bulunan RT'lerde tanımlanmıştır. *SMARCB1/INI1* fonksiyonunun germline kaybını taşıyan infantlar ve çocuklar, çok erken yaşlarda RT'lere yatkın olma eğilimindedir ve bu çocuklarda AT/RT gelişebilmektedir.⁸

Genetik çalışmalar, *SMARCB1/INI1* genindeki değişikliklerin (delesyon, nokta mutasyonu, heterozigosite kaybı), AT/RT'lerin yaklaşık %75-98'inde gerçekleştiğini göstermiştir.^{5,9,10} Bununla birlikte, *SMARCB1/INI1*'de değişikliğin gösterilmediği çalışmalar da mevcuttur.¹¹ Somatik mutasyonlara ek olarak, AT/RT'li hastaların 1/3'ünde *SMARCB1/INI1*

geninde germline mutasyonlar bildirilmiştir.¹² Bu bulgular ışığında anti-*SMARCB1/INI1* antikoru, tanısal bir araç olarak kullanılmaya başlanmış olup, yanlış tanı oranlarında düşüş sağlanmıştır. Günümüzde AT/RT tanısı için artık bu karakteristik moleküler defektin objektif olarak gösterilmesi gerekmektedir.¹³

Bu çalışmada, çocukluk çağı SSS tümörlerinin bir alt grubu olan embriyonel tümörlerden, AT/RT tanısı almış olan hastalarda, klinik, patolojik özelliklerin ve bu tümör ile ilişkili olan bir tümör supresör gen (*SMARCB1/INI1*) mutasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinde, 2010-2015 yılları arasında tanısal amaçlı cerrahi girişim yapıldıktan sonra histopatolojik incelemeler sonucunda, AT/RT tanısı almış olan 0-18 yaş arasındaki tüm hastalar dâhil edildi. Bu kriterlere uyan 10 hasta olduğu görüldü. Olguların dosyaları geriye dönük olarak incelendi. Hastaların cinsiyeti, tanı yaşı, başvuru yakınması, başvuru ile tanı arasında geçen süre, yaşam süresi, tümörün yerleşim yeri, tedavi şekli, nüks oranı kaydedildi ve en az 3 kuşağı içeren aile ağacı çizildi.

Olguların, *SMARCB1/INI1* geni moleküler analizi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Çocuk Genetik Bilim Dalı laboratuvarında yapıldı. DNA izolasyonu için tüm olguların, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı örnek arşivinde parafin bloklar hâlinde saklanmakta olan patoloji materyallerine ulaşıldı ve ayrıca çalışma sırasında hayatta olan 4 olgudan EDTA'lı tüpe 2 cc periferik kan örnekleri alındı. Parafin blok hâlinde saklanmış olan tümör dokusundan ve periferik kan örneklerinden protokole uygun şekilde DNA izole edildi. İzole edilen DNA örneklerinde, *SMARCB1/INI1* geninin tüm ekzonik bölgeleri ve intron-ekzon birleşme bölgelerini kapsayacak şekilde Primer3 programı aracılığıyla primer dizaynı yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] için kullanılan primer dizileri Tablo 1'de görülmektedir. PCR sonrasında elde edilen PCR ürünüde, amplifikasyon olup olmadığını kontrol etmek için, %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü.

TABLO 1: PCR için kullanılan primer dizileri.

1	chr22:24129053+24129642	CAGCCTGGGAGAAAGAGAAA	AGGAAATCCCAGGTCGATG	59.54/59.87	50.00/52.63	590
2	chr22:24133728+24134180	TGGTTCTGTTGTCAGGATGC	CAAGGCTGCAGTGAAGACAC	59.68/59.62	50.00/55.00	453
3	chr22:24135653+24135930	CATGCGAGGACCTTGATGT	CTCAGAAAAGACCCACAGG	59.65/59.69	52.63/55.00	278
4	chr22:24143023+24143399	TCGAGCCTGACAGAGGTACA	AGGAGGTACTGTGGCGTTGT	59.57/59.65	55.00/55.00	377
5	chr22:24145338+24145712	TCTGCTGCCTCAGCTGTTAG	AGGTCCAGAATCTGCCTGAC	59.49/59.26	55.00/55.00	375
6	chr22:24158838+24159231	CTGGTTGCTCTCCTGCAT	AACCCAAAGACGGGCTTC	60.26/60.05	55.00/55.56	394
7	chr22:24167279+24167706	CAAGGACCACCTGCAGTTCT	AAGCGTGAGAAAGCCTCAA	60.30/60.13	55.00/45.00	428
8	chr22:24175561+24176029	GGTCATGGCGACAACACTT	AGAAGCTGCCTGCCTCTA	59.54/60.25	52.63/57.89	469
9	chr22:24176178+24176544	CTGAGAGAAGGCTGGGTCTG	GGGCTCAACAATGGAATGT	60.13/59.80	60.00/45.00	367

Sonrasında PCR ürünlerine purifikasyon işlemi uygulandı. Purifikasyon için “FERMENTAS GeneJET PCR Purification Kit” kullanıldı. Ardından purifiye edilen amplikonlar, “BigDye Terminator Cycle Sequencing V3.1 Ready Reaction Kit (Life Technologies)” kullanılarak Sanger dizi analizi için 2. bir PCR işlemi ile hazırlandı. İkinci PCR işlemi sonrasında sonlandırıcı nükleotidler içeren bu ürünler, “Zymo Research DNA Sequencing Clean Up Kit” kullanılarak purifiye edildi. Daha sonra ise ABI PRISM 3130 otomatik dizi analizi cihazına yüklenilerek, Sanger dizi analizi yapıldı. Tespit edilen varyantların patojenitesi, Amerikan Tıbbi Genetik Koleji 2015 kriterlerine göre değerlendirildi.

SMARCB1/INI1 geninde tümör dokusunda mutasyon tespit edilen olgularda, örneği bulunanlarda periferik kanda dizi analizi tekrarlandı. Segregasyonu belirlemek amacıyla ebeveynlerde, Sanger dizi analizi gerçekleştirildi.

Parafin blok hâlinde saklanmış olan tümör dokusundan, *SMARCB1/INI1* protein ekspresyon kaybını değerlendirmek amacıyla immünohistokimyasal inceleme yapıldı. İmmünohistokimyasal incelemede antikor olarak “INI-1 (MRQ-27) Mouse Monoclonal Primary Antibody-Cell Marque” kullanıldı ve “Benchmark XT” cihazında çalışıldı.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 30 Kasım 2015 tarihinde, 15-10.1/13 no.lu onay alındı. Çalışmaya katılan tüm ailelerden gönüllü oluru alındı. Çalışma, Helsinki Bildirgesi Prensipleri’ne uygun olarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışmaya, AT/RT tanısı olan 10 hasta alınmıştır. Çalışmaya alınan hastaların 7 (%70)’inde SSS’nin AT/RT’si, 2 (%20)’inde yumuşak dokuda RT, 1 (%10)’inde ise böbrek RT’nin tanısı beyin ve omurilik metastazı mevcuttu. Hastaların genel özellikleri [Tablo 2](#)’de görülmektedir.

Çalışmaya alınan hastaların 5 (%50)’i erkek 5 (%50)’i kızdı. Hastaların tanı anındaki yaş dağılımı 3 ay-12,9 yaş arasında değişim göstermekteydi ve ortanca tanı yaşı 16,5 ay idi (3 ay-12,9 yaş). Hastaların %90’ı 36 aydan önce tanı almıştı. Kız hastaların ortanca tanı yaşı 17 ay (6-19 ay), erkek hastaların ortanca tanı yaşı 3,5 ay (3,5 ay-12,9 yaş) idi. Çalışmaya alınan tüm hastaları değerlendirdiğimizde ortanca sağkalım süresinin 7,5 ay (1-81 ay, SE: 9,28 ay) olduğu görüldü, toplam 7 (%70) hasta hayatını kaybetti. Çalışmaya alınan hastalarda, majör bir dismorfik bulgu bulunmamaktaydı.

SSS’nin AT/RT’si tanısı alan 7 hastanın 4 (%57)’ü kız, 3 (%43)’ü erkekti. Bu olguların ortanca tanı yaşı 18 ay (3 ay-12,9 yaş) bulundu. Hastalarımızın %85’i 36 aydan önce tanı almıştı. Ortanca sağkalım süresinin 6 ay (1-81 ay, SE: 10,86 ay) olduğu görüldü ([Tablo 3](#)). Başvuru yakınmalarını değerlendirdiğimizde; SSS’nin AT/RT’si tanısı alan hastalardan 6’sında kusma, 4’ünde huzursuzluk, 3’ünde iştahsızlık, 3’ünde letarji mevcuttu. Diğer hastalardan farklı olarak başvuru sırasında 1 hastada kilo kaybı, 1 hastada denge bozukluğu, 1 hastada fasiyal paralizisi mevcuttu. Hastaların genelde tek bir yakınma ile değil kusma-huzursuzluk (%40), kusma-letarji

TABLO 2: Santral sinir sisteminin atipik teratoid/rabdoid tümörü, yumuşak doku ve ekstrakranial yerleşimli rabdoid tümör hastalarının klinik, immünohistokimyasal ve moleküler özellikleri.

Olgu no	Cinsiyet	Tanı yaşı	Tümör yerleşim yeri	Tedavi				RT	O. KİT	Nüks	Sağkalım süresi	Sonuç	SMARCB1/INI1 mutasyonu (Dizi analizi ile)			Akrabalık
				Cerrahi	KT	RT	O. KİT						Kan	Doku	Doku INI1 ekspresyonu	
1	K	18 ay	SSS/İT	TE	+	-	-	-	-	81 ay	Remisyon	Yok	Yok	Çalışılmadı	Yok	
2	K	17 ay	SSS/İT	KE	+	-	+	-	-	6 ay	Ölüm	0	Yok	Var	Yok	
3	K	19 ay	SSS/İT	TE	+	-	-	-	-	5 ay	Ölüm	0	Yok	Var	Yok	
4	E	19 ay	SSS/ST	KE	*	-	-	-	-	1 ay	Ölüm	Yok	Yok	Var	Yok	
5	E	3 ay	SSS/İT	KE	+	-	-	-	-	1 ay	Ölüm	0	Yok	-	Yok	
6	E	3,5 ay	YD [§]	TE	+	-	**	-	-	69 ay	Remisyon	Yok	Yok	-	Yok	
7	E	12,9 yaş	SSS/ST	KE	+	+	-	-	-	12 ay	Ölüm	0	Yok	-	Var	
8	E	3,5 ay	YD ^{§§}	Biyopsi	+	-	-	-	-	15 ay	Remisyon	Yok	Yok	Var	Yok	
9	K	16 ay	SSS/ST	KE	+	-	-	-	-	9 ay	Ölüm	0	Yok	-	Fokal var	
10	K	6 ay	EKY ^{§§§}	TE	+	-	-	-	-	3 ay	Ölüm	0	Yok	-	Yok	

K: Kız, E: Erkek, SSS: Santral sinir sistemi, İT: İnfratentorial, ST: Supratentorial, YD: Yumuşak doku, EKY: Ekstremite, İT: İnfratentorial, ST: Supratentorial, TE: Total ekzisyon, KE: Kısmi ekzisyon, KT: Kemoterapi, RT: Radyoterapi, O. KİT: Ototolog kemik iliği transplantasyonu, §Sol omuz, §§Sağ bacak, §§§Sağ bacak, *Genel durum bozukluğu nedeni ile KT verilemedi, **RT önerildi, ancak alle onay veremediği için verilemedi, -: Kan örneği olmadığı için analiz yapılmadı, +: Tümör dokusundan elde edilen DNA dizi analizinde tüm ekzonlar çoğaltılmadı.

(%33,3) ve kusma-iştahsızlık (%33,3) gibi birden fazla yakınma ile başvurdukları görülmüştür.

Çalışma grubumuzda bulunan hastaların tümüne cerrahi tedavi ve ardından uygun kemoterapi protokolü uygulanmıştır. Hastalarımızın %40'ında tümör total ekzisyon ile çıkarılırken, %50'sinde rezidü tümör dokusu kalmıştır ve %10'unda sadece biyopsi yapılmıştır. Total ekzisyon yapılan hastaların ortanca sağkalım süresi 37 ay (3-81 ay, SE: 20,6 ay) bulunurken, rezidü tümör dokusu kalan hastaların ortanca sağkalım süresi 7,5 ay (1-15 ay, SE: 2,3 ay) olarak bulunmuştur.

Çalışmaya alınan tüm hastalar için tümör dokusunda immünohistokimyasal yöntemler ile *SMARCB1/INI1* protein ekspresyonu bakıldı (Resim 1). Hastaların %77'sinde protein ekspresyon kaybı bulundu. Yumuşak doku ve renal RT tanılı hastaların hepsinin tümör dokusunda *SMARCB1/INI1* protein ekspresyon kaybı gösterildi. SSS'nin AT/RT'si tanılı hastalarımızın 4'ünde protein ekspresyon kaybı mevcuttu, 1 hastada protein ekspresyonu tamamen korunmuştu, 1 hastada ise protein ekspresyonu fokal olarak korunmuştu. Bir hastada protein ekspresyonu değerlendirilemedi.

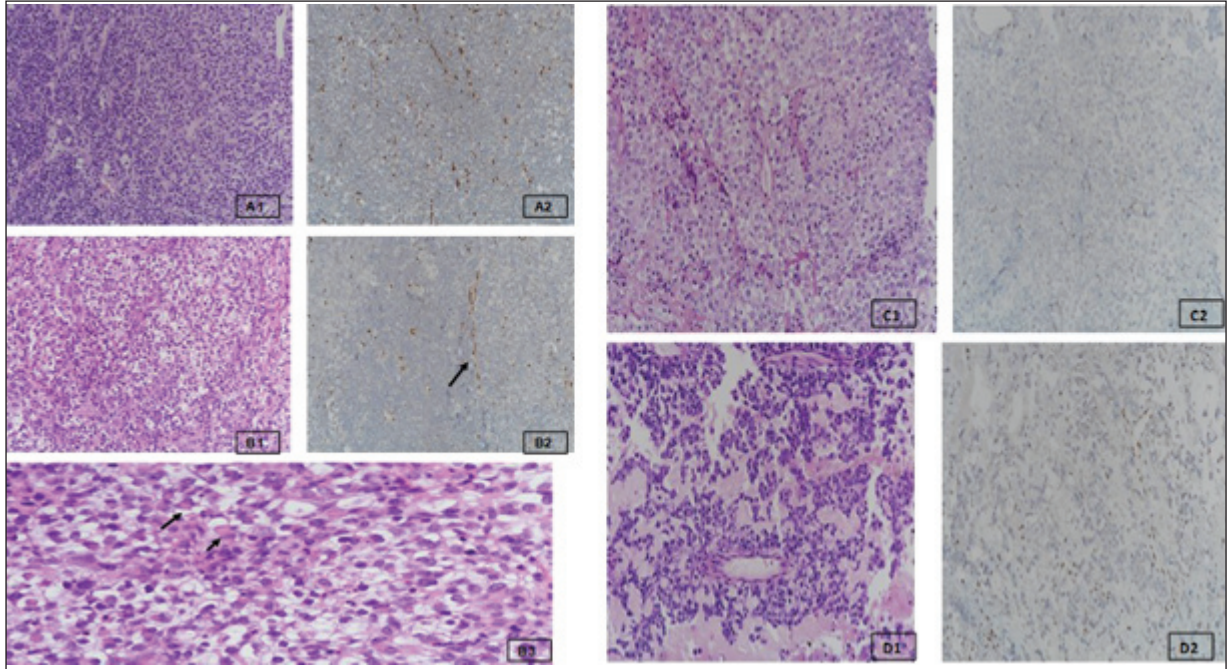
AT/RT tanısı olan ve *SMARCB1/INI1* protein ekspresyon kaybı gösterilen hastaların 3'ü kız 4'ü erkek, ortanca tanı yaşı 6 ay (3-19 ay), ortanca sağkalım süresi 5 ay (1-69 ay, SE:9,29 ay) bulundu. Protein ekspresyon kaybı olmayan hastamız, 12,9 yaşında tanı almıştı ve sağkalım süresi 12 ay idi. Protein ekspresyonu fokal olarak korunmuş olan hastamız, 16 aylıkken tanı almıştı ve sağkalım süresi 9 ay idi. Çalışma grubumuzda, protein ekspresyon kaybı olan hastaların daha küçük yaşta tanı aldıkları ve sağkalım sürelerinin daha kısa olduğu görülmüştür. Ancak hasta sayısının az olması nedeni ile aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı değerlendirilememiştir.

Hastalara ait patoloji materyallerinden ulaşılan tümör dokusundan izole edilen DNA'lar, dizi analizi ile *SMARCB1/INI1* gen dizisinde değişiklik açısından değerlendirildiğinde 4 (%40)

TABLO 3: Atipik teratoid/rabdoid tümör tanılı hastaların immünohistokimyasal ve moleküler özelliklerine göre ortanca tanı yaşları ve ortanca sağkalım süreleri.

	n	Cinsiyet E/K	Ortanca tanı yaşı	Ortanca sağkalım süresi
Tüm hastalar	10	5/5	16,5 ay (3 ay-12,9 yaş)	7,5 ay (1-81 ay, SE: 9,28 ay)
SSS'de AT/RT olan hastalar	7	3/4	18 ay (3 ay-12,9 yaş)	6 ay (1-81 ay, SE: 10,86 ay)
Tümör dokusunda SMARCB1/INI1 protein ekspresyonu kaybı olan hastalar	7	4/3	6 ay (3-19 ay)	5 ay (1-69 ay SE: 9,29 ay)
Tümör dokusunda SMARCB1/INI1 geninde mutasyon saptanan hastalar	4	2/2	18 ay (3,5-19 ay)	5,5 ay (1-15 ay, SE: 2,95 ay)

AT/RT: Atipik teratoid/rabdoid tümör, E: Erkek, K: Kız, n: Hasta sayısı, SSS: Santral sinir sistemi.



RESİM 1: A1: Histopatolojik incelemede hiperkromatik nükleuslu görece dar sitoplazmalı atipik hücre popülasyonu (sol taraf) yanı sıra görece genişçe yuvarlak veziküler nükleuslu hücreler (sağ taraf) ile karakterli tümör görülüyor (HEx200). A2: İmmün histokimyasal incelemede INI-1 negatifliği (ekspresyon kaybı). Damar endotelindeki iç kontrol pozitifliği görülüyor (Anti INI-1x200). B1: Histopatolojik incelemede yuvarlak veziküller nükleuslu hücrelerin mezenkimal dizilimi ile karakterli tümör görülüyor. Bazı hücrelerde daha belirgin olmak üzere eozinofilik globüler yapılar dikkat çekiyor (HEx200). B2: İmmün histokimyasal incelemede INI-1 negatifliği (ekspresyon kaybı). Damar endotelindeki iç kontrol pozitifliği görülüyor (Anti INI-1x200). B3: Tümör dokusunun daha büyük büyütmeye görünümü, rabdoid görünümlü hücreler (HEx400). C1: Histopatolojik incelemede veziküler yuvarlak nükleuslu epitelioid görünümlü geniş hücreler ile karakterli tümör görülüyor. Bazı hücrelerde eozinofilik globüler yapılar dikkati çekiyor (HEx200). C2: İmmün histokimyasal incelemede INI-1 negatifliği (ekspresyon kaybı). Damar endotelindeki iç kontrol pozitifliği görülüyor (Anti INI-1x200). D1: Histopatolojik incelemede yuvarlak nükleuslu atipik hücrelerin monoton görüntüsü ve bazı hücrelerin sitoplazmasında eozinofilik globüler yapılar ile karakterli tümör görülüyor (HEx200). D2: İmmün histokimyasal incelemede INI-1 negatifliği (ekspresyon kaybı). Damar endotelindeki iç kontrol pozitifliği görülüyor (Anti INI-1x200).

hastada mutasyon saptandı. Hastalarda saptanan 4 farklı mutasyonun hepsi de novo mutasyondur ve Amerikan Tıbbi Genetik Koleji 2015 kriterlerine göre patojenik olarak değerlendirildi (Tablo 4). Diğer 6 hastada (1, 5, 6, 7, 9, 10 no.lu hastalar), *SMARCB1/INI1* geninin bazı ekzonlarında (1 ve 5.

hastada ilk 5 ekzonda, 6. hastada 2 ve 4. ekzonda, 7 ve 9. hastada 3, 7 ve 8. ekzonda, 10. hastada ilk 6 ekzonda) PCR okuması olmadığı için bu hastalarda genomik değişiklik (delesyon, mutasyon, heterozigosite kaybı) bulunup bulunmadığı değerlendirilemedi.

TABLO 4: *SMARCB1/INI1* geninde mutasyon saptanan hastaların mutasyon özellikleri.

Olgu no	2	3	4	8
Tanı	SSS'nin AT/RT'si	SSS'nin AT/RT'si	SSS'nin AT/RT'si	Yumuşak dokuda RT
Mutasyon	c.362+3A>G	c.1033G>A (p.D345N)	c.727C>T (p.Q243X)	c.238delG (p.G80Dfsx5)
Mutasyon çeşidi	Splice bölge	Missense	Nonsense	Frame shift
Mozaiklık	%20	%29	%45	%19
De novo/bilinen	De novo	De novo	De novo	De novo
Dokuda INI1 ekspresyonu	Yok	Yok	Yok	Yok

AT/RT: Atipik teratoid/rabdoid tümör, SSS: Santral sinir sistemi.

Kanına ulaşılarak analiz yapılan 4 hastanın, periferik kandan izole edilen DNA'lar ve aynı primer diziler kullanılarak yapılan mutasyon analizinde, tüm hastalarda bütün ekzonlar başarılı şekilde çoğaltıldı. Tümör dokusunda değişken mozaik paterde mutasyon taşıyan hastaların hiçbiri kanlarında mutasyon taşımamaktadır.

Mutasyon saptanan hastalarımızın 3'ü SSS'nin AT/TR'si, 1'i yumuşak dokuda RT idi. *SMARCB1/INI1* geninde mutasyon saptanan hastaların ortanca tanı yaşı 18 ay (3,5-19 ay), ortanca sağkalım süresi 5,5 ay (1-15 ay, SE: 2,95 ay) bulundu. *SMARCB1/INI1* geninde mutasyon saptanmayan hastaların ortanca tanı yaşı 11 ay (3ay-12,9 yaş), ortanca sağkalım süresi 10,5 ay (1-81 ay, SE: 14,6 ay) bulundu. Mutasyon bulunan hastaların sağkalım süresi hem mutasyon saptanmamış olan hastaların ortanca sağkalım süresinden daha kısa bulundu. Ancak hasta sayısı az olduğu için aradaki fark istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Mutasyon taşıyan hastaların ebeveynleri, aynı mutasyon açısından Sanger dizi analizi kullanılarak değerlendirildi. Hastaların ebeveynlerinin, bu mutasyonu taşımadıkları gösterildi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, AT/RT tanısı ile izlenen hastaların klinik bulguları ile tümör dokularında *SMARCB1/INI1* genindeki moleküler ve immünohistokimyasal değişiklikler birlikte değerlendirilmiştir. Mutasyon saptanan hastaların sağkalım süresinin, mutasyon saptanmamış olan hastaların sağkalım süresinden

daha kısa olduğu görülmekle birlikte hasta sayısının kısıtlılığı nedeni ile aradaki farkın istatistiksel anlamı değerlendirilememiştir.

Bu çalışmada hastaların %85'inin 3 yaşından önce tanı aldığı ve SSS'nin AT/RT'si tanısı alan hastaların ortanca tanı yaşının 18 ay (3 ay-12,9 yaş) olduğu saptandı. Bu konuda yapılmış olan önceki çalışmalar incelendiğinde, hastaların ortanca tanı yaşı 12 ay-27 ay arasında değişim gösterdiği görülmektedir.^{3,14-18} Yayınların çoğunda, hastaların %71-76'sının 3 yaşından küçük olduğu dikkat çekmektedir.^{3,14,17,19}

Bu çalışmada SSS'nin AT/RT'si tanısı ile izlenen hastaların ortanca sağkalım süresi 6 ay (1-81 ay, SE: 10,86 ay) bulundu. Literatürde belirtilen sağkalım süreleri de çalışmamızda olduğu gibi oldukça kısadır.²⁰⁻²² On iki aylık sağkalımın %20 veya daha az olduğu belirtilmiştir.²⁰ Kanada'dan çok sayıda merkezin katıldığı bir çalışmanın verilerine göre %75 hastada, hastalığın nüks ettiği ya da progresyon gösterdiği görülmüştür. Ortanca sağkalım süresi 14 ay bulunmuştur.²¹ Retrospektif olarak hasta kayıtlarının incelendiği bir başka çalışmada, genel ortanca sağkalım 8,5 ay, total rezeksiyon yapılan olgularda ortanca hastaliksiz sağkalım 14 ay, total rezeksiyon yapılamayan olgularda ortanca hastaliksiz sağkalım 7 ay olarak bulunmuştur.²²

22q11.2'de lokalize *SMARCB1/INI1* genindeki değişikliklerin (delesyon, mutasyon, heterozigosite kaybı), AT/RT'lerin yaklaşık %60-85'inde bulunduğu gösterilmiştir.^{5,9,23-25} Bu oranın %98'e kadar çıktığı çalışmalar bulunurken *SMARCB1/INI1*'de değişikliğin gösterilmediği çalışmalar da mevcuttur.^{10,11}

SMARCB1/INI1 geninde meydana gelen mutasyonlar, çoğunlukla erken bir “stop” kodon oluşmasına neden olan nokta mutasyonlar veya çerçeve kayması (frameshift) mutasyonlar olmakla birlikte büyük delesyonlar da bildirilmiştir. Mutasyonlar sonucu işlevini tam olarak yerine getiremeyen normalden kısa bir protein sentezlenmektedir.²² Hastalarımızda, teknik nedenler ile sadece dizi analizi yöntemi kullanılarak *SMARCB1/INI1* geni mutasyon analizi yapabildik. Dizi analizi yapamadığımız fakat ekzonlarını PCR ile çoğaltmadığımız hasta dokularında, büyük delesyonlar olabileceği düşünülebilir. Bu hastalarda, büyük delesyonları gösterilebileceği MLPA, FISH analizi gibi yöntemlerin uygulanması uygun olacaktır.

Somatik mutasyonlara ek olarak AT/RT’li hastaların 1/3’ünde *SMARCB1/INI1* geninde germline mutasyonlar bildirilmiştir.¹² Germline mutasyonlar sıklıkla iki primer tümörü olan infantlarda gösterilmiştir. Sévenet ve ark.nın yapmış oldukları çalışmada, bu çocukların ailelerinin nadiren mutasyon taşıyıcısı olduğu gösterilmiştir.²³ Mutasyon taşıyıcısı olmadığı hâlde 2 veya daha fazla etkilenmiş çocuğa sahip olan 3 ailede bu durumdan sorumlu mekanizma olarak gonadal mozaizim düşünülmüştür.²² Bu çalışmada, mutasyon taşıyan hastaların ebeveynleri, aynı mutasyon açısından Sanger dizi analizi kullanılarak değerlendirildi. Hastaların ebeveynlerinin, bu mutasyonu taşımadıkları gösterildi.

Çalışmamızda, tümör dokusunda *SMARCB1/INI1* protein ekspresyonu bakılan 9 hastamızdan 7 (%77)’sinde protein ekspresyon kaybı mevcuttu. Literatürü gözden geçirdiğimizde, AT/RT vakalarının %84-100’ünde *SMARCB1/INI1* protein ekspresyonunun kaybının olduğunu gösteren çalışmaları görmekteyiz.^{5,19,26-28} Ancak AT/RT tanısı almasına rağmen immünohistokimyasal olarak *SMARCB1/INI1* ekspresyonunun gösterildiği ve *SMARCB1/INI1*’de herhangi bir genetik değişiklik bulunmayan vakalar da mevcuttur.²⁹ Bu farklılık, AT/RT ile ilişkisi henüz tanımlanmamış olan başka bir tümör baskılayıcı gende değişiklik olmasından kaynaklanabilir.

Hasselblatt ve ark., AT/RT tanılı 9 aylık bir erkek çocuğunda immünohistokimyasal olarak

SMARCB1/INI1 boyanması olduğunu ve *SMARCB1/INI1*’de genetik değişikliklerin bulunmadığını gösterdikten sonra bu olguda, homozigot bir *SMARCA4* mutasyonu (c.2032C> T (p.Q678X)) olduğunu ve *SMARCA4* protein ekspresyonunda kayıp olduğunu göstermiştir.²⁹ Böylece SWI/SNF kromatin remodeling kompleksinin bir başka alt birimi olan *SMARCA4*’ün mutasyonlarının da AT/RT’ye neden olabileceği gösterilmiştir.

Schneppenheim ve ark., *SMARCB1/INI1* protein ekspresyonu korunan ve bu gende mutasyon saptanmayan iki kız kardeş tanımlamıştır. Bu kız kardeşlerin tümör hücrelerinde, bir *SMARCA4* germline mutasyonu ve uniparental dizomi nedeni ile heterozigotite kaybı gösterilmiştir.³⁰

Çalışma grubumuzda, protein ekspresyon kaybı gösterilememiş ve *SMARCB1/INI1* geninde mutasyon saptanamayan hastalarda, tümör gelişiminden *SMARCB1/INI1* geninden farklı bir genetik defekt sorumlu olabilir. Özellikle yoğun aile öyküsü olan hastalarda, *SMARCB1/INI1* protein ekspresyonunu değerlendirmesinin normal bulunması yeterli olmayabilir. Bu olgularda, SWI/SNF kromatin “remodeling” kompleksinin diğer alt birimleri ile ilgili inceleme yapılmasında fayda vardır.

Çalışmamızın retrospektif olarak düzenlenmiş olması ve hasta sayısının az olması kısıtlayıcı özelliklerindedir. DNA dizi analizi için parafin bloklardaki tümör dokularının kullanılmış olması, DNA izolasyonunu zorlaştırmıştır. Bazı hastalarda, *SMARCB1/INI1* geninin bazı ekzonlarında PCR okumasının olmaması bu durum ile ilişkili olabileceği gibi büyük delesyonlar ile de ilişkili olabilir. Delesyon analizi yapılamamış olması, bir diğer kısıtlılıktır.

SONUÇ

AT/RT tanılı hastaların tümör dokusunda yapılan analizde, daha önce bildirilmemiş 4 yeni mutasyon saptanmıştır. Ayrıca AT/RT tanılı hastaların tümör dokusunda *SMARCB1/INI1* geninde mutasyon saptanması durumunda, hastaların yaşam sürelerinin kısa olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle prognozu belirlemede mutasyon analizi önerilebilir. Bu konuda, daha geniş hasta gruplarında araştırma yapılmasına gerek-

sinim vardır. Önceki yayınlardan farklı olarak AT/RT tanılı hasta grubumuzda, kanda yapılan DNA analizlerinde hiçbir hastada *SMARCB1/INI1* geninde germline mutasyon saptanmamıştır. Bu sonucun kanda analiz yapılabilen hasta sayısının kısıtlılığı ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin, çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Ferda Özkanay, Nazan Çetingül, Elif Kıymet; **Tasarım:** Ferda Özkanay, Tahir Atik; **Denetleme/Danışmanlık:** Ferda Özkanay; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Elif Kıymet, Tahir Atik, Esra Işık, Bilçaç Akgün, Taner Akalın; **Analiz ve/veya Yorum:** Taner Akalın, Tahir Atik, Ferda Özkanay; **Kaynak Taraması:** Elif Kıymet, Esra Işık, Bilçaç Akgün **Makalenin Yazımı:** Elif Kıymet, Tahir Atik, Ferda Özkanay; **Eleştirel İnceleme:** Ferda Özkanay, Tahir Atik.

KAYNAKLAR

- Kutluk T. Çocukluk çağı kanserlerinin epidemiyolojisi. *Klin Gelişim*. 2007;20(2):6-12.
- Biegel JA, Kalpana G, Knudsen ES, Packer RJ, Roberts CWM, Thiele CJ, et al. The role of INI1 and the SWI/SNF complex in the development of rhabdoid tumors: meeting summary from the workshop on childhood atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Cancer Res*. 2002;62(1):323-8.
- Rorke LB, Packer R, Biegel J. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood. *J Neurooncol*. 1995;24(1):21-8. [Crossref] [PubMed]
- Woehrer A, Slavic I, Waldhoer T, Heinzl H, Zielonka N, Czech T, et al. Incidence of atypical teratoid/rhabdoid tumors in children: a population-based study by the Austrian Brain Tumor Registry, 1996-2006. *Cancer*. 2010;116(24):5725-32. [Crossref] [PubMed]
- Haberler C, Laggner U, Slavic I, Czech T, Ambros IM, Ambros PF, et al. Immunohistochemical analysis of INI1 protein in malignant pediatric CNS tumors: lack of INI1 in atypical teratoid/rhabdoid tumors and in a fraction of primitive neuroectodermal tumors without rhabdoid phenotype. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(11):1462-8. [Crossref] [PubMed]
- Kalpana GV, Marmon S, Wang W, Crabtree GR, Goff SP. Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science*. 1994;266(5193):2002-6. [Crossref] [PubMed]
- Ho DMT, Shih CC, Liang ML, Tsai CY, Hsieh TH, Tsai CH, et al. Integrated genomics has identified a new AT/RT-like yet INI1-positive brain tumor subtype among primary pediatric embryonal tumors. *BMC Med Genomics*. 2015;8:32. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Biegel JA, Tan L, Zhang F, Wainwright L, Russo P, Rorke LB. Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res*. 2002;8(11):3461-7.
- Biegel JA. Molecular genetics of atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Neurosurg Focus*. 2006;20(1):E11. [Crossref] [PubMed]
- Jackson EM, Sievert AJ, Gai X, Hakonarson H, Judkins AR, Tooke L, et al. Genomic analysis using high-density single nucleotide polymorphism-based oligonucleotide arrays and multiplex ligation-dependent probe amplification provides a comprehensive analysis of INI1/SMARCB1 in malignant rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res*. 2009;15(6):1923-30. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Tsai CY, Wong T, Lee YH, Chao ME, Lin SC, Liu DJ, et al. Intact INI1 gene region with paradoxical loss of protein expression in AT/RT: implications for a possible novel mechanism associated with absence of INI1 protein immunoreactivity. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(1):128-33. [Crossref] [PubMed]
- Judkins AR. Immunohistochemistry of INI1 expression: a new tool for old challenges in CNS and soft tissue pathology. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(5):335-9. [Crossref] [PubMed]
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-20. [Crossref] [PubMed]
- Lafay-Cousin L, Hawkins C, Carret AS, Johnston D, Zelcer S, Wilson B, et al. Central nervous system atypical teratoid rhabdoid tumors: the Canadian Paediatric Brain Tumour Consortium experience. *Eur J Cancer*. 2012;48(3):353-9. [Crossref] [PubMed]
- Chi SN, Zimmerman MA, Yao X, Cohen KJ, Burger P, Biegel JA, et al. Intensive multimodality treatment for children with newly diagnosed CNS atypical teratoid rhabdoid tumor. *J Clin Oncol*. 2009;27(3):385-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Benesch M, Bartelheim K, Fleischhack G, Gruhn B, Schlegel PG, Witt O, et al. High-dose chemotherapy (HDCT) with auto-SCT in children with atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT): a report from the European Rhabdoid Registry (EU-RHAB). *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(3):370-5. [Crossref] [PubMed]
- Tekautz TM, Fuller CE, Blaney S, Fouladi M, Broniscer A, Merchant TE, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumors (ATRT): improved survival in children 3 years of age and older with radiation therapy and high-dose alkylator-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2005;23(7):1491-9. [Crossref] [PubMed]
- Panandiker ASP, Merchant TE, Beltran C, Wu S, Sharma S, Boop FE, et al. Sequencing of local therapy affects the pattern of treatment failure and survival in children with atypical teratoid rhabdoid tumors of the central nervous system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82(5):1756-63. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Mohapatra I, Santosh V, Chickabasaviah YT, Mahadevan A, Tandon A, Ghosh A, et al. Histological and immunohistochemical characterization of AT/RT: a report of 15 cases from India. *Neuropathology*. 2010;30(3):251-9. [Crossref] [PubMed]

20. Hilden JM, Watterson J, Longee DC, Moertel CL, Dunn ME, Kurtzberg J, et al. Central nervous system atypical teratoid tumor/rhabdoid tumor: response to intensive therapy and review of the literature. *J Neurooncol.* 1998;40(3):265-75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
21. Lafay-Cousin L, Hawkins C, Carret AS, Johnston D, Zelcer S, Wilson B, et al. Central nervous system atypical teratoid rhabdoid tumours: the Canadian Paediatric Brain Tumour Consortium experience. *Eur J Cancer.* 2012;48(3):353-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
22. Packer RJ, Biegel JA, Blaney S, Finlay J, Geyer JR, Heideman R, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system : report on workshop. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002;24(5):337-42. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
23. Sévenet N, Sheridan E, Amram D, Schneider P, Handgretinger R, Delattre O. Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1342-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
24. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res.* 1999;59(1):74-9.
25. Hilden JM, Meerbaum S, Burger P, Finlay J, Janss A, Scheithauer BW, et al. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumor: results of therapy in children enrolled in a registry. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2877-84. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
26. Judkins AR, Mauger J, Ht A, Rorke LB, Biegel JA. Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 in pediatric CNS neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(5):644-50. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Sigauke E, Rakheja D, Maddox DL, Hladik CL, White CL, Timmons CF, et al. Absence of expression of SMARCB1/INI1 in malignant rhabdoid tumors of the central nervous system, kidneys and soft tissue: an immunohistochemical study with implications for diagnosis. *Mod Pathol.* 2006;19(5):717-25. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Lever E, Sheer D. The role of nuclear organization in cancer. *J Pathol.* 2010;220(2):114-25. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
29. Hasselblatt M, Gesk S, Oyen F, Rossi S, Viscardi E, Giangaspero F, et al. Nonsense mutation and inactivation of SMARCA4 (BRG1) in an atypical teratoid/rhabdoid tumor showing retained SMARCB1 (INI1) expression. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(6):933-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Schneppenheim R, Frühwald MC, Gesk S, Hasselblatt M, Jeibmann A, Kordes U, et al. Germline nonsense mutation and somatic inactivation of SMARCA4/BRG1 in a family with rhabdoid tumor predisposition syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010;86(2):279-84. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]