

Kde končí a začíná diagnóza Ewingova sarkomu - popis dvou neobvyklých kostních nádorů s translokací t(20;22)(EWSR1-NFATc2)

Zdeněk Kinkor¹, Tomáš Vaněček¹, Marián Švajdler Jr.², Petr Mukenšnábl¹,
Karel Veselý³, Jan Baxa⁴, Milan Kokavec⁵

¹ Bioptická laboratoř s.r.o., Šiklův ústav patologie, LF UK, Plzeň

² Oddělení patologie, Univerzitní nemocnice L. Pasteura, Košice

³ I. patologicko-anatomický ústav, LF MU a FN u sv. Anny, Brno

⁴ Klinika zobrazovacích metod, LF UK, Plzeň

⁵ Ortopedická klinika, Univerzitní nemocnice Akademia Déreza, Bratislava

SOUHRN

Popisovány jsou dva případy primárního „Ewing-like“ sarkomu ve femuru 12letého chlapce a humeru 28letého muže. Morfologie obou nádorů byla shodná a sestávala ze solidních hnízd mozaikovitě uspořádaných, kulatých buněk se světlou cytoplazmou a pravidelnými jádry. Výsledné organoidní uspořádání, včetně bohaté septální vaskularizace a významné příměsi eozinofilních leukocytů, připomínalo neuroendokrinní tumor. Imunohistochemickým vyšetřením byla zjištěna pozitivita antigenů CD10, CD99, CD138. Molekulární analýza prokázala u obou sarkomů přítomnost fúzního transkriptu EWSR1-NFATc2 vycházející z translokace t(20;22), jež byla zároveň doprovázena amplifikací částí těchto genů a jejich přilehlých oblastí. Oba nádory se chovaly agresivně a byly primárně chemorezistentní. Léze v humeru 4 roky po resekci rozsáhle místně recidivovala s rozpadem osteosyntézy a v plicích byly zjištěny suspektní metastázy. Tumor femuru byl definitivně řešen totální femorální endoprotézou a hoch je po 11 měsících od stanovení diagnózy bez recidivy. Diskutováno je taxonomické postavení těchto vzácných lézí v rámci heterogenní skupiny tzv. „Ewing-like“ sarkomu.

Klíčová slova: pažní kost – stehenní kost – Ewingův sarkom – Ewing-like sarkom – translokace t(20;22)(EWSR1-NFATc2) – amplifikace

Where does Ewing sarcoma end and begin - two cases of unusual bone tumors with t(20;22)(EWSR1-NFATc2) alteration

SUMMARY

The authors present two cases of Ewing-like sarcoma of the humerus and femur of a 12-year-old boy and a 28-year-old male, respectively. Identical morphology in both tumors consisted of multiple solid nests with a mosaic collection of small, round, uniform cells with clear cytoplasm and no apparent nuclear atypia. A monotonous structural arrangement, including both rich vascularity of bordering septae and significant admixtures of eosinophil leucocytes, resulted in a final organoid “neuroendocrine-like” pattern. Immunohistochemistry revealed diffuse strong CD10, CD99 and CD138 positivity. Detailed molecular analysis in both tumors confirmed translocation t(20;22) resulting in an EWSR1-NFATc2 fusion gene. Additionally, this translocation was accompanied by amplification of the proximal part of the genes and surrounding areas. Clinically, both neoplasms behaved aggressively and they were primarily chemoresistant. Four years later, the patient with the lesion in the humerus developed a massive local recurrence with a disruption of osteosynthesis. The last follow-up disclosed suspicious metastatic deposits in the lung. The boy with the femoral tumor underwent a total femoral prosthesis and there are no signs of local or systemic recurrence after 11 months of follow-up.

The authors discuss the taxonomic placement of these rare examples of Ewing-like sarcoma family in the light of new molecular discoveries.

Keywords: bone – humerus – femur – small blue round cell tumor – Ewing sarcoma – Ewing-like sarcoma – t(20;22)(EWSR1-NFATc2) – amplification

Cesk Patol 2014; 50(2): 87-91

Ewingův sarkom/PNET (ES) je po osteosarkomu druhým nejčastějším maligním tumorem kostí v dětském věku (1). K jeho

Adresa pro korespondenci:

Doc. MUDr. Zdeněk Kinkor, Ph.D.

Bioptická laboratoř s.r.o.

Mikulášské nám. 4, 326 00 Plzeň

tel.: 737 220 449

e-mail: kinkor@medima.cz

spolehlivé diagnostice v současné době již nestačí pouze klasický histologický obraz hematoxylin-eozinového preparátu, který může být neodlišitelný od biologicky a histogeneticky rozmanité skupiny tzv. nádorů z malých tmavých buněk jako např. lymfoblastického lymfomu, neuroblastomu, rhabdomyosarkomu, mezenchymálního chondrosarkomu, Wilmsova tumoru, malobuněčného osteosarkomu, adamantinomu, desmoplastického kulatobuněčného malobuněčného tumoru, a dalších. Molekulárně genetický průkaz zlomu/translokace EWSR1 genu společně s detekcí konkrétního fúzního partnera je nyní pokládán

za standard přesné diagnostiky ES určující léčbu a prognostické výhledy. Výsledky molekulárních analýz dokládají nejen vysokou „zlomovou potenci“ *EWSR1* genu, ale především pestrou škálu možných tzv. „driving“ translokací, široce přesahující kategorii malobuněčného, kulatobuněčného sarkomu Ewingova typu (2-9). Nejčastějším typem molekulární alterace ES jsou translokace t(11;22)(*EWSR1-FLI1*) a t(21;22)(*EWSR1-ERG1*), reprezentující více jak 95% vyšetřených tumorů (10-14). Tito fúzní partneři genu *EWSR1* náležejí do skupiny vysoce homologních tzv. ETS („*E26 transforming sequence*“) transkripčních faktorů. Vzácně se pak v onkogenezi ES uplatňuje fúze *EWSR1* i s dalšími ETS geny, jako např. *ETV1*, *ETV4* a *FEV* (11,12,15). Celá tato skupina tumorů bývá v literatuře často označována jako tzv. „*Ewing-family*“, kde dosud nebyl hodnověrně prokázán prognostický ani prediktivní význam jednotlivých aberací ani jejich podtypů (10,16). Plošné vyšetřování molekulárního profilu kulatobuněčných sarkomů Ewingova typu odhalilo posléze další ojedinělé fúzní možnosti, kde však vedle *EWSR1* alterovali partneři mimo okruh ETS genů např. t(1;22) (*ZGS*), t(2;22) (*SP3*), t(4;22) (*SMARCA5*), t(6;22) (*POU5F1*) a t(20;22) (*NFATc2*) (12,15,17). Pro toto malé uskupení řádově jednotek tumorů se pracovní užívat termín „*Ewing-like family*“. Publikované léze se vyskytovaly ve skeletu i měkkých tkáních a chovaly se vesměs velmi agresivně. I přesto, že společným jmenovatelem byl malobuněčný vzhled a CD99 pozitivita, mnozí autoři vzápětí spekulují o tom, že ve skutečnosti by se mohlo jednat o jiné neoplázie, byť fenotypově příbuzné.

Předkládáme dvě pozorování vyjimečného sarkomu kosti, u nichž neobvyklý mikroskopický vzhled a identické molekulární pozadí (včetně unikátní amplifikace fúzního genu *EWSR1-NFATc2*) věrně kopírovaly nálezy čtyř izolovaných případů uveřejněných dosud pouze v jediné práci (17).

MATERIÁL A METODIKA

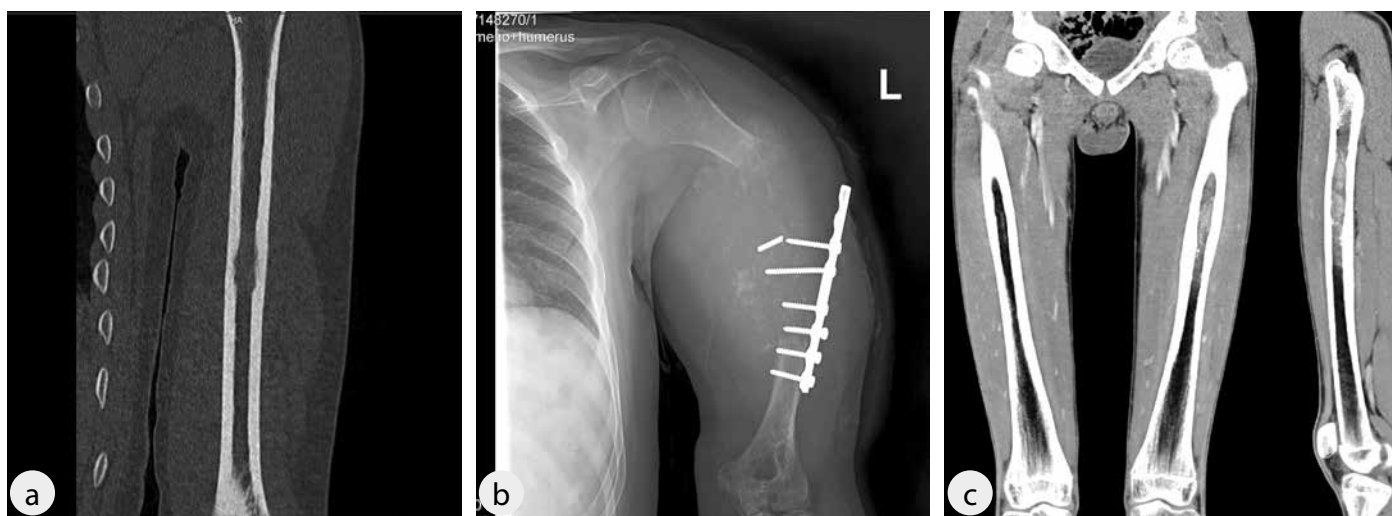
Materiál byl fixován v 10% formolu a zalit do parafínu (FFPE); pro barvení hematoxylinem eozinem a pro fluorescenční „*in situ*“ hybridizaci (FISH) byly krájeny řezy silné 2 mm, pro imunohistochemické vyšetření řezy silné 4 mm. Imunohistochemické vyšetření bylo prováděno elektronicky nastaveným protokolem v automatu BenchMark ULTRA, VENTANA/Roche. K vizualizaci reakce byl použit diaminobenzidin tetrahydrochlorid, k dobarvení jader metylénová modř. Seznam použitých protilátek, výrobce, klon a ředění jsou uvedeny v tabulce (tab. 1).

FISH analýza byla provedena prostřednictvím *EWSR1* „break apart“ sondy (VYSIS/Abbott, Molecular, IL, USA) a následně též pomocí *NFATc2* „break apart“ sondy vyrobené z BAC (bakteriální arteficiální chromosom) klonů RP5-827A12 a RP5-1106N18 (BlueGnome, Cambridge, UK). DNA byla izolována za použití QIASymphony DNA Mini kitu (Qiagen, Hilden, Germany) na automatizovaném extrakčním systému QIASymphony SP (Qiagen) dle protokolu výrobce pro FFPE vzorky (Purification of genomic DNA from FFPE tissue using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit and Deparaffinization Solution). Ke komparativní genomové hybridizaci na čipu (aCGH) bylo využito sklo NimbleGen 385K Human CGH WG-T v2.0 (Roche NimbleGen Inc., Madison, WI, USA). RNA byla extrahována pomocí RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kitu (Ambion, Austin, TX, USA). Reverzní tran-

Tab. 1.

Název	Klon	Výrobce	Ředění	Výsledek reakce
CD3	PS1	Novocastra	1:50	-
CD4	SP35	Ventana	předředěno	-
CD10	SP67	Ventana	předředěno	++
CD43	L60	Ventana	předředěno	-
CD45RO (UCHL1)	UCHL1	Dako	Dako	-
CD56	1B6	Novocastra	1:200	-
CD79a	SP18	Ventana	předředěno	-
CD99	O13	Ventana	předředěno	++
CD138	B-A38	Ventana	předředěno	++
CK AE1/3	PCK26	Ventana	předředěno	-
CK Cam5.2	CAM 5.2	Ventana	předředěno	-
CK Oskar	IsoType: IgG2	Covance	1:100	-
EMA	E29	Dako	1:400	-
FLI1	MRQ1	Cell Marque	1:50	-
Chromogranin A	DAK-A3	Dako	1:100	-
Kappa	polyclonal	Ventana	předředěno	-
Lambda	polyclonal	Ventana	předředěno	-
Mastocytární tryptáza	AA1	Dako	předředěno	-
Myeloperoxidáza	polyclonal	Ventana	předředěno	-
PAX5	SP34	Ventana	předředěno	-
p63	4A4	Ventana	předředěno	-
Synaptofysin	SP11	Ventana	předředěno	-
S100 protein	polyclonal	Dako	1:2000	-
T-200 (LCA)	2B11+PD7/26	Dako	1:100	-

CD - cluster of differentiation, CK - cytokeratin, EMA - epitelní membránový antigen, LCA - společný leukocytární antigen, PAX5 - panB-cell marker, UCHL1 - panT cell marker.
Výsledek reakce: důležitě silně pozitivní ++; pozitivní +; negativní -;



Obř. 1. Případ 1. **A.** Primární osteolytická léze centrální diafýzy humeru bez známek šíření do okolí (CT). **B.** Rozsáhlá místní recidiva s kompletní destrukcí štěpu i přilehlé původní kosti a poškozením kovové osteosyntézy; masivní progresse tumoru do měkkých tkání (RTG). **C.** Případ 2. Primární osteolytická léze excentricky uložená v diafýze femuru bez porušení kompaktní kosti a známek šíření do okolí (CT s kontrastem).

skripce (RT) byla provedena kitem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). K detekci fúzního transkriptu *EWSR1-NFATc2* byla využita RT-PCR s HotStar Taq PCR Master Mixem (Qiagen) a s primery amplifikujícími oblast předpokládané fúze.

Sekvenční analýza pro ověření specifity fúzního transkriptu byla provedena pomocí Big Dye Terminator Sequencing kitu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

POPIS PŘÍPADŮ

Případ 1. U 28letého muže s neustupujícími bolestmi v levé paži byla prokázána osteolýza střední části diafýzy humeru (obr. 1A). V probatorní biopsii a následné resekci 4 cm dlouhého úseku kosti s náhradou aloštěpem byla s jistými rozpaky stanovena diagnóza difúzního velkobuněčného B maligního lymfomu (DLBCL). „Staging“ potvrdil izolované postižení skeletu a nemocný podstoupil chemoterapii dle standardního protokolu. Po čtyřech letech došlo k rozsáhlé místní recidivě, rozrušení fixační osteosyntézy a masivní měkkotkáňové propagaci tumoru (obr. 1B). Rebiopsie měla obdobný mikroskopický vzhled. Nově přípůsobené léčebné schéma bylo bez efektu; pacient žije posledních 5 měsíců se suspektním metastatickým rozsevem v plicích.

Případ 2. U 12lého chlapce s trvalou bolestí ve stehně byl zjištěn tumor diafýzy levého femuru v rozsahu 7 cm, bez rozrušení kompakty a známek šíření procesu do okolních měkkých tkání (obr. 1C). Po histologickém závěru v.s. Ewingova sarkomu následovala příslušná neoadjuvantní chemoterapie, která však byla

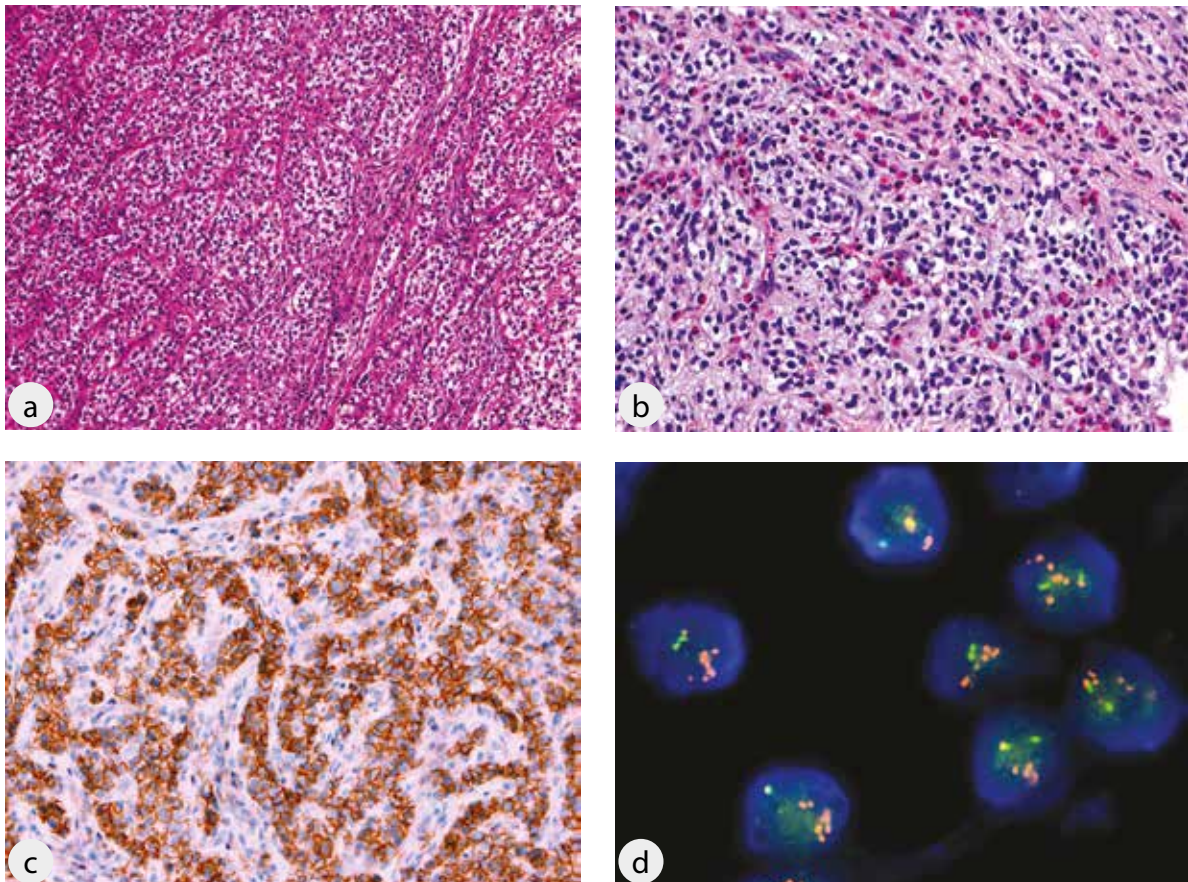
klinicky/radiologicky evidentně neúčinná. Přistoupilo se tedy k totální endoprotéze femuru a hoch je 11 měsíců od stanovení diagnózy bez známek místní či systémové recidivy.

VÝSLEDKY

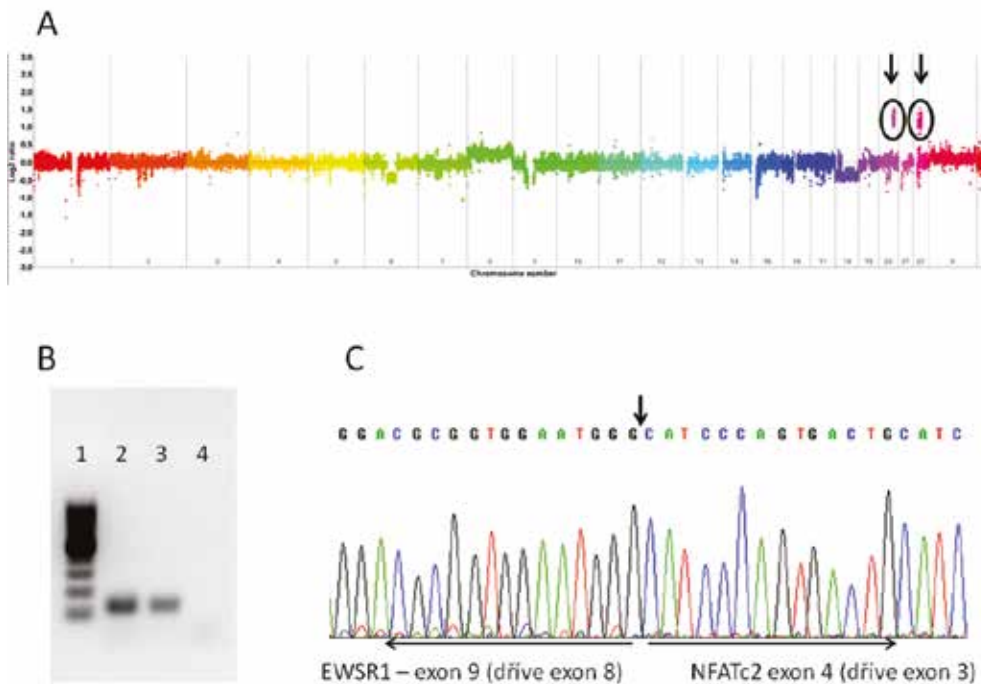
Morfologický vzhled byl u obou případů totožný. Převažující solidní úpravu nádoru doprovázela bohatá kapilární vaskularizace zvyrazňující dojem organoidního upořádání, které připomínalo neuroendokrinní tumor typu karcinoidu či paragangliomu (obr. 2A). Mozaikovitě seskupené nádorové buňky měly malá kulatá, pravidelná jádra s ojedinělou mitotickou aktivitou bez atypických figur. Objemná, nápadně světlá cytoplazma se zřetelnými konturami výsledných solidních hnízd kontrastovala s výrazně červenou, zrnitě granulovanou cytoplazmou hojně příměsí téměř vsudypřítomných eozinofilů (obr. 2B). Až na ojedinělá drobná ložiska nekrózy vypadal tumor blandně, uniformně až monotónně, bez cytologických atypií či jaderného pleomorfizmu. V nádorových elementech se histochemicky nepodařilo prokázat glykogen, hlen ani lipidy.

Imunohistochemickým vyšetřením byla zjištěna difúzní, silná pozitivita CD10, CD99 a CD138 (obr. 2C). Další panel použitých protilátek reagoval kompletně negativně (tab. 1).

Molekulárně genetickým vyšetřením byl nejprve u obou případů pomocí FISH zjištěn zlom genu *EWSR1* doprovázený amplifikací proximálně situované části sondy (obr. 2D). Následně byla provedena aCGH, při jejíž analýze byl, mimo dalších změn, nalezen markantní zisk („gain“) části chromosomů 20 a 22 (obr.



Obr. 2. A. Totožná solidní mozaikovitá úprava obou nádorů s bohatou kapilární vaskularizací vytvářející dojem organoidního „neuroendokrinního“ uspořádání (HE, 200x). **B.** Nakupení četných drobných hnízd kulatých pravidelných buněk s výrazně světlou cytoplazmou a difúzní hojnou příměsí eozinofilních leukocytů (HE, 400x). **C.** Difúzní, silná membránová exprese antigenu CD99 v nádorových elementech (imunohistochemie). **D.** Pozitivní FISH analýza zlomu genu *EWSR1* s amplifikací proximálně situované části sondy - červené signály (*EWSR1* break apart probe, AbbottMolecular).



Obr. 3. A. Array CGH s vyznačenými oblastmi získů (gains) na chromosomech 20 a 22. Gain na chromosomu 20 zasahuje část genu NFATc2, gain na chromosomu 22 část genu EWSR1.

B. Agarová elektroforéza s produkty RT-PCR k průkazu fúzního genu EWSR1-NFATc2 (1 - marker; 2 - fúzní transkript EWSR1-NFATc2 pacienta 1; 3 - fúzní transkript EWSR1-NFATc2 pacienta 2; 4 - „non-templátová“ kontrola). **C.** Sekvence fúzního transkriptu EWSR1-NFATc2. Fúze mezi exonem 9 (dříve 8) genu EWSR1 a exonem 4 (dříve 3) genu NFATc2.

3A). Zisk v oblasti chromosomu 20 zasahoval i část genu *NFATc2*, zisk v oblasti chromosomu 22 zahrnoval též část genu *EWSR1*. Po provedení této analýzy byla designována „break apart“ sonda k FISH průkazu zlomu genu *NFATc2* a současně s tím primery k detekci fúzního transkriptu *EWSR1-NFATc2*. FISH analýza prokázala zlom genu *NFATc2* s amplifikací proximální části sondy. Současně s tím byl detekován fúzní transkript spojující exon 9 (dříve v literatuře exon 8) genu *EWSR1* s exonem 4 (dříve v literatuře exon 3) genu *NFATc2* (obr. 3B,C).

DISKUZE

Molekulárně genetická analýza specifických markerů je pro přesnou diagnostiku některých nádorů klíčová a např. diferenciální diagnostika malobuněčných kulatobuněčných tumorů dětského věku jasně ukazuje, že standardní HE preparát se škálou imunohistochemie, byť v rukou zkušeného specialisty, prostě již nestačí. Na druhou stranu poznatky získané rutinním genetickým vyšetřováním naznačují, že molekulární mechanismy jsou velmi složité, a že některé zdánlivě definující genové alterace jsou jen dílčím momentem celého komplexu dějů, dosud neprobádaných, které mohou být patogeneticky někdy významnější než konkrétní známý defekt DNA. Obecná a velmi zjednodušená představa patobiologie Ewingova sarkomu spočívá v tom, že ETS úsek fúzního genu rozhoduje o specifickém vazebném místě na DNA s následnou aktivací/inaktivací příslušných cílových genů. Tvrdí se, že tato specifita je společná/jedinečná pro všechny funkčně homologní geny skupiny ETS jako jsou *FLI*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4* a *FEV* (12,17). Proč však výsledný kulatobuněčný, malobuněčný morfo-/fenotyp je pak ale téměř shodný i u spojení *EWSR1* s naprosto odlišnými geny mimo ETS spektrum - tedy tzv. „Ewing-like family“, není zcela jasné.

Podobně nesrozumitelnou paralelou též může být histogeneticky různorodá třída úplně jiných „non Ewingovských“ nádorů, kde se *EWSR1* patogeneticky uplatňuje - např. světlobuněčný sarkom měkkých tkání a jeho „gastrická analogie“, atypický fibrózní histiocytom, primární plicní myxoidní sarkom, salivární světlobuněčný hyalinizující karcinom, myoepiteliom měkkých tkání atd. (3-9). Zde paradoxně molekulární partner-

ství totožných genů dá vzniknout histologicky a biologicky naprosto rozdílným nádorům. Jednoznačné vysvětlení tohoto zdánlivě nelogického fenoménu zatím neexistuje; uvažuje se jak o epigenetických, transkripčních či posttranslačních dějích, tak o principiální důležitosti histotypu původního buněčného substrátu, ve kterém příslušná genetická aberace proběhne (12).

Konečně, nedávno se v písemnictví objevilo několik izolovaných sdělení popisujících nově nalezené aberace u nediferencovaného kulatobuněčného „Ewing-like“ sarkomu nezasahující gen *EWSR1*; jde konkrétně o translokaci t(4;19)(CIC-DUX4) a intrachromozomální fúzi (*BCOR-CCNB3*) na chromozomu X (18-20). Většina autorů zde již otevřeně obhajuje stanovisko, že v rámci heterogenní tzv. „Ewing-like family“ existují tumory, které díky nespecifické morfologii nelze spolehlivě definovat jinak než geneticky.

Ve světle výše uvedených skutečností se tedy zdá celá skupina molekulárně značně heterogenního tzv. „Ewing-like“ sarkomu poněkud umělá. Méně než dvě desítky dosud publikovaných sporadických případů spojuje nespecifický zlom *EWSR1* genu, CD99 pozitivita, měkkotkáňová a skeletální lokalizace, značná agresivita a nediferencovaný malobuněčný, kulatobuněčný vzhled. Je to v současnosti ještě dostatečně definující a vymezující pro toto uskupení?

Čtyři dříve popsané a obě naše vyšetřované léze, charakterizované translokací t(20;22) (*EWSR1-NFATc2*), se výše zmíněné sestavě přeci jen poněkud vymykají (17). Jeden měkkotkáňový (stehno) a celkem 5 kostních tumorů (4x femur, 1x humerus) vykazovalo shodný vzhled kompaktního, solidně alveolárního, mozaikovitého až organoidního uspořádání buněk s nápadně světlou cytoplazmou a alespoň v našich nádorech s nepřehlédnutelnou, významnou příměsí eozinofilních leukocytů. Originální práce hodnotí morfologii oproti klasickému ES jako atypickou, ale vyjma exprese CD99 detailnější imunoprofil neuvádí; my jsme prokázali identickou konfiguraci imunofenotypu s pozitivitou CD10, CD99 a CD138. Nejzajímavější je naprosto souhlasné molekulární pozadí u všech šesti nádorů ve smyslu dispozice místa zlomu *EWSR1* resp. *NFATc2* genů a detailního uspořádání výsledného fúzního genu, včetně jedinečné amplifikace, která nebyla ještě nikdy v rámci ES popsána.

Pro přesné pochopení biologického významu uváděné raritní genetické poruchy doprovázející tento mimořádný nádor a jeho odpovídající taxonomické začlenění je nutné nejen hlubší molekulárně patologické poznání, ale též širší klinicko-onkologická zkušenost. Oba námi sledované případy se chovaly značně agresivně a běžný léčebný protokol pro ES byl neúčinný.

V této souvislosti si určitě zaslouží pozornost i aktuálně publikovaná práce o benigním hemangiomu kosti s t(18;22)(EWSR1-NFATC1) genotypem (2). Jakkoliv homologní a ze stejné skupiny jako NFATC2 vycházející, NFATC1 gen se objevuje na molekulárním pozadí při formování histogeneticky odlišné, benigní „non Ewingovské“ léze. Jedním z možných vysvětlení neočekávané morfologické projekce této genetické aberace by mohl být fakt, že zde, na rozdíl od diskutované EWSR1-NFATC2 fúze, nedochází k amplifikaci nové genové chiméry. Nelze totiž vyloučit, že právě amplifikace EWSR1-NFATC2 fúzního genu společně s koamplifikací sousedních genů může být zodpovědná za výsledné agresivní biologické chování (17).

ZÁVĚR

Prezentovány byly dva neobvyklé kostní nádory se shodným histologickým obrazem a t(20;22) (EWSR1-NFATC2) genotypem. Domníváme se, že jejich začlenění v biologicky neurčité skupině „Ewing-like“ sarkomu je přinejmenším stejně odvážné jako spekulace, že by se ve skutečnosti mohlo jednat o naprosto jiné tumory. Nesporné však je, že existuje celé spektrum neoplázií s neodlišitelnou morfologií, kde zlom EWSR1 genu prokázáný metodou FISH v žádném případě neznamena, že se jedná o proces příbuzný s klasickým ES. Je zřejmé, že bez detailní extenzivní analýzy molekulárního pozadí konkrétní léze není spolehlivé a přesné začlenění v rámci stávající klasifikace možné.

PODĚKOVÁNÍ

Děkujeme prim. MUDr. Igorovi Suškevičovi z Kliniky zobrazovacích metod, LF MU a FN u sv. Anny, Brno za laskavé poskytnutí radiologické dokumentace k prvnímu případu.

LITERATURA

1. **Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F.** Ewing sarcoma. In: *WHO classification of tumours of soft tissue and bone (4th ed)*. Lyon. International agency for research on cancer; 2013: 305-309.
2. **Arbajian E, Magnusson L, Brosjö O, et al.** A benign vascular tumor with a new fusion gene EWSR1-NFATC1 in hemangioma of bone. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 613-616.
3. **Stockman DL, Miettinen M, Suster S, Spagnolo D.** Malignant gastrointestinal neuroectodermal tumor: clinicopathologic, immunohistochemical, ultrastructural and molecular analysis of 16 cases with reappraisal of clear cell sarcoma-like tumors of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 857-868.
4. **Thway K, Fisher C.** Tumors with EWSR1-CREB1 and EWSR1-ATF1 fusions: the current status. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: e1-11.
5. **Thway K, Nicholson AG, Lawson K, et al.** Primary pulmonary myxoid sarcoma with EWSR1-CREB1 fusion: a new entity. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 1722-1732.
6. **Cheah AL, Goldblum JR, Billings SD.** Molecular diagnostics complementing morphology in superficial mesenchymal tumors. *Semin Diagn Pathol* 2013; 30: 95-109.
7. **Tanguay J, Weinreb I.** What EWSR1-ATF1 fusion has taught us about hyalinizing clear cell carcinoma? *Head Neck Pathol* 2013; 7: 28-34.
8. **Boland JM, Folpe AL.** Cutaneous neoplasm showing EWSR1 rearrangement. *Adv Anat Pathol* 2013; 20: 75-85.
9. **Tanas MR, Rubin BP, Montgomery EA, et al.** Utility of FISH in the diagnosis of angiomatoid fibrous histiocytoma: a series of 18 cases. *Mod Pathol* 2010; 23: 93-97.
10. **Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, et al.** EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1809-1814.
11. **Gamberi G, Cocchi S, Benini L, et al.** Molecular diagnosis in Ewing family tumors. The Rizzoli experience - 222 consecutive cases in four years. *J Mol Diagn* 2011; 13: 313-324.
12. **Sankar S, Lessnick SL.** Promiscuous partnership in Ewing's sarcoma. *Canc Gen* 2011; 204: 351-365.
13. **Wang W-L, Patel NR, Caragea M.** Expression of ERG, an Ets family transcription factor, identifies ERG-rearranged Ewing sarcoma. *Mod Pathol* 2012; 25: 1378-1383.
14. **Berková A, Dundr P, Povýsil C, Melčáková S, et al.** A comparison of RT-PCR and FISH techniques in molecular diagnosis of Ewing's sarcoma in paraffin-embedded tissue. *Cesk Patol* 2008; 44: 67-70.
15. **Wu H-T, Govender D.** Ewing sarcoma family of tumours: unusual histological variants and immunohenotypic characteristics. *Diagn Histo-pathol* 2012; 18: 348-355.
16. **Le Deley MC, Delattre O, Schaefer LK, et al.** Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1982-1988.
17. **Szuhai K, Ijszenga M, de Jong D, et al.** The NFATC2 gene is involved in a novel translocation in a Ewing sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. *Clin Canc Res* 2009; 15: 2259-2267.
18. **Graham C, Chilton-Macneill S, Zielenska M, Somers GR.** The CIC-DUX4 fusion transcript is present in a subgroup of primitive pediatric round cell sarcomas. *Hum Pathol* 2012; 43: 180-189.
19. **Italiano A, Sung YS, Zhang L, et al.** High prevalence of CIC fusion with double-homeobox (DUX4) transcription in EWSR1-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. *Gen Chromosomes Canc* 2012; 51: 207-218.
20. **Pierron G, Tirode F, Lucchesi C, et al.** A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nat Genet* 2012; 44: 461-466.