

# Ewing Sarkoma ile Primitif Nöroektodermal Tümör Hücre Hatlarında Agresiflik Paterninin Karşılaştırılması

## Comparison of Aggressive Pattern in Ewing Sarcoma and Primitive Neuroectodermal Tumor Cell Lines

Esra Güzel Tanoğlu<sup>1</sup>, Şükrü Öztürk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Türkiye

### ÖZ

**GİRİŞ VE AMAÇ:** Ewing Sarkoma (EWS), nöral orijinli, andiferansiye özellikle primer malign kemik tümörüdür. Primitif Nöroektodermal Tümör'ler (PNET), kötü diferansiye ve prognozları kötü seyreden malign lezyonlardır. PNET'ler morfolojik ve histolojik olarak kemiğe ait gelişen EWS'den ayırt edilememektedir. Metastaz özelliği gösteren ve farklı tedavi gerektiren PNET/EWS'nin birbirinden ayrılması tanıda büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızda; EWS (TC71, TC106, CHLA99) ve PNET (CHLA32, CHLA10, CHLA9) hücre hatlarında agresiflik paternlerini karşılaştırmayı ve hücrelerin metastaz durumunu belirlemek için epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) belirteçlerindeki değişimleri incelemeyi amaçladık.

**YÖNTEM VE GEREÇLER:** Children's Oncology Group'tan temin edilen EWS ve PNET hücre hatlarının ikilenme süreleri belirlendi. Hücrelerde fonksiyonel çalışmalar kapsamında migrasyon kapasitelerinin tespiti için scratch assay yapıldı. EWS ve PNET hücrelerinde EMT belirteçleri Real-Time PZR ile belirlendi.

**BULGULAR:** Hücre hatlarında ikilenme süresinin sırasıyla; EWS'de TC71, TC106, CHLA99, PNET'te CHLA32, CHLA9 ve CHLA10 olduğu belirlendi. Hücrelerin migrasyon kapasitelerinde ikilenme süreleri ile benzerlik saptandı. Metastatik belirteçlerden; SNAIL1, SNAIL 2, ZEB1, ZEB2 ve Vimentin ifade düzeylerinin TC-71'de TC-106 ve CHLA-99'a göre daha yüksek olduğu, NCad ifadesinin ise CHLA99'da en yüksek olduğu saptandı. PNET hücre hatlarından CHLA32'de ZEB1, ZEB2, SNAIL1 SNAIL 2, NCad ve Fibronektin ifade düzeylerinin CHLA-9 ve CHLA-10'a göre daha yüksek olduğu, ECad'ın en fazla CHLA-10'da, Vimentin için sırasıyla CHLA-9 CHLA-32 ve CHLA-10 olduğu bulundu.

**TARTIŞMA VE SONUÇ:** Çalışma sonucunda, EWS'de agresiflik düzeyleri sırayla azalarak, TC71, TC106 CHLA99, PNET'te CHLA32, CHLA10, CHLA9 hücreleri olduğu saptandı. Hücrelerin agresiflik düzeylerinin aydınlatılması EWS ve PNET'in metastaz tanısında rol alabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi, erken tanı ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ewing Sarkoma; Primitif Nöroektodermal Tümör; Metastaz; Hücre Hattı

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Ewing Sarcoma (EWS) is a primary malignant bone tumor of neural origin with undifferentiated characteristics. Primitive Neuroectodermal Tumors (PNET) are malignant lesions with poorly differentiated and poor prognosis. PNETs cannot be morphologically and histologically distinguishable from EWS of the bone. In this study, we aimed to compare the patterns of aggression in EWS and PNET cell lines and to investigate the changes in epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers to determine the metastasis status of the cells.

**METHODS:** The doubling times of EWS and PNET cell lines obtained from Children's Oncology Group were determined. Scratch assay was performed to determine the migration capacity of cells within the scope of functional studies. EMT markers in EWS and PNET cells were determined by Real-Time PCR.

**RESULTS:** The doubling time in cell lines was TC71, TC106, CHLA99 in EWS, CHLA32, CHLA9 and CHLA10 in PNET. The migration capacity of the cells was similar to the doubling time. SNAIL1, SNAIL 2, ZEB1, ZEB2 and Vimentin expression levels were higher in TC71 than TC106 and CHLA99, and NCad expression was highest in CHLA99. The expression levels of ZEB1, ZEB2, SNAIL1, SNAIL 2, NCad and Fibronectin were higher in CHLA32 compared to CHLA9 and CHLA10 in PNET. ECad was found to be at most CHLA10 and CHLA9 for Vimentin.

**DISCUSSION AND CONCLUSION:** The most aggressive and least aggressive cells were TC71, TC106 CHLA99 in EWS, CHLA32, CHLA10, CHLA9 in PNET, respectively. In the diagnosis of EWS and PNET metastasis, early diagnosis, and the development of new treatment modalities to clarify the level of aggression of the cells are important.

**Keywords:** Ewing Sarcoma, Primitive Neuroectodermal Tumor, Metastasis, Cell line

### İletişim / Correspondence:

Dr. Esra Güzel Tanoğlu

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul

E-mail: esra.guzel@sbu.edu.tr

Başvuru Tarihi: 08.10.2019

Kabul Tarihi: 10.12.2019

## GİRİŞ

Ewing Sarkoma (EWS) çocukluk çağının sık görülen kemik kanseri türlerindedir ve vakaların yaklaşık %15'ini 10 yaşın altındaki çocuklar oluşturmaktadır (1). EWS, Askin tümörleri ailesi grubundaki tümörlerde olduğu gibi t(11;22) kromozom translokasyonu ile karakterizedir (2).

Primitif nöroektodermal tümör (PNET); farklılaşmamış, büyük oranda malign, yumuşak doku ve kemiği etkileyen küçük yuvarlak hücreli nadir tümörlerdendir (3). Tipik olarak serebrumda yer alan PNET'ler, genellikle çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülmesine rağmen her yaşta karşılaşılabilen agresif tümörlerdir. PNET'ler, bu grupta yer alan küçük hücreli osteosarkom, mezenkimal kondrosarkom, kemik lenfoması gibi diğer küçük hücreli tümörlerden klinik ve patolojik olarak farklı özelliklere sahiptirler (4). PNET hastalarının sağkalım süresinin 1-2 yıl ile sınırlı olduğu kemik, akciğer ve servikal lenf nodu metastazlarının varlığı bildirilmiştir (5).

EWS ile PNET arasında benzer fenotip ve genetik özellik bulunması nedeniyle PNET'ler, EWS tümör ailesinde sınıflandırılırlar. EWS ve PNET tümörlerinin seyri ve tedavi yaklaşımlarındaki farklılıklar nedeniyle nöroblastom, rabdomyosarkom, küçük hücreli osteosarkom gibi diğer küçük hücreli tümörlerden ayırt edilmeleri gerekmektedir (6, 7).

Normal koşullarda hücreler, embriyonik gelişim sırasında ve enflamasyona tepki olarak göç etmektedirler. Bu süreçte yer alan birincil yol, Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Epithelial Mesenchymal Transition) (EMT) olarak bilinen önemli bir gelişimsel programdır. EMT, epitel hücrelerinin epitelyal özelliklerini kaybetmesine ve bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikle mezenkimal özellik kazanmasını sağlayan gelişimsel süreçtir (8). Epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) tersi olan işlem mezenkimal-epitel geçiş (MET) işlemidir, normal gelişimde, kanser metastazında ve indüklenmiş pluripotent kök hücre yeniden programlamasında görülür (9).

Metastatik özelliğe sahip kanser hücreleri hücre dışı ağı proteinlerini kopararak dolaşıma katılır. EMT / MET geçişleri, tümör metastazı sırasında kritik bir rol oynar (10).

EMT programının sahip olduğu transkripsiyon faktörlerini oluşturan, metastaz ile bağlantılı ayrı bir grubu bulunmaktadır. Bu sayede daha çok proteinin üretiminin aktivasyonu ve epitel geçişin mezenkimal forma etkinleştirilmesi sağlanmaktadır. Karsinomlarda sıklıkla kullanılan EMT transkripsiyon faktörleri arasında; ZEB 1/2, Snail 1/2 ve E-kaderin bulunur, bunlar hücre-hücre etkileşimi, hücre-matris yapışması ve hücre iskeleti üzerinde önemli değişiklikler meydana getirir. Hücre iskeleti yeniden düzenlemeyi sağlayan mezenkimal belirteçler arasında ise N-kaderin, Vimentin ve Fibronektin yer alır (11). EWS ve PNET hücre hatlarının agresiflik oranlarının belirlenmesi bu kanserlerin fonksiyon ve progresyonlarının anlaşılmasında ve ileride yapılacak hücresel çalışmalar için önem arz etmektedir. EWS/PNET hastalığının biyolojisini anlamada bu tür çalışmaların özellikle yarar sağladığı kanıtlanmıştır (12). Bu çalışmada; Ewing sarkom ve PNET hücre hatlarının agresiflik düzeylerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması hedefledik. Bu iki tümördeki hücrelerin karşılaştırılması için fonksiyonel çalışmalar yaparak, hücrelerin metastaz yeteneklerini EMT belirteçleri ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 1. Hücre Hatlarının Temini

Ewing Sarkoma hücre hatlarından TC-71, TC-106, CHLA-99 ve Primitif Nöroektodermal Tümör hücre hatları olan CHLA-32, CHLA-9, CHLA-10, Children's Oncology Group (COG) (Texas)'tan temin edildi.

### 2. Hücre Kültürü

EWS ve PNET hücre hatları TC-71, TC-106, CHLA-9, CHLA-10, CHLA-32, CHLA-99, %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 Penisilin, Streptomisin, Ampisilin (PSA) ve L-Glutamin içeren IMDM besiyerinde %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'ye ayarlı etüv içerisinde kültüre edildi. Yoğunluk %80'e ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

### 3. Hücrelerin İkilene Hızı (Doubling Time)

Hücrelerin iki katına çıkması için gereken sürelerinin hesaplanması ile bölünme hızları belirlendi. CHLA-9, CHLA-10, CHLA-32, CHLA-99

TC-71 ve TC-106 hücre hatları 6 well plate'lere 5x10<sup>5</sup> oranında ekilerek bir hafta boyunca hücreler sayıldı. Her 24 saatte bir well de bulunan hücreye 1-2 dakika boyunca tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya) 1x çözelti ilave edildi. Hücrelerin sayım işlemi hemositometre kullanılarak (toma lamı) gerçekleştirildi. Bu yöntemin esası, mikroskop altında 0,1 mm<sup>3</sup> hacimlik alanda sayım yapılarak bir ml'de bulunan hücre sayısını belirlemektir. Medyum ile süspansne haldeki hücreler 1:1 oranında tripan blue boyası ile karıştırıldı ve toma lamında hücre sayımı yapıldı. 1 mL'de ki toplam hücre sayısını hesaplamak için; 4 alandaki toplam hücrelerin aritmetik ortalaması alındı, dilüsyon oranı (x2) ve 10,000 ile çarpılarak hesaplandı.

“Toplam hücre sayısı = 4 alanın aritmetik ortalaması x dilüsyon oranı x 10,000 x dilüsyon oranı”

#### 4. Scratch (Yara) Assay

CHLA-9, CHLA-10, CHLA-32, CHLA-99 TC-71 ve TC-106 hücreleri 6 well plate'e ekildi ve hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında 200 µL'lik pipet ucu ile kullanılarak tek bir çizgi ile hücre yüzeylerinde “yara” oluşturuldu. Hücreler 2 kere PBS ile yıkanarak hücrelerin göç etme mesafeleri 0., 6. ve 24. saatlerde invert mikroskopta fotoğrafları çekilerek kaydedildi. Hücrelerin göç miktarları her bir hücrenin 0. saatteki mesafeleri referans alınarak 6. ve 24. saatlerdeki kapanma mesafeleri ile kıyaslandı ve her bir hücre için ayrı ayrı Image J programı kullanılarak hesaplandı.

#### 5. cDNA sentezi ve Kantitatif Eş Zamanlı PZR

TC-71, TC-106, CHLA-99, CHLA32, CHLA-10 ve CHLA-9 hücre hatlarından TRIzol reagent (Invitrogen, San Diego, CA) ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların cDNA'ları, First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Switzerland- Katalog no: 04896866001) ile üretici firma protokolüne göre reaksiyon gerçekleştirildi. Metastatik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla EMT belirteçlerinin hücrelerde gösterimi Tablo 1'deki primer çiftleri kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PZR analizi ile yapıldı (13) (14) . 100 µmol primerler, 10 µmol'a seyreltildi ve reaksiyon başına 0.5 ul kullanıldı. Her PCR karışımının son miktarı, amplifikasyon için 25 ul olarak ayarlandı. Taqman

Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher-Katalog no: 4369016) kullanılarak hazırlanan Real time reaksiyon PCR karışımları (95 ° C 5 dakika), ardından 40 döngü boyunca 95 ° C'de 10 saniye, 60 ° C'de 20 saniye ve 72 ° C'de 25 saniye olacak şekilde PZR protokolü çalışıldı. Genlerin ifade analizinde iç kontrol olarak βB-aktin kullanıldı ve deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sinyaller kontrol sinyallerine oranlanarak normalize edildi ve rölatif kantitasyon değerleri hesaplandı. Taqman Gene Expression Master Mix kullanılarak hazırlanan eal time reaksiyon karışımları deney protokolüne göre hazırlandı.

#### 6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için “two-sided Student's t-test” kullanıldı. p-değeri<0.05 altındaki değerler anlamlı olarak kabul edildi. Hata çubukları ± standart hata değerleri kullanılarak çizildi.

**Tablo 1. PNET ve EWS hücre hatlarına ait bilgiler**

Hücre Hattı	Hücre Tipi	Cinsiyet-Yaş	İrk	Tümör Kökeni
TC-71	EWS	E-22	-	Humerus
TC-106	EWS	K-19	-	-
CHLA-99	EWS	-	-	-
CHLA-9	PNET	K-14	Kafka s	Toraks
CHLA-10	PNET	K-168 ay	Kafka s	Toraks
CHLA-32	PNET	K-8,5	-	-

#### BULGULAR

Çalışma kapsamında Childrens Oncology Group'tan Ewing Sarkoma hücre hatları olan TC-71, TC-106, CHLA-99 ve Primitif Nöroektodermal Tümör hücre hatlarından ise CHLA-32, CHLA-9, CHLA-10 temin edildi. Hücre hatları hakkında ayrıntılı bilgi Tablo 2'de verilmiştir. EWS ve PNET hücrelerinin agresif davranış özelliklerinin tespiti amacıyla ikilenme hızları gösterildi. Hücre hatlarının büyüme hızlarının sırasıyla; TC-106> TC-71> CHLA-32> CHLA-10> CHLA-9> CHLA-99 olduğu tespit edildi. Sonuçlar doğrultusunda en agresif ve en az agresiflik özelliği gösteren hücre hatlarının EWS'ye ait olduğu saptandı. İlaveten, hücre hatları arasında agresiflik farklarının tespit edilmesi kapsamında migrasyon kapasitelerinin ölçümü amaçlandı ve hücre

hatlarına “scratch (yara) assay” yapıldı (Şekil 1). Çalışmanın sonucunda hücrelerin göç etme potansiyellerindeki farklılıklar yüzde (%) cinsinden Şekil 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. EMT markırlarına ait primer çiftleri		
Gen	5'-->3'	Referans
<i>Beta-actin-F</i>	GCCTCGCCTTTGCCGATC	(12)
<i>Beta-actin-R</i>	CCCACGATGGAGGGGAAG	
<i>E-Cad-F</i>	TGCCAGAAAATGAAAAAGG	(13)
<i>E-Cad-R</i>	GTGTATGTGGCAATGCGTTC	
<i>N-Cad-F</i>	ACAGTGGCCACCTACAAAGG	(13)
<i>N-Cad-R</i>	CCGAGATGGGGTTGATAATG	
<i>SNAIL1-F</i>	AAGATGCACATCCGAAGCC	(13)
<i>SNAIL1-R</i>	CGCAGGTTGGAGCGGTCAGC	
<i>SNAIL2-F</i>	ATACCACAACCAGAGATCCTCA	(13)
<i>SNAIL2-R</i>	GACTCACTCGCCCAAAGATG	
<i>ZEB1-F</i>	GATGATGAATGCGAGTCAGATGC	(13)
<i>ZEB1-R</i>	ACAGCAGTGTCTTGTGTTGTAG	
<i>ZEB2-F</i>	AACAACGAGATTCTACAAGCCTC	(13)
<i>ZEB2-R</i>	TCGCGTTCCTCCAGTTTTCTT	
<i>Fibronectin-F</i>	TCCCTCGGAACATCAGAAAC	(13)
<i>Fibronectin-R</i>	CAGTGGGAGACCTCGAGAAG	
<i>Vimentin-F</i>	GAGAACCTTTGCCGTTGAAGC	(13)
<i>Vimentin-R</i>	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC	

EWS hücre hatları olan TC-71, TC-106, CHLA-99’da ve PNET hücre hatları CHLA32, CHLA-10 ve CHLA-9’da agresiflik farklılıklarının doğrulanması kapsamında hücre göçü farklılıklarına etki eden faktörlerin araştırılmasına yönelik EMT belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PZR ile belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda EWS ve PNET ayrı olarak değerlendirildiğinde agresif oldukları tespit edilen TC-71 ve TC-106’de CHLA-99’a göre mezenkimal belirteçlerden olan SNAIL1, SNAIL 2, ZEB1 ve Vimentin ifade düzeylerinin daha yüksek olduğu tespit edildi. ZEB2’de ifade düzeyi yüksek olan hücrelerin sırasıyla TC71, CHLA-99, TC106 olduğu, NCad ifadesinin ise CHLA99’da en yüksek olduğu bu değerleri TC106 ve TC71’in takip ettiği saptandı

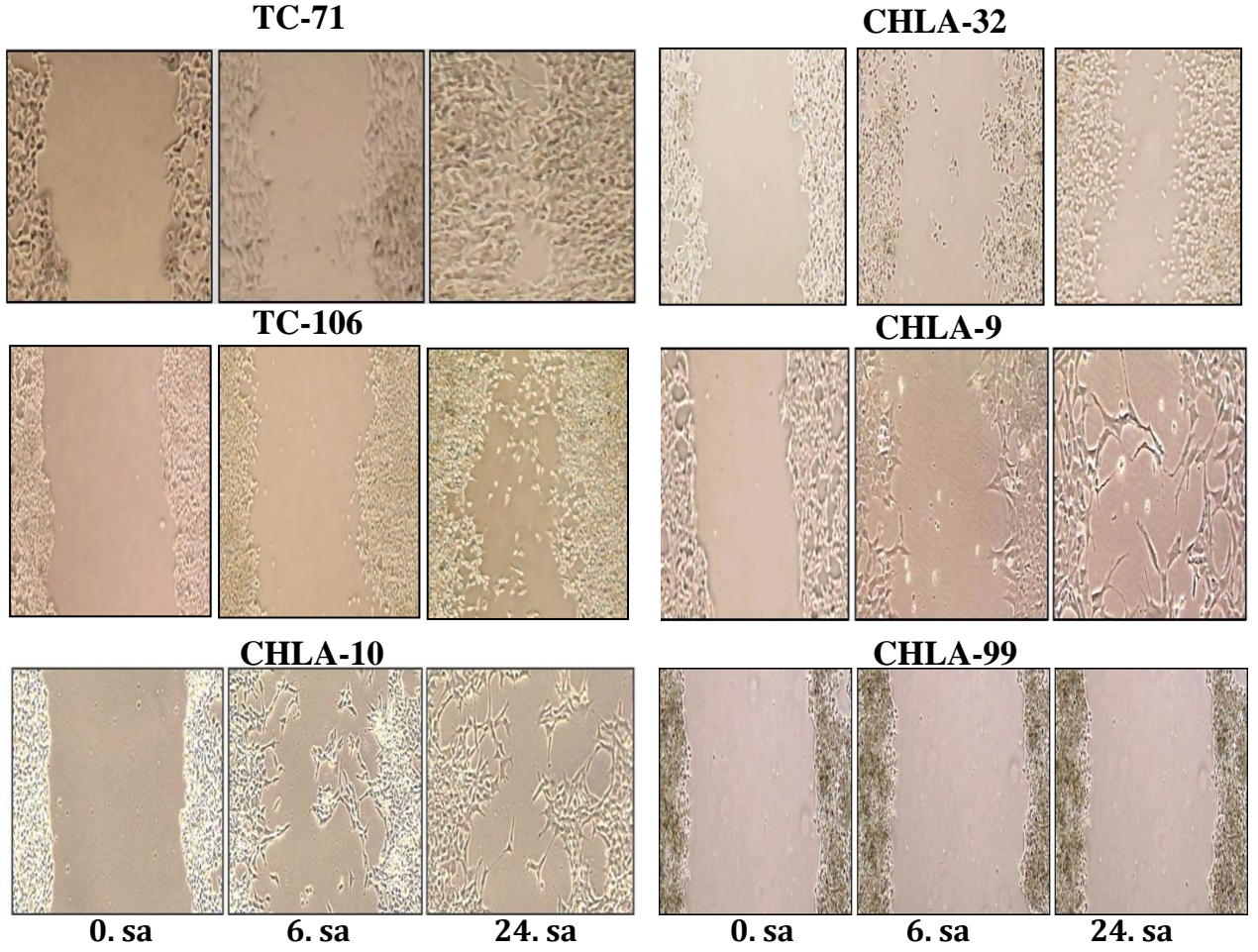
(Şekil 3). PNET hücre hatlarında ise CHLA32 hücrelerinde mezenkimal belirteçlerden ZEB1, ZEB2, SNAIL1 SNAIL 2, NCad ve Fibronectin ifade düzeylerinin CHLA-9 ve CHLA-10’a göre daha yüksek olduğu, epitelyal belirteç olan ECad’ın ise en fazla CHLA-10 hücrelerinde eksprese olduğu saptandı. Vimentin için en yüksek ifade seviyesine sahip hücrelerin sırasıyla CHLA-9 CHLA32 ve CHLA10 olduğu belirlendi. (Şekil 4) (P değerleri grafikte belirtilmiştir)

## TARTIŞMA

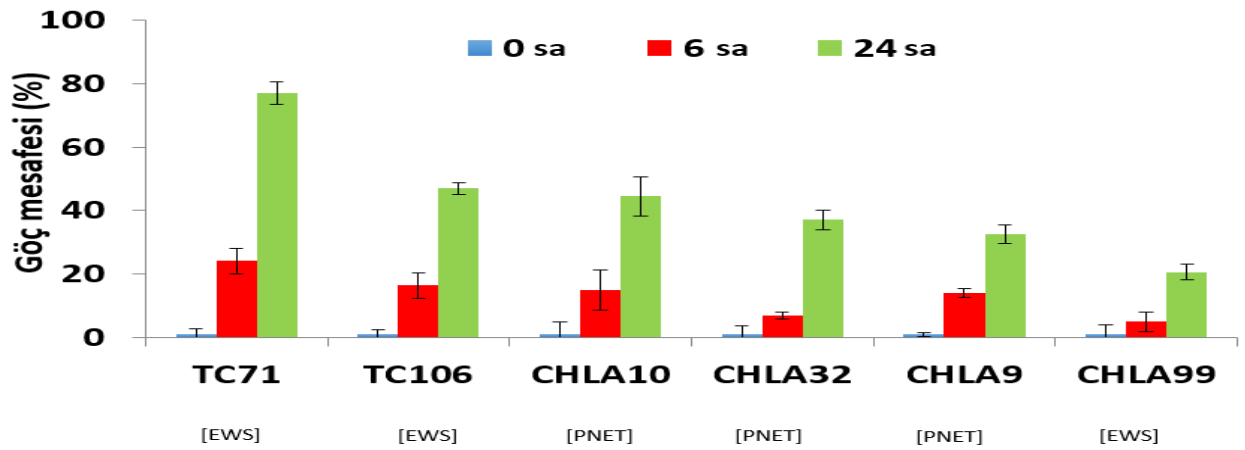
Ewing Sarkoma’nın, primitif iskelet mezenkiminden köken aldığı ve nöral histogenezi nedeniyle primitif nöroektodermal tümörle sıkı ilişkisi olduğu gösterilmiştir (4). Hastalarda uygulanan tedavi metotları bu iki kanserin kompleks arka planından ötürü kısıtlı kalmaktadır. Farklı tedavi gerektiren PNET/EWS’nin birbirinden ve diğer küçük hücreli tümör sınıflarından ayrılması tanıda büyük önem arz etmektedir (15). Tanıda sıklıkla kullanılan EWSFLI1 füzyonu, EWS/pPNET için oldukça yüksek sensitiviteye sahip bir belirteçtir. Ancak özgüllüğü daha düşük olup çeşitli vasküler tümörler ve lenfoblastik lenfomada da varlığı gösterilmiştir. EWS ve PNET’li hastaların tanısı, imünohistokimyasal analizler ve kromozomlarda translokasyonel anomalilerin varlığında konular. Bu ikisinin ayrımı ise immünohistokimyasal belirteçler, moleküler sitogenetik ve elektron mikroskopu ile sağlanmaktadır. Morfolojik olarak benzerlik gösteren bu tümörlerin ayrımında EWS ön tanısı kuvvetli olduğu durumlarda elektron mikroskopunda inceleme yapılması önerilir (16). Hücrelerin etki ve fonksiyonlarının tespiti, karakterize edilmeleri konusundaki gelişmeler özellikle kanser gibi hastalıkların prognozu ve progresyonu hakkında bilgi sağlanmasına ışık tutmaktadır (17).

COG tarafından sağlanan EWS ve PNET hücre hatlarının agresiflik karşılaştırmalarına ilişkin çalışma ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. EWS ve PNET hücre hatlarının sağlandığı COG sitesinde, bütün hücrelerin ikilenme sürelerine ait bilgiler bulunmamaktadır (18).

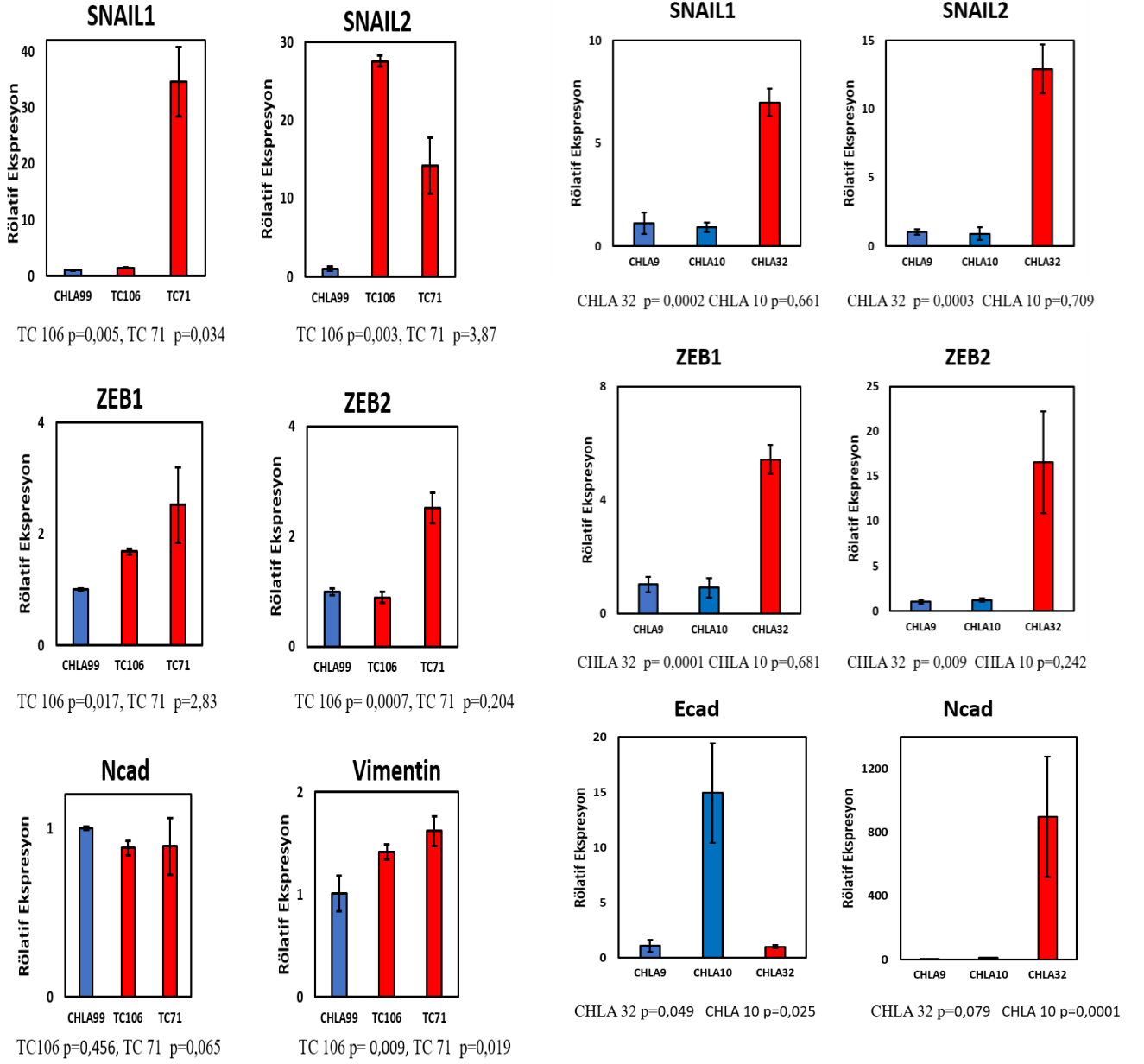




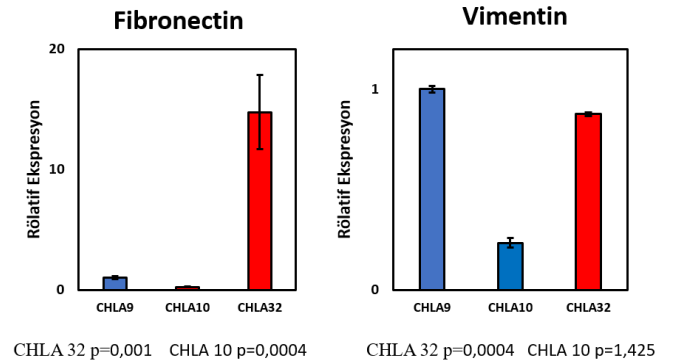
Şekil 1. Hücre hatlarının 0., 6. ve 24. saatlerine ait scratch assay görüntüsü (sa, saat)



Şekil 2. Hücre hatlarının ikilenme sürelerini gösteren grafik (sa, saat)



Şekil 3. EWS hücrelerinin EMT belirteçlerinde ifade düzeyleri



Şekil 4. PNET hücrelerinde EMT belirteçleri

Bunun yanısıra metastaz kapasitesinden sorumlu EMT-MET geçişlerindeki özellikleri için hücrelerin spesifik belirteçlerde olan ifade düzeyleri belirlenmiş ve hücrelerin agresiflik paternleri gösterilmiştir.

EMT'nin özellikleri, E-kadherin gibi yapısal adezyon bileşenlerinin kaybını ve vimentin gibi mezenkimal hücre markörlerinin kazancını içerir (19). EMT'nin aşırı aktive edici aktivitesinin tümörün ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunur ve birçok kanserde kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (20, 21). Sarkomlar ile ilgili yapılan in vitro çalışmalarda EMT / MET ile ilişkili markörlerin ifadesinin TGFb, WNT, MEK / ERK, PI3K / AKT, NF-kb gibi çeşitli yollarla düzenlendiği gösterilmiştir (22). E-kadherin azalmasıyla EMT süreci ve kanser kök hücrelerin indüklendiği bilinmektedir. Bunun yanısıra TWIST, SNAIL ve ZEB gibi EMT transkripsiyon faktörlerinin, lenfomalar, lösemiler ve sarkomlar gibi kanser türlerinde terapi direncini ve tümör agresifliğindeki belirgin etkileri bildirilmiştir (23).

Ewing sarkomunda EWS / FLI susturulduğunda, ZEB2 ekspresyon seviyesinin, Ewing sarkom hücre hatlarında (A673, SKNMC, TC71) değişmediği, ZEB2 susturulduğunda ise ZEB1'in seviyesinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, Ewing sarkom hücrelerinde ZEB2 ifadesinin azalmasıyla hücrelerde metastatik potansiyelin azaldığı gösterilmiştir (24). EWS/PNET, E-cadherin ekspresyonu için negatif olmasına rağmen, sıkı bağlantı proteinleri claudin-1 ve ZO-1 ekspresyonlarının kısmi epitelyal farklılaşmayı gösterdiği bildirilmiştir (25). Bu bulgular doğrultusunda EWS ve PNET'in sağkalım süreçlerini, tedavi yaklaşımlarını ve yanıtlarını etkileyen farklı hücre tiplerinde agresiflik oranları tanımlanması ileride yapılacak çalışma yaklaşımlarına ışık tutacaktır. Uygulanan tedavilerin geliştirilmesi ve yaşam sürelerinin uzatılmasına yönelik etkin tedavilerin geliştirilmesi hücre hatlarında uygulanacak çalışmalarla mümkün olacaktır.

## SONUÇ

Tanımlanmış tümör hücre hatlarının araştırmalarda kullanılması kanser araştırmaları açısından son derece önemlidir. Literatür taramasında; tanımlanmış hücre hatlarında EWS ve PNET için karşılaştırmalı

agresiflik oranlarını gösteren çalışmaya rastlanmamıştır, bu nedenle çalışmamız öncül ve özgündür. EWS ve PNET hücre hatlarındaki karşılaştırmalı neticesinde EWS hücrelerinin daha agresif olduğunu gösteren lik oranlarını gösteren bu çalışmanın, EWS ve PNET hastalarının yaşam sürelerinin uzatılmasına yönelik etkin tedavi yöntemlerinin uygulanmasında gereken ileride kullanılacak hücresel çalışmalara yön verebileceği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma doktora tezinden üretilmiştir. İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21573

## KAYNAKLAR

1. Whelan J, McTiernan A, Cooper N, Wong YK, Francis M, Vernon S, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007. *Int J Cancer*. 2012;131(4):E508-17.
2. Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, et al. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*. 1994;331(5):294-9.
3. Prasad AN. Supratentorial PNET in a young child. *Indian J Pediatr*. 2011;78(5):613-5.
4. Smoll NR. Relative survival of childhood and adult medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors (PNETs). *Cancer*. 2012;118(5):1313-22.
5. Shi L, Guo Z, Wu X. Primary pulmonary primitive neuroectodermal tumor metastasis to the pancreas: a rare case with seven-year follow-up. *Diagn Pathol*. 2013;8:51.
6. Picarsic J, Reyes-Múgica M. Phenotype and immunophenotype of the most common pediatric tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(5):313-26.
7. Pappo AS, Douglass EC, Meyer WH, Marina N, Parham DM. Use of HBA 71 and anti-beta 2-microglobulin to distinguish peripheral neuroepithelioma from neuroblastoma. *Hum Pathol*. 1993;24(8):880-5.
8. Vargo MM. Brain Tumors and Metastases. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2017;28(1):115-41.

9. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442-54.
10. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*. 1980;283(5743):139-46.
11. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006;441(7092):437-43.
12. Teicher BA, Bagley RG, Rouleau C, Kruger A, Ren Y, Kurtzberg L. Characteristics of human Ewing/PNET sarcoma models. *Ann Saudi Med*. 2011;31(2):174-82.
13. Suer I, Karatas OF, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Buge O, et al. Characterization of stem-like cells directly isolated from freshly resected laryngeal squamous cell carcinoma specimens. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(4):347-53.
14. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*. 2011;71(1):245-54.
15. Thompson LD. Small round blue cell tumors of the sinonasal tract: a differential diagnosis approach. *Mod Pathol*. 2017;30(s1):S1-S26.
16. Travis WD, Asamura H, Bankier AA, Beasley MB, Detterbeck F, Flieder DB, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Coding T Categories for Subsolid Nodules and Assessment of Tumor Size in Part-Solid Tumors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(8):1204-23.
17. Giovannini M, Biegel JA, Serra M, Wang JY, Wei YH, Nycum L, et al. EWS-erg and EWS-Fli1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. *J Clin Invest*. 1994;94(2):489-96.
18. <https://www.cccells.org/cellreqs-eft.php> [
19. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
20. Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res*. 2008;68(4):989-97.
21. Kumarswamy R, Mudduluru G, Ceppi P, Muppala S, Kozlowski M, Niklinski J, et al. MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snail and is downregulated in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2012;130(9):2044-53.
22. Sannino G, Marchetto A, Kirchner T, Grünwald TGP. Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Mesenchymal Tumors: A Paradox in Sarcomas? *Cancer Res*. 2017;77(17):4556-61.
23. Kahlert UD, Joseph JV, Kruyt FAE. EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities. *Mol Oncol*. 2017;11(7):860-77.
24. Wiles ET, Bell R, Thomas D, Beckerle M, Lessnick SL. ZEB2 Represses the Epithelial Phenotype and Facilitates Metastasis in Ewing Sarcoma. *Genes Cancer*. 2013;4(11-12):486-500.
25. Schuetz AN, Rubin BP, Goldblum JR, Shehata B, Weiss SW, Liu W, et al. Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Mod Pathol*. 2005;18(11):1403-10.