

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KANONİK VE KANONİK
OLMAYAN WNT YOLAKLARININ BASKILANMASI İLE KANSER
KÖK HÜCRE POPÜLASYONUNUN VE DEDİFERANSİYASYONUN
AZALTILMASI**

HAZIRLAYAN

TANJU TÜTÜNCÜ

DOKTORA TEZİ

ANKARA – 2023

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE KANONİK VE KANONİK
OLMAYAN WNT YOLAKLARININ BASKILANMASI İLE KANSER
KÖK HÜCRE POPÜLASYONUNUN VE DEDİFERANSİYASYONUN
AZALTILMASI**

HAZIRLAYAN

TANJU TÜTÜNCÜ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. ERKAN YURTCU

DOKTORA TEZİ

ANKARA – 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde Tanju Tütüncü tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/07/2023

Tez Adı: Meme Kanseri Hücrelerinde Kanonik ve Kanonik Olmayan Wnt Yolaklarının Baskılanması ile Kanser Kök Hücre Popülasyonunun ve Dediferansiasyonun Değerlendirilmesi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 26 / 07 / 2023

Öğrencinin Adı, Soyadı: Tanju Tütüncü

Öğrencinin Numarası: 21620275

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Programı: Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Erkan Yurtcu

Tez Başlığı: Meme Kanseri Hücrelerinde Kanonik ve Kanonik Olmayan Wnt Yolaklarının Baskılanması İle Kanser Kök Hücre Popülasyonunun ve Dediferansiasyonun Azaltılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 52 sayfalık kısmına ilişkin, 20 / 07 / 2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 16'dır. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih: 26 / 07 / 2023

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji doktora eğitimim boyunca tecrübesi, bilgi birikimi, özverisi ve dostluğu ile her zaman bana destek olan, ufkumu açan değerli hocam Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. F.Belgin Ataç'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji doktora tezimin her aşamasında tüm detaylarda ve her konuda yardımını asla esirgemeyen, her türlü sorunu çözmek için elinden geleni yapan, sabrı, sonsuz tecrübe ve bitmez tükenmez enerjisi ile yorulmak bilmeyen çok değerli tez danışmanım ve hocam Prof. Dr. Erkan Yurtcu'ya çok teşekkür ederim.

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda büyük sabır ve özveri ile laboratuvar çalışmalarımıza yardımcı olan, engin deneyimlerini bizle paylaşan arkadaşlarım Uzm. Bio. Cevriye Yıldırım ve Hazal Ceylan'a özellikle emekleri ve yardımları için çok teşekkür ederim.

Başkent Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğrencileri Buse Öncel ve Yunus Emre Cavlak'a laboratuvar çalışmalarımda yorulmadan bıkmadan verdikleri destek için çok teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı bünyesinde akım sitometri değerlendirmemiz ve analizlerimizde verdikleri üst düzey destekten ötürü Prof. Dr. Güneş Esendağlı ve Hamdullah Yanık'a çok teşekkür ederim.

Bize doktora yapma imkanı sunan, vizyonu, tecrübesi ve hep hoşgörüsü ile yolumuza ışık tutan dönemimizin rektörü değerli hocamız Prof. Dr. Ali Haberal, iyi ki varsınız.

Ayrıca, daha önce Hacettepe Üniversitesinde birlikte çalışma mutluluğunu yaşadığım Başkent Üniversitesi kurucusu değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, eğitime verdikleri özen, çaba ve destek için teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayallerimi gerekleşirirken her zaman benimle birlikte olan, en büyük desteğim, kalbim ve beynim, eşim Dr Neslihan Başıl Tütüncü'ye, canımın parçası olan güzel kızlarım Damla ve Duru Tütüncü'ye, babam Ruşen Tütüncü'ye hep yanımda oldukları ve beni her zaman destekledikleri için çok teşekkür ederim. Sizler benim yaşam kaynağımsınız...



ÖZET

Tanju Tütüncü

“Meme kanseri hücrelerinde kanonik ve kanonik olmayan Wnt yolaklarının baskılanması ile kanser kök hücre popülasyonunun ve dediferansiasyonun azaltılması” Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Doktora Tezi, 2023

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Erken tanı konulan vakalarda tedavi başarısı yüksek olmasının rağmen lokal ilerlemiş veya metastatik vakalarda tedavi başarısı düşmektedir. İlk aşamada başarılı görünen tedaviye rağmen, meme kanserleri aylar veya yıllar sonra bile lokal nüks veya uzak metastazlar ile karşımıza çıkabilmektedir. Bu süreçte tümör hücrelerinin diferansiasyonunun azalması, yeni mutasyonların birikimi, dirençli kanser kök hücrelerinin (KKH) oluşumu, KKH'nin uyku moduna geçip tedaviden saklanması gibi mekanizmalar literatürde tartışılmaktadır. Meme kanserlerinde tedavi etkinliğini artırmak için KKH oluşumunu etkileyen hücre içi (Wnt, Notch, Hedgehog vb) yolak inhibitörleri, KKH yüzey işaretçilerini hedefleyen immünoterapi yöntemleri, KKH çoğalmasını uyarıcı VEGF/VEGFR2, CXCR4 gibi sinyal aks inhibitörleri veya monoklonal antikolar, apoptozis veya diferansiasyonu uyarıcı KKH bölünmesini engelleyen histon deasetilaz (HDAC) enzimlerini hedef alan tedaviler deneme aşamasındadır.

ER⁺ ve üçlü negatif meme kanser hücre hatları ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak üçlü negatif meme kanser hücrelerinin daha saldırgan yapısını, daha yüksek orandaki KKH varlığını ve bunlara ait moleküler belirteçler gösterilmiştir. Wnt klasik yolak ile kombine olarak diğer yolakların baskılanmasını gerçekleştirerek üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'de özellikle 24. saat bulgularında KKH popülasyonunun azaltılması yönünde net bulgular elde edilmiştir.

Çalışmamızda literatürde ilk defa olarak klasik Wnt yolağı ile birlikte thapsigargin kullanarak meme kanser hücre hatlarında Wnt-kalsiyum yolağı kombine blokajı gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamız daha önce tek bir çalışmada önerilen Wnt klasik yolak ve Wnt-kalsiyum yolağı sinerjisinin varlığını kanser hücreleri üzerinde test ederek doğrulamıştır.

Niklosamid ile LRP5/6 reseptörü üzerinden gerçekleştirilen Wnt klasik yolak baskılanmasının çok etkili olduğu ve bunun Wnt-kalsiyum ya da diğer kombinasyonlar ile

kullanılmasının üçlü negatif meme kanserlerinde KKH leri azaltmada etkin olduğu ortaya konulmuştur.

Çalışmamızın sonuçları, özellikle dünyada meme kanserleri içinde %12-15'i bulan üçlü negatif meme kanserlerinde hedeflenmiş tedavi gerekliliğini desteklemektedir. Çalışmamızın sonuçlarının önemli bir mortalite sebebi olan meme kanserli hastalar için KKH aktivitesini belirleyen mekanizmaların aydınlatılması ve yeni hedeflenmiş tedavi seçenekleri geliştirilmesi için yol göstereceğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Wnt, kanser kök hücresi, beta-catenin, niklosamid, XAV939, thapsigargin

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmıştır (Proje No. DA20/24) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Tanju Tütüncü

“Decreasing cancer stem cell population and dedifferentiation in breast cancer cells by selective inhibition of canonical and non- canonical pathways of Wnt signaling.”

Başkent University Institute of Health Sciences, Medical Biology Doctorate, 2023

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women. Although success rate of treatments is high in early diagnosed cases, treatment success rate decreases in locally advanced and metastatic cases. Surgery, radiotherapy, chemotherapy or different combinations of those are being used for the treatment of breast cancer. Despite the treatment modalities that seem to be successful in the beginning, breast cancer may come out with local recurrence or distant metastasis months or years after the treatment. For this late recurrence process, many mechanisms including dedifferentiation of tumor cells, accumulation of new mutations, development of resistant cancer stem cells (CSC), CSCs getting into dormancy and escaping from therapeutic modalities are all being discussed in the literature. In order to increase treatment effectiveness for breast cancer, different treatment modalities including inhibitors for pathways related to CSC formation (Wnt, Notch, Hedgehog etc), immunotherapy methods for CSC surface markers, inhibitors or monoclonal antibodies for signal pathways which stimulate CSC proliferation such as VEGF/VEGFR2, CXCR4; therapies targeting histone deacetylase enzyme (HDAC) to prevent CSC proliferation or stimulate apoptosis and differentiation, are all under clinical investigation. Today, several therapeutic molecules especially acting on Notch1, Hedgehog and Wnt signalling pathways, are shown to be effective in clearing CSCs in some preclinical studies.

In our study with ER⁺ and triple-negative breast cancer cell lines, the more aggressive structure of triple-negative breast cancer cells, the presence of higher rates of CSC and their molecular markers were shown in accordance with the literature. Clear findings were obtained in favor of reducing the CSC populations, especially in the 24th hour findings in the MDA-MB-231 cell line by suppression of canonical and other non-canonical Wnt pathways in combination.

In our study, for the first time in the literature, combined blockade of the Wnt-calcium pathway combination with the canonical Wnt pathway was performed in breast cancer cell lines using thapsigargin. Our study confirmed the existence of the synergy of

the Wnt classical pathway and the Wnt-calcium pathway, which was previously proposed in a single study, by testing it on cancer cells.

Wnt classical pathway suppression via the LRP5/6 receptor with niclosamide has been shown to be very effective and its use with Wnt-calcium or other combinations has been shown to be effective in reducing CSCs in triple-negative breast cancers.

The results of our study supports the need for targeted treatment, especially in triple-negative breast cancers, which account for 12-15% of breast cancers in the world. We believe that the results of our study will lead to the elucidation of the mechanisms that determine CSC activity in patients with breast cancer, which is an important cause of mortality, and to develop new targeted treatment options.

Keywords: Wnt, cancer stem cell, beta-catenin, niclosamide, XAV939, thapsigargine

This study was approved by Başkent University Medicine and Health Sciences Research Board (Project No. DA20/24) and supported by Başkent University Research Fund.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLOLAR LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
GRAFİKLER LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Kanseri ve Meme Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	2
2.2. Kanser Kök Hücresi.....	7
2.2.1.Kanser kök hücresi kavramı ve tarihçesi.....	7
2.2.2. CD44	9
2.2.3. CD133	9
2.3. Wnt/Beta-Katenin Yolağı	9
2.4. Wnt Yolak İnhibitörleri	16
2.4.1. XAV939	17
2.4.2. Niklosamid	17
2.5. Çalışmanın Amacı	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1 Çalışmada Kullanılan Cihaz, Kimyasal Madde ve Solüsyonlar	19
3.1.1. Kullanılan cihazlar	19
3.1.2. Hücre kültürü için kullanılan besiyerleri ve kimyasallar	19
3.1.3. Kullanılan kimyasalları tampon ve çözeltiler	19
3.1.4 Hücre hatları	20
3.2 Araştırma Planı ve Yöntemler	20
3.2.1. Hücre kültürü	21
3.2.2. MTT yöntemi ile IC50 konsantrasyonlarının belirlenmesi	21
3.2.3. Hücre kültüründen protein miktar analizi	22

3.2.5. KKH popülasyonunun belirlenmesi.....	26
3.3 İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	
4.1. MTT Yöntemi ile belirlenmiş olan XAV939, Thapsigargin ve Niclosamide IC50 değerleri	27
4.2. Western Blot Analiz Bulguları	27
4.3. Akım Sitometri Bulguları	38
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	54

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Farklı kanser tiplerinde tanımlanmış KKH belirleyicileri	8
Tablo 2. İnsanlar ve diğer türlerde tanımlanmış Wnt proteinleri.....	11
Tablo 3. MCF7 ve MDA-MB231 hücre hatlarında XAV939, Niclosamide ve Thapsigargin ile 48 saat için MTT yöntemiyle elde edilen IC ₅₀ değerleri.	27
Tablo 4. MCF hücre hattında 12 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi.	28
Tablo 5. MCF hücre hattında 24 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi.	29
Tablo 6. MDA-MB-231 hücre hattında 12 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi.	33
Tablo 7. MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi	35
Tablo 8. Akım sitometri okumaları sonrası toplam hücre popülasyonu içinde CD133 ve CD44 işaretli kök hücre popülasyonları için 12 ve 24 saat uygulama sonucunda elde edilen yüzde cinsinden değerler ve istatistiksel analizi (Her grup için ortalama değer ve altında $\pm$ ile standart sapma değeri verilmiştir)	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. Meme kanserlerinde KKH'ne yönelik tedavi geliştirme seçenekleri.	2
Şekil 2. Meme kanseri özgün KKH belirleyicileri	5
Şekil 3. Wnt genlerinin kromozomal yerleşimi ve homologları.	10
Şekil 4. Wnt yapısı (A. 3 boyutlu B. Sekonder yapı)	10
Şekil 5. Klasik Wnt yolağı ve Wnt-kalsiyum yolağı mekanizması ve olası sinyal akış şemaları	12
Şekil 6. Wnt klasik yolak uyarısı ve kanonik olmayan Wnt-kalsiyum yolağı, LRP5/6 koreseptör ilişkisi	12
Şekil 7. Wnt uyarısı sonrası olası LRP5/6 ve Frizzled reseptör etkileşimleri	13
Şekil 8. LRP5 ve LRP6 reseptör yapısı	14
Şekil 9. Klasik ve klasik olmayan Wnt yolakları ve olası terapötik yaklaşımlar	16
Şekil 10. MCF7 hücre hattında 12 saatlik uygulama sonrasında jel elektroforez görüntüleri (X=XAV939, T=Thapsigargin, N=Niklosamid)	28
Şekil 11. MCF7 hücre hattında 24 saatlik uygulama sonrasında jel elektroforez görüntüleri (X=XAV939, T=Thapsigargin, N=Niklosamid)	29
Şekil 12. MDA-MB-231 hücre hattında 12 saatlik uygulama sonrasında jel elektroforez görüntüleri (X=XAV939, T=Thapsigargin, N=Niklosamid)	32

GRAFİKLER LİSTESİ

	Sayfa
Grafik 1. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen fosfo beta-katenin değişim oranları	30
Grafik 2. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen axin1 değişim oranları	31
Grafik 3. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen axin2 değişim oranları	32
Grafik 4. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen fosfo beta-katenin değişim oranları	33
Grafik 5. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 uygulama sonucunda western blot yöntemiyle belirlenen axin1 değişim oranları	36
Grafik 6. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen axin2 değişim oranları	37
Grafik 7. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda western blot yöntemiyle belirlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 toplu değişim grafiği. (Her grup için soldaki ilk 3 sütun 12. Saat, sağdaki 3 sütun 24. Saat değerlerini göstermektedir)	37
Grafik 8. MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında uygulama gruplarında 12 ve 24 saat uygulama sonrasında elde edilen “CD133 ⁺ ” yüzey pozitiflik oranları	39
Grafik 9. MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında uygulama gruplarında 12 ve 24 saat uygulama sonrasında elde edilen “CD44 ⁺ ” yüzey pozitiflik oranları	40
Grafik 10. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonrasında tespit edilen CD133 ⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri	40
Grafik 11. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saatt uygulama sonrasında tespit edilen CD133 ⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri	41
Grafik 12. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda tespit edilen CD44 ⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri	42
Grafik 13. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda tespit edilen CD44 ⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri	43

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

°C	Santigrad derece
APS	Amonyumpersülfat
EMT	Epitelyal mezenkimal dönüşüm
Fzd	Frizzled
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2, reseptör tirozin-protein kinaz erbB-2
IC ₅₀	Hücre proliferasyonunun %50 baskılandığı konsantrasyon
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KKH	Kanser kök hücresi
LGR5	Lösin-zengin tekrar içeren G-protein eşleştirilmiş reseptör 5, GPR67
LRP5/6	Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein 5/6
PORCN	Porcupine protein ailesi
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
NF-κB	Nuclear Faktör Kappa B
p53	Tümör protein 53
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
SDS	Sodyumdodesilsülfat
WB	Western Blot

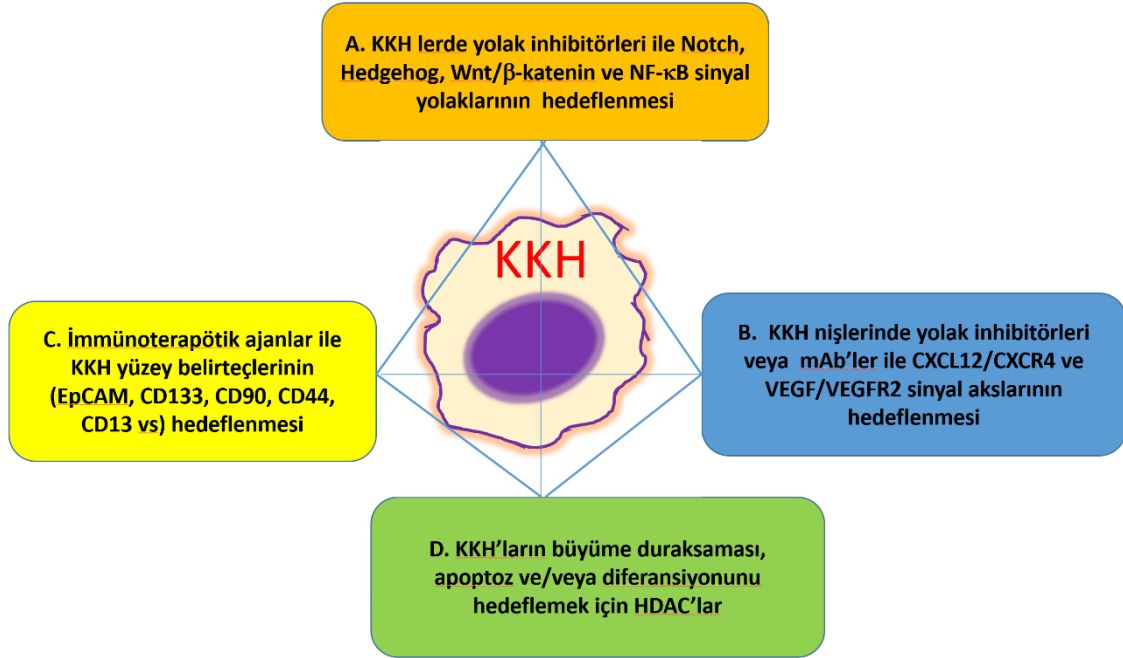
1. GİRİŞ

Meme kanseri günümüzde kadınlarda en sık görülen kanser tipidir. Son yıllarda tarama ve doku tanı yöntemlerinin yaygınlaşması ile tanı konulan vaka sayısı artmakla birlikte erken tanı başarısının artması ile 5 yıllık sağkalım oranları %87'ye kadar yükselmiştir (1, 2). Meme kanserleri, hormon reseptörü pozitif olan iyi diferansiye tiplerden üçlü negatif olan östrojen, progesteron reseptörü ve HER2 negatif (triple negative breast cancer) olan az diferansiye tiplere kadar çok farklı histopatolojik tiplerle karşımıza çıkabilmektedir. Erken tanı konulan vakalarda tedavi başarısı yüksek olmasının rağmen lokal ilerlemiş veya metastatik vakalarda tedavi başarısı düşmektedir. Tedavide cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve bunların farklı kombinasyonları kullanılmaktadır. Ancak ilk aşamada başarılı görünen tedaviye rağmen, meme kanserleri aylar veya yıllar sonra bile lokal nüks veya uzak metastazlar ile karşımıza çıkabilmektedirler. Bu süreçte tümör hücrelerinin diferansiasyonunun azalması, yeni mutasyonların birikimi, dirençli kanser kök hücrelerinin (KKH) oluşumu, KKH nin uyku moduna geçip tedaviden saklanması gibi mekanizmalar literatürde tartışılmaktadır (3). Meme kanserlerinde tedavi etkinliğini artırmak için,

- a. KKH oluşumunu etkileyen hücre içi yolaklar (Wnt, Notch, Hedgehog vb) için inhibitörler,
- b. KKH yüzey işaretçilerini hedefleyen immünoterapi yöntemleri
- c. KKH çoğalmasını uyaran VEGF/VEGFR2, CXCR4 gibi sinyal aksları için inhibitör veya monoklonal antikorlar
- d. KKH'de çoğalmayı durdurmak, apoptozisi uyarmak veya diferansiasyonu uyarmak için histon deasetilaz (HDAC) enzimlerini hedef alan tedaviler deneme aşamasındadır (Şekil 1) (3).

Kadınlarda çok yaygın görülen meme kanserinde özellikle saldırgan histopatolojik özelliklere sahip, lokal olarak ilerlemiş ve metastatik hastalık için halen etkin tedavi arayışları sürmektedir. Buna yönelik olarak, çalışmamızda özellikle kanser kök hücresi (KKH) gelişimi sürecinde Wnt/beta-katenin yolağının rolü, etkileşimleri ve olası terapötik yaklaşım için sonuçlar elde edilmeye çalışılacaktır. Wnt yolağının klasik beta-katenin sinyal akış yolağı ve klasik olmayan Wnt-kalsiyum yolaklarının kombine şekilde baskılanmasının meme kanser hücre hatlarında KKH oluşumunu daha etkin baskılayacağını öngörmekteyiz. Elde edilecek sonuçlar ışığında meme kanserli hastalar

için olası klinik çalışmalar ve bahsi geçen yollar için ilaç geliştirme araştırmaları söz konusu olabilecektir.



Şekil 1. Meme kanserlerinde KKH'ne yönelik tedavi geliştirme seçenekleri.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Kanseri ve Meme Kanseri Hücrelerinin Özellikleri

Meme kanseri kavramı yazılı tıp tarihi ile paralel bir bilinirliğe sahiptir ve varlığı MÖ 3000-2500 yıllarına ait olan Edwin Smith papirüsünde klinik bulguları ile tanımlanmıştır. Hatta bu papirüs kaydında, tedavisinin mümkün olmadığı vurgulanarak belirtilmiştir (4). Arada geçen binlerce yıldan sonra tıptaki gelişmelerle birlikte tanı ve tedavisinde çok gelişme kaydedilmiş ve risk faktörleri tanımlanmış olmasına rağmen, tedavisinde halen tam anlamıyla başarı elde edilmiş değildir. Meme kanseri günümüzde kadınlarda hem dünyada, hem de ülkemizde en sık görülen kanser tipidir.

Meme kanseri, öncelikle kadınlarda memedeki süt bezleri ve süt kanallarından kaynaklanan kanserleri vurgulamakla birlikte nadir görülen erkek meme kanserleri, memenin deri ve mezenkimal kökenli dokularından kaynaklanan sarkomları da dahil edildiğinde oldukça geniş bir başlıktır. Kanserinin kaynaklandığı hücre tipine göre moleküler göstergeler ve tedavi yaklaşımları değişebilmektedir. Bu nedenle, meme kanseri için tedavi

planlaması öncesinde hücre tipinin, biyolojik ve moleküler özelliklerinin iyi tanımlanmış olması gerekir. Primer meme kaynaklı kanserlerin sınıflaması ve dağılımı aşağıda verilmiştir (5):

Noninvazif epitelyal kanserler (%10)

Lobüler karsinoma in situ

Duktal karsinoma in situ

İnvazif epitelyal kanserler

İnvazif lobüler karsinom (%10)

İnvazif duktal karsinom

İnvazif duktal karsinom, aksi belirtilmedikçe (%50-70)

Tübüler karsinom (%2-3)

Müsinöz veya kolloid karsinom (%2-3)

Medüller karsinom (%5)

İnvazif kribriform karsinom (%1-3)

İnvazif papiller karsinom (%1-2)

Adenoid kistik karsinom (%1)

Metaplastik karsinom (%1)

Bağ dokusu ve epitel karışık tümörler

Filloides tümörler

Karsinosarkom

Anjiyosarkom

Meme kanserlerinde histolojik tip dışında kanserin gelişmesi ve sonuçlarını etkilediği gösterilmiş olan çeşitli hücre yolakları ve moleküler göstergeler de tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları steroid hormon reseptör yolakları (östrojen ve progesteron reseptörleri), insan epidermal büyüme faktörü yolağı (HER ailesi), anjiyogenez, hücre döngüsü (siklin bağımlı kinazlar CDK), apoptozis modülatörleri, p53, proteozom, peroksizom, insulin benzeri büyüme faktörü ailesi (IGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), TGF- β , PPAR- γ gibi yolaklardır. Bahsi geçen bu moleküllerin düzeylerine tanı aşamasında rutin olarak bakılmamaktadır. Güncel yaklaşımda rutin uygulamada östrojen ve progesterone reseptörleri, HER2 ve Ki67 proteinin varlığı ya da düzeyi değerlendirilmektedir (6).

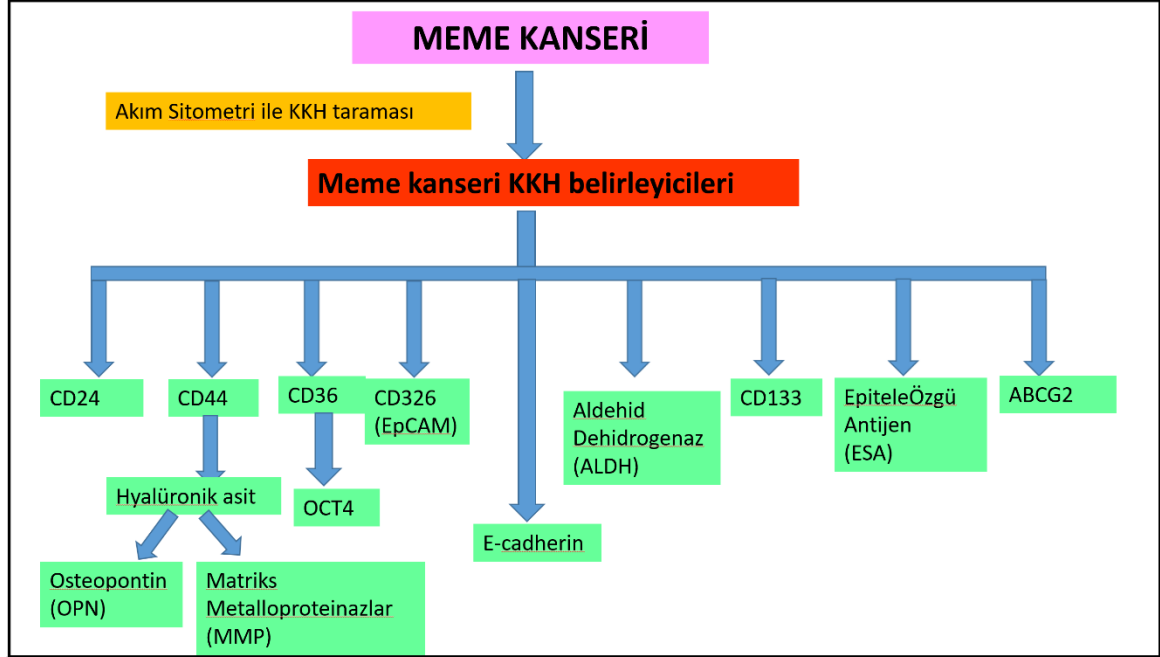
Gelişen teknoloji ile birlikte yapılan RNA analizleri, meme kanserleri arasında daha fazla heterojenlik ortaya koymuştur. RNA ekspresyon imzalarına göre 4 büyük alt grup ayırt edilebilir: lüminal A, lüminal B, Her2 ile zenginleştirilmiş, bazal-like (6). Ayrıca bazal benzeri grubun altında 5. bir grup olarak claudin-düşük alt grubu öneren kaynaklar da vardır (5).

Lüminal A	ER/PR+, HER2 -	%70-75
Lüminal B	ER/PR+, HER2+	
	veya Ki67 yüksek	%10
HER2 zengin	ER/PR-, HER2+	%4-5
Üçlü negatif (Triple -, bazal benzeri)	ER/PR-, HER2-	%12

Bu moleküler alt tipler, meme kanserinin immünohistokimyasal alt tipleri ile de örtüşmektedir. Çoğu lüminal A ve B ER-pozitiftir, Her2 ile zenginleştirilmiş tip olanlar Her2-pozitiftir ve çoğu bazal benzeri kanserler üçlü negatif meme kanseridir. ER-pozitif olanların lüminal A ve lüminal B'de farklılaşmasının tedavi için önemli olduğu kanıtlanmıştır. Lüminal B kanserleri genellikle lüminal A kanserlerinden daha saldırgandır ve sıklıkla proliferasyon belirteci Ki67'nin daha yüksek ifadenmesini gösterir ve /veya ER pozitifliği ile birlikte Her2'yi eksprese eder. Üçlü negatif meme kanserinin ek moleküler alt tipleri, claudin-düşük kanserleri ve lüminal androjen reseptör alt tipini de içeren mezenkimal benzeri alt tiptir (5). Bu alt tipler, farklı klinik sonuçlarla ilişkilidir.

Moleküler tiplere bakıldığında, lüminal A tipinden üçlü negatif tipe doğru gittikçe hücre diferansiasyonunun azaldığı, proliferasyon hızının ve büyümenin hızlandığı, kanser davranışının saldırganlaştığı görülmektedir. Buna bağlı olarak tedavi başarısızlığı artmaktadır. Üçlü negatif meme kanserlerinde hormon reseptörü veya HER2 gibi bir moleküler hedef bulunmaması tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır. Bu tip kanserlerde, kanser kök hücrelerinin veya kök hücre benzeri hücrelerin arttığı ve hem hızlı çoğalmadan hem de tedaviye direnç ve kötü prognozdan sorumlu olduğu öne sürülmektedir (7). Bu nedenle saldırgan meme kanserlerinde kanser kök hücrelerinin özgün şekilde hedeflenmesini öneren çok sayıda bilimsel merkez ve araştırmacı bulunmaktadır (8). Özellikle Al-Hajj tarafından meme kanseri kök hücresi kavramı 2003 yılında netleştirildikten sonra (9, 10) solid tümörlerde KKH yönelik spesifik tedavi araştırmaları artmıştır. Bu çalışmalar beraberinde KKH için daha net tanımlayıcı ve hedeflenebilecek yüzey belirleyicilerinin tanımlanmasını beraberinde getirmiştir. Özellikle meme kanseri

KKH için farklı araştırma grupları tarafından CD44+, CD44+/CD24-, ALDH1+, CD133+, CD36+, ESA, EpCAM gibi yüzey antijenleri ve adezyon molekülleri tanımlanmıştır (11-18) (Şekil 2) .



Şekil 2. Meme kanseri özgün KKH belirleyicileri

Meme kanseri erken tümör hücresi yayılımı ile karakterize sistemik bir hastalıktır. Vücuda yayılan tümör hücreleri sistemik tedavilere karşı yüksek direnç göstermekte ve ölümcül metastaz lezyonlarına yol açabilmektedir. Metastatik hücrelerin uyku moduna geçmesi, makrometastaz oluşumunu geciktirir ve ölümcül bir metastatik hastalığın gelişmesi yıllar alabilir. Mevcut görüş, meme kanseri de dahil olmak üzere çoğu solid kanserin kök hücre hastalıkları olduğu (12, 19, 20) ve bu kök hücrelerin yayılma ve metastaz için kritik olduğu yönündedir (21, 22). Meme kanserinin başlamasında rol oynayan kök benzeri hücreler kavramının temeli, AL-Hajj ve arkadaşları tarafından bildirilen verilerle atılmıştır (9,10). Meme kanseri hücrelerinin sadece küçük bir alt popülasyonunun farelerde tümör oluşturma potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir. Orijinal tümörde olduğu gibi, bu tümör başlatan hücrelerin, tümörü benzer bir heterojenite ile yeniden inşa edebildikleri gösterilmiştir. Bu durum hücrelerin kök hücreleri anımsatan plastisite gösterdiğini düşündürmektedir. "Kanser kök hücresi (KKH)" terimi, kendini yenileme kabiliyetine ve "sürekli büyüyen bir tümörün oluşumunu gerçekleştirme yeteneğine" sahip tümör başlatan hücreleri tanımlamak için doğmuştur. KKH'leri yan

popölasyonlar olarak tanımlamak için fonksiyonel KKH'lerin *in vitro* ve akım sitometri analizinin tanımlanmasına izin veren mamosfer oluşum testleri, KKH'ler üzerinde araştırmaları kolaylaştırmıştır. KKH kavramının altındaki mekanizmalar aydınlatıldıķça hem meme kanseri hem de KKH barındıran bütöl kanserler için tedavi başarısı artacaktır.

Meme kanseri kök hücreleri bařlangıķta CD44 yüzey belirtecinin ifadelenmesi ve CD24 yüzey belirtecinin eksikliği veya düşük ifadelenmesi ile karakterize edilmiştir (11, 12, 23). Meme kanseri örneklerinden izole edilen CD44 pozitif ve CD24-negatif kanser hücreleri, aynı kanser içindeki diğer kanser hücrelerine göre anlamlı derecede daha kötü bir prognoz ile ilişkili farklı gen imzaları göstermektedir. Diğerlerinin yanı sıra, CD44 + / CD24 / düşük alt popölasyonlar, meme bezinin gelişimi ve bakımı için önemli bir faktör olan PROCR'yi (protein C reseptörü) daha yüksek seviyelerde (14) ifade etmektedir. CD44'ün ayrıca metastazı başlatabilen dolaşımdaki tümör hücrelerinin anahtar bir belirteci olduğu bulunmuştur. İlerleyen süreçte meme KKH için CD133 pozitifliği ve aldehid dehidrojenaz (ALDH) pozitifliği gibi özellikler tanımlanmıştır. CD44 ve CD133 pozitif meme KKH popölasyonlarının bir kısmı ALDH pozitif grup ile kesişmektedir ve bunların prognozu daha kötüdür. Ayrıca güncel araştırmalar meme kanseri KKH'lerinde EpCAM pozitifliği, e-cadherin eksikliği, çoklu ilaē taşıyıcı protein ABCG2 varlığı gibi yeni tanımlayıcı özellikleri ortaya çıkartmıştır. Meme KKH'lerinde EpCam pozitifliği tümör oluşumunun başlatılmasında önemlidir. EpCAM pozitifliğinin, meme KKH'lerinde Wnt yolağı aktivitesini destekleyerek KKH aktivitesi ve idamesine katkıda bulunduğu düşünölmektedir (18, 24).

Meme KKH özelliği taşıyan hücrelerin oranları daha diferansiye olan lölinal tiplerde %1-5 gibi düşük oranlarda iken, az diferansiye olan üçöl negatif meme kanserlerinde %80-90 üzerine çıkabilmektedir (16). Bu da tümör yayılımı ve prognoz aēısından kötü etki yaratmaktadır. Daha da kötü olan nokta, birçok çalışmada standart kemoterapi ve radyoterapi sonrası, tümör boyutu ve toplam hücre miktarı azalsa da, kalan hücre popölasyonu içinde KKH oranlarının arttığı gösterilmiştir. Çeşitli kemoterapötik ilaēların hem MCF7, hem de MDA-MB-231 hücre hatlarında uygulama sonrasında ALDH pozitif ve CD44⁺/CD24⁻ KKH oranlarını artırdığı gösterilmiş olup (25-33) radyoterapinin de hem klinik uygulamada hem de *in vitro* olarak MCF7 hücre hattında CD44⁺/CD24⁻ KKH oranlarını artırdığı gösterilmiştir (34, 35). Bu çalışmalar, meme kanserinde KKH varlığının tedaviye direnci nasıl artırdığını gösteren çok yönlü çalışmalardır.

Ayrıca birçok meme kanseri türü, kemoterapi sonrası ilaçlara direnç geliştirmektedir. Bunda çoklu ilaç direnç (MDR) proteinlerinin varlığı önemli olup tedavi sonrasında MDR genlerini daha fazla ifadeleyen KKH varlığı artmaktadır (36). Çoklu ilaç direncinde rol oynayan ATP bağlayan kaset (ABC) proteinlerinin KKH'lerde ifadenmesinde epitelyal mezenkimal dönüşüm transkripsiyon faktörleri ve Wnt, Notch ve Hedgehog yollarının rolü olduğu bilinmektedir (37).

2.2. Kanser Kök Hücresi

2.2.1. Kanser kök hücresi kavramı ve kısa tarihçesi

Virchow, 1870'te tümörlerin embryo hücresi benzeri hücrelerden kaynaklanabileceğini ve kanser hücrelerinin kök hücrelere benzer özelliklerinin bulunduğunu ilk olarak raporlamıştır (38). Furth ve Kahn 1937'de tek bir adet fare lösemi hücresinin başka alıcı bir farede tümör gelişimine yol açabildiğini göstermişlerdir (38). Southam ve Brunschwig 1961'de ileri kanser hastalarından aldıkları kanser hücreleri ile fare ve insanda bu hücrelerin tekrar kanser oluşturabilme yeteneğini göstermişlerdir (39, 40). Hamburger ve Salmon 1977'de, bütün kanser hücre popülasyonunun birkaç adet kanser kök hücresinden kaynaklanabileceği varsayımını ortaya atmışlardır (41). Lapidot ve arkadaşları 1994'te bir fare modeli kullanarak insan akut myeloid lösemi hücrelerinden izole edilerek yeni lösemi gelişimine yol açabilen bir lösemi başlatıcı hücre tanımlamışlardır (38).

Bonnet ve Dick KKH varlığını somut olarak ilk kez 1997'de akut myeloid lösemi hücrelerinde gösterdiler. Bu çalışma KKH varlığını somut şekilde gösteren çok önemli bir çalışma idi ve KKH teorisi ile ilgili olarak tümör hücrelerinin hiyerarşik yapısını da modelleyen ilk çalışma idi (38, 42).

Lösemi araştırmaları sonrasında, solid tümörlerdeki ilk KKH varlığını 2003'te Al-Hajj ve arkadaşları göstermişlerdir. Sonrasındaki bir dizi çalışma ile beyin, kolon ve prostat gibi organların solid tümörlerinde de KKH varlığı somut olarak gösterilmiştir (9, 10).

O'Brien ve arkadaşları ilk kez 2007'de kolon kanseri kök hücrelerini ve bunların yüzeyindeki CD133 varlığını göstermiş ve CD133'ü KKH yüzey belirleyicisi olarak

tescillemişlerdir (43). Sonrasında KKH yüzey belirleyicileri için çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir.

Yukarıda geçen çalışmalar ışığında güncel KKH teorisi, kanser hücrelerinin hiyerarşik şekilde organize olduğunu ve az sayıda KKH tarafından çoğalmanın yönetildiğini, tümör hücrelerinin çoğunun kısıtlı bölünme potansiyeli olan, başka bireyde yeni tümör geliştirme potansiyeli olmayan, farklı diferansiye düzeyde hücrelerden oluştuğunu vurgulamaktadır. Ancak kanser gelişimi ile ilgili olarak bu teoriyi tartışan kök hücre hatalı yerleşim teorisi (The stem cell misplacement theory) de mevcuttur ve buna göre epitelyal kök hücreler yanlış doku stromasına yerleştiklerinde malign dönüşüme uğrayarak KKH haline dönüşmektedirler (44). Hangi teori olursa olsun, günümüzde KKH varlığı biyolojik olarak somut şekilde gösterilmiştir.

Birçok kanser türü için ortak sayılabilecek yüzey belirleyicileri tanımlanmıştır (Tablo 1):

Tümör Tipi	KKH BELİRLEYİCİ						
	CD133	CD44	CD24	ALDH	CD90	CD34	Diğer
Beyin	+/-				+		integrin- alfa6
Meme	+	+	-	+	+		EpCAM
Kolorektal	+	+		+			
Endometrium	+						
Mide		+	+				
Baş ve boyun		+		+			
Lösemi						+	CD38-
Karaciğer	+	+		+	+		GEP
Akciğer	+			+	+	+	CD117
Melanoma				+			CD20, ABCB5
Over	+	+					
Pankreas	+	+	+	+			EpCAM
Prostat	+	+					
Böbrek							CD105
Tiroid							CD15

Tablo 1. Farklı kanser tiplerinde tanımlanmış KKH belirleyicileri (11-18, 45)

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, meme kanseri KKH için bazı yüzey belirleyici içeren fenotiplerin klinik süreçte daha belirgin rolleri tanımlanmıştır. Fenotip olarak

ALDH1⁺, CD44⁺/CD24⁻ ve CD133⁺ KKH varlığı daha saldırgan ve tedavilere dirençli tümörler ile karşımıza çıkmaktadır (37).

2.2.2. CD44

Hyalüronik asit reseptörü veya ‘HCAM-homing cell adhesion molecule’ olarak da ifade edilir. Aslında birçok sağlıklı hücre tipinde ifadelenir. Özellikle meme kanser hücrelerinde düşük CD24 varlığı ile birlikte mevcutsa CD44⁺/CD24⁻ fenotip olarak tanımlanmaktadır (16, 17).

Bu fenotip kemoterapi ve radyoterapiye direnç ile karakterizedir ve bunun nedeni olarak düşük konsantrasyonda reaktif oksijen türleri varlığı, hücrenin uyku haline geçmesi, etkin DNA onarım mekanizmaları varlığı, EMT işaretçilerinin yüksek miktarda ifadelenmesi ve Wnt/beta-katenin, Hedgehog, NOTCH, STAT1 ve STAT3 sinyal yollarının aktive edilmesi gibi mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır (16, 17, 37). Bu nedenlerle meme kanserli hastalarda CD44⁺/CD24⁻ fenotip varlığı yeni bir tedavi hedefi olarak değerlendirilmektedir.

2.2.3. CD133

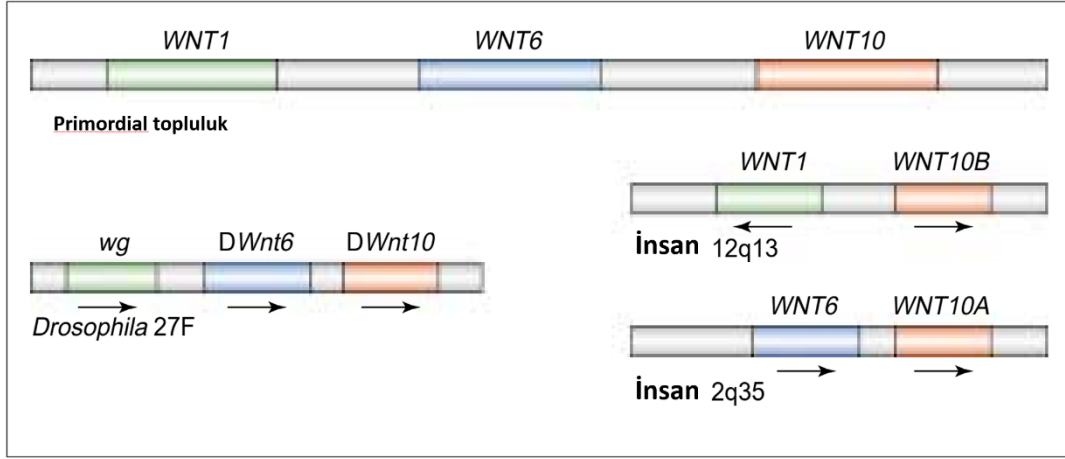
CD133, glikoprotein yapıda olup, 5 adet transmembran segmente sahip bir membrane proteinidir ve membrandan belirgin çıkık olması nedeniyle diğer adı “prominin1” dir. İlk 1999’da tanımlanmış olmasına rağmen 2007’de KKH yüzey belirleyicisi olarak kanıtlandıktan sonra (46) ilgili çalışmalar artmıştır. Meme dışında kolon kanseri ve glioblastoma gibi başka solid tümörlerde de yüksek şekilde ifadelenildiği gösterilmiştir. Kök hücre migrasyonu ve asimetrik bölünmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Meme kanserli hastalarda tümörün saldırgan davranışını öngörmeye başarılı bir belirleyicidir. Özellikle üçlü negatif meme kanserlerinde, hem *in vitro* hem *in vivo* olarak KKH tanımlamada uygun ve başarılı olduğu gösterilmiştir (47). Çok saldırgan davranışlı bir tür olan enflamatuvar meme kanserli hastalarda 25 hastanın 22 tanesinde ifadelenmesi yüksek olarak bulunmuştur (47). Bu özellikleri ve meme kanserinde prognoz belirlemedeki potansiyel rolü nedeniyle çok sayıda çalışmanın konusu olmaktadır.

2.3. Wnt/Beta-Katenin Yolağı

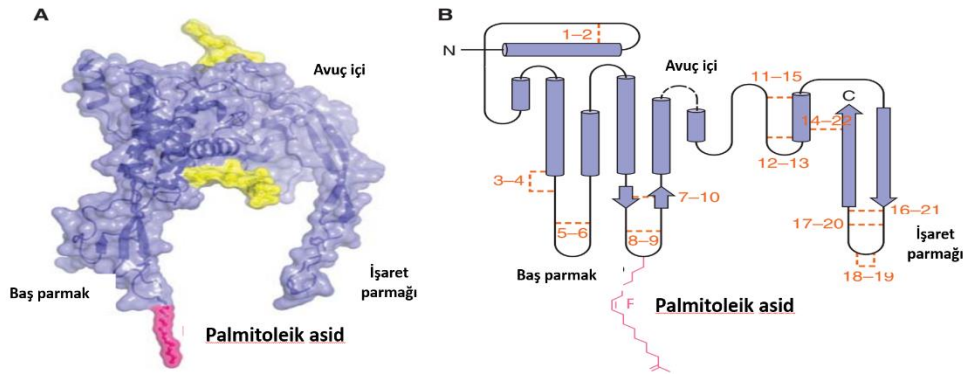
Wingless mutant fenotip: İlk tanım R. P. Sharma tarafından yapılmıştır, Hindistan'da etil metansülfonat mutagenезine bağılı olarak kanatsız sineklerin varlığını raporlamıştır (48). Wingless sinyal yolağı ve kanser ilişkisi, Varmus laboratuvarlarında hücresel onkogenleri araştırırken keşfedilmiştir. 1982'de Nusse ve Varmus Int1 genini tanımlamışlardır. Daha sonra wingless ve Int1 genlerinin aynı olduğu farkedilmiş ve iki isim birleştirilerek Wnt adını almıştır.

$$\text{Wnt} = \text{Wg} + \text{int-1 (Wingless integration site 1)} \quad (49)$$

Daha sonra insan dahil birçok canlıda da Wnt homologları gösterildi (50, 51, 52).



Şekil 3. Wnt genlerinin kromozomal yerleşimi ve homologları.



Şekil 4. Wnt yapısı (A. 3 boyutlu B. Sekonder yapı)

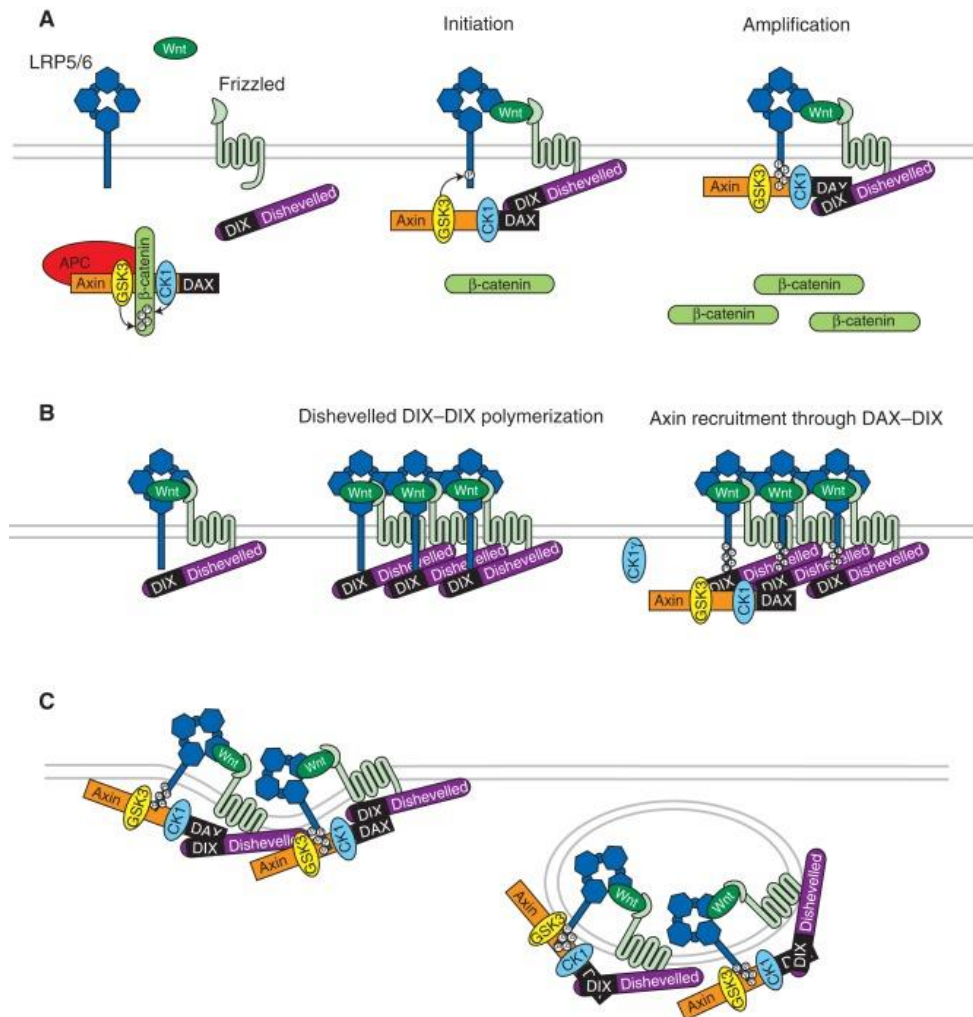
Wnt/beta-katenin yolağının, embriyolojik gelişimde, asimetric hücre bölünmesinde, kanser hücre diferansiasyonu ve epitelyal mezenkimal dönüşümde rolü olduğu bilinmektedir. İnsanlarda 19 farklı Wnt proteini ve bunların reseptörü olarak ise 10 farklı Frizzled transmembran proteini tanımlanmıştır (Tablo 5) (53).

Tür	Wnt proteinleri
Homo sapiens	WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16
Mus musculus (insan ile aynı proteinler)	Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt16
Xenopus	Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt11R
Danio rerio	Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt10A, Wnt10B, Wnt11, Wnt16
Drosophila	Wg, DWnt2, DWnt3/5, DWnt6, WntD/DWnt8, DWnt10
Hydra	Hywnt1, hywnt5a, hywnt8, hywnt7, hywnt9/10a, hywnt9/10b, hywnt9/10c, hywnt11, hywnt16
C. elegans	mom-2, lin-44, egl-20, cwn-1, cwn-2

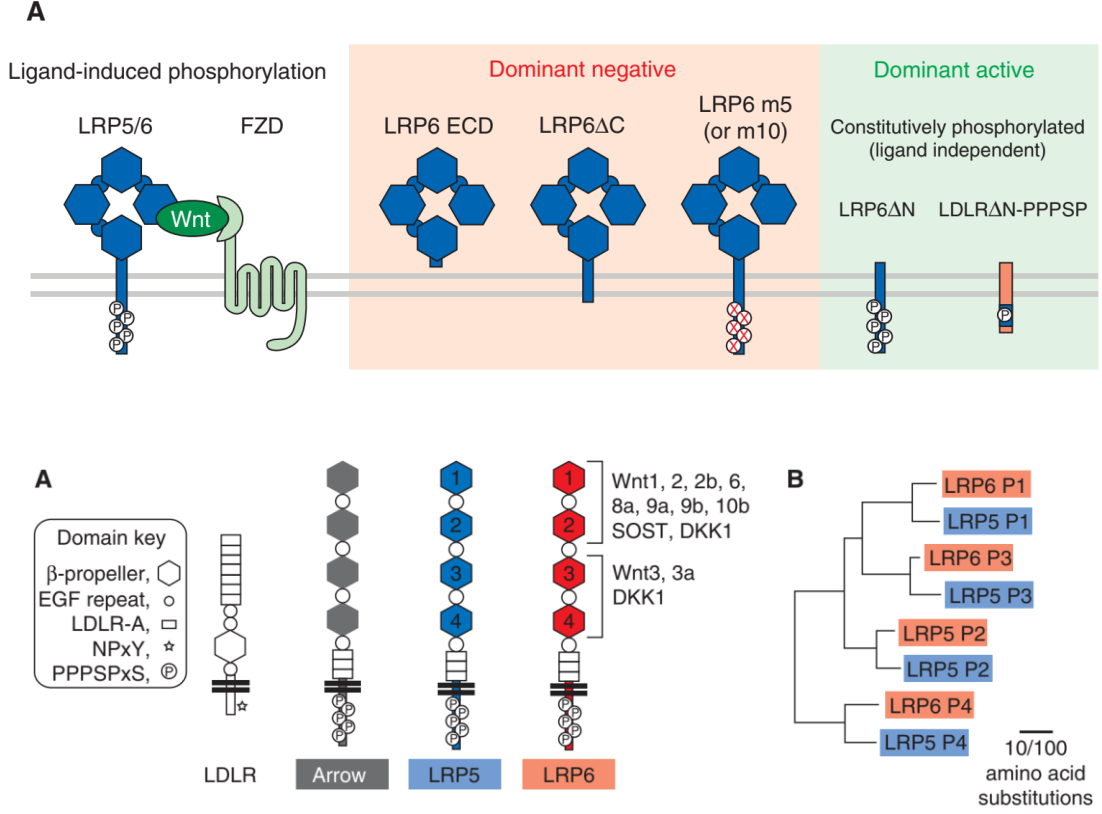
Tablo 2. İnsanlar ve diğer türlerde tanımlanmış Wnt proteinleri

Wnt uyarısının beta catenin üzerinden giden yolağı klasik veya kanonik olarak tanımlanmıştır. Beta catenin üzerinden etki etmeyen ve farklı mekanizmalarla ilerleyen Wnt uyarıları ise kanonik olmayan veya klasik olmayan yollar olarak literatürde tanımlanmaktadır. Farklı kaynaklarda bu kanonik olmayan yollar Wnt-kalsiyum yolağı, hücre polarite yolağı, Wnt-Reseptör tirozin kinaz yolağı, Wnt-PKA ve Wnt-mTOR yolları olarak tanımlanmaktadır (Şekil 6). Ayrıca bu uyarı ve yolların Notch, Hedgehog, FGF ve TGF beta-BMP yolları ile karşılıklı iletişim içinde bulunduğu da belirtilmektedir (53, 54).

LRP5/6 reseptörlerine aynı anda farklı wnt proteinlerinin bağlanabilmesi uyarıcı veya inhibitör etkiyi modifiye edebilmektedir (Şekil 7). Bu nedenle LRP5/6 reseptörlerinin de kanserlere yönelik tedavilerde rolü olabileceği kabul edilmektedir (57). Ayrıca yapısı gereği LRP5/6 reseptörlerine aynı anda birkaç farklı Wnt proteini bağlanabilmekte ve buna bağlı olarak farklı cevapların ortaya çıkma şansı oluşmaktadır (57) (Şekil 8 ve 9).



Şekil 7. Wnt uyarısı sonrası olası LRP5/6 ve Frizzled reseptör etkileşimleri (57)



Şekil 8. LRP5 ve LRP6 reseptör yapısı (57)

Kanonik olmayan yol daha çok Wnt5a ve Wnt11 tarafından uyarılmaktadır (57). Embriyonel gelişim dışında, kanonikal yolun daha çok kök hücre yenilenmesinde, kanonik olmayan yolların ise yönlendirilmiş hücre hareketi, hücre iskeleti ve kök hücrelerin idamesinde rolü olduğu belirtilmektedir (53). Ayrıca Wnt5a üzerinden kanonikal yolun dengelenmesinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler Wnt uyarısının çok karmaşık ve henüz net olarak tanımlanmamış mekanizmalar üzerinden kanser gelişimi ve kanser kök hücre oluşumu üzerine etkileri olabileceğini göstermektedir. Günümüzde meme kanser tedavisinde bu yollara yönelik spesifik tedavilerde anlamlı bir başarı elde edilmiş değildir. Başarı sağlamak için aynı anda farklı yolların 2 veya 3 farklı molekül ile senkron inhibisyonu veya dengesine yönelik tedavi seçenekleri veya epigenetik mekanizmalar ile kombine tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

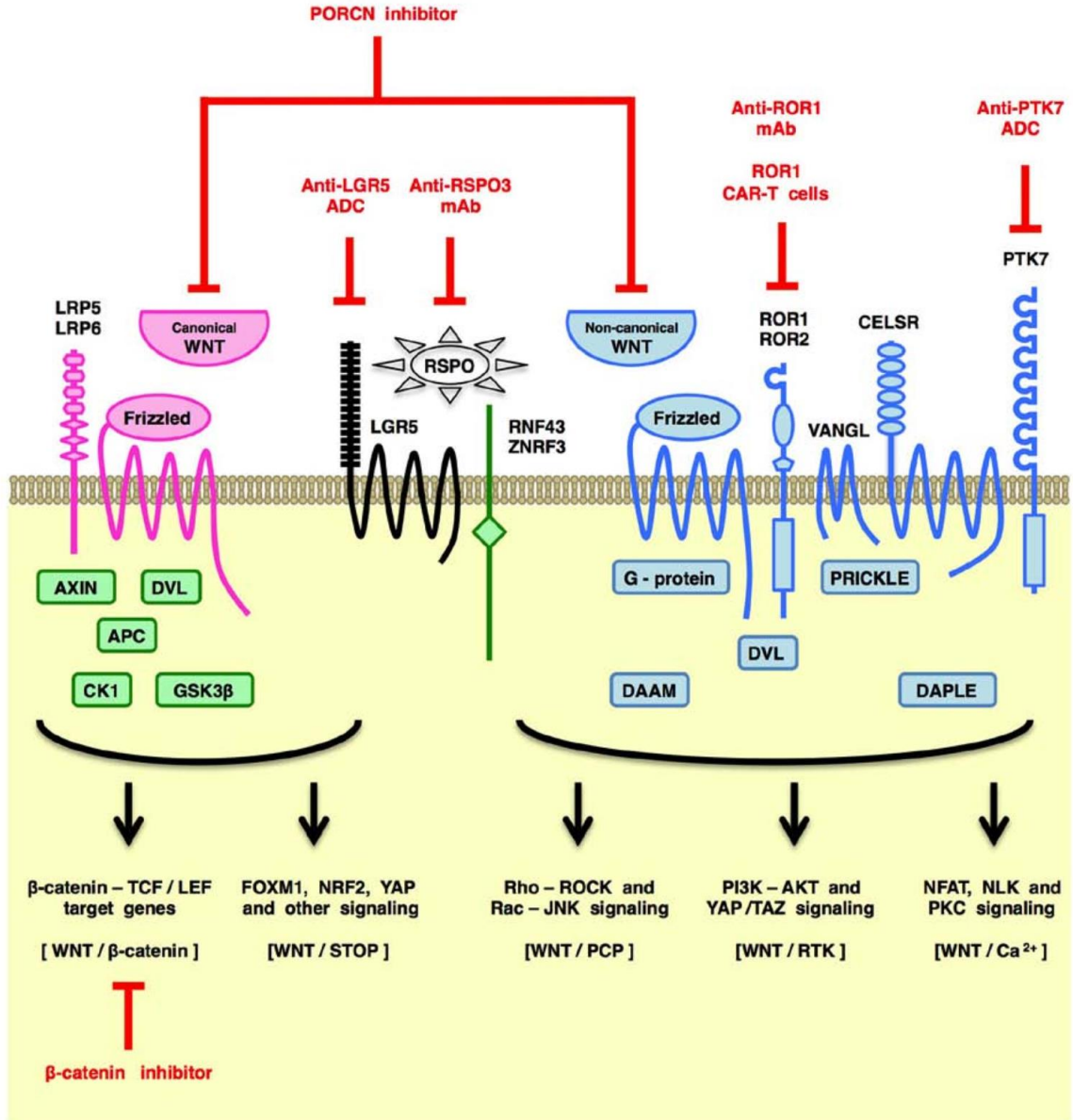
Günümüzde özellikle Notch1, Hedgehog ve Wnt gibi kilit yollarda preklini çalışmalarda bazı terapötik moleküllerin KKH ortadan kaldırmada etkin olduğu gösterilmiştir (3, 53). Wnt/beta-katenin yolağının kanser hücre diferansiasyonu ve epitelyal mezenkimal dönüşümde rolü olduğu bilinmektedir (37, 54). Selektif Wnt/beta-katenin

yolağı inhibisyonunu yapan prodigiosin adlı maddenin meme kanser hücrelerinde çoğalmayı önleyici anlamlı kanser karşıtı etkileri olduğu gösterilmiştir (58). Ancak kanser başlatıcı hücreler ve KKH gelişiminde kanonik ve kanonik olmayan Wnt yolak etkileşimlerinin nasıl etki ettiğini değerlendiren çalışma sayısı çok azdır.

Klasik Wnt yolağının meme kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri gibi bazı kanserlerde rolü gösterilmiştir. Bu kanserlerde kanonik olmayan Wnt uyarılarının kanser invazyon ve KKH gelişiminde koruyucu olabileceğini belirten yayınlar bulunmaktadır ve özellikle Wnt5a proteinin olası koruyucu rolü vurgulanmaktadır (59, 60). Ancak farklı çalışmalarda meme kanser hücrelerinde Wnt5a proteininin ve gen ekspresyonunun hem artmış, hem de azalmış bulunduğu durumlar söz konusudur (59).

Bazı çalışmalarda Wnt yolağının klasik olan beta katenin ayağında kalsiyumun da klasik yolak ile etkileştiği ve beta katenin in hücre içine geçişte rolü olduğu ifade edilmektedir (61).

Kanonik olmayan Wnt proteinlerinin, klasik Wnt-beta katenin yolağının düzenlenmesinde LRP5/6 ve Frizzled reseptörlerinin yapısı nedeniyle farklı kombinasyonlarda bağlanarak farklı etkilere yol açması muhtemeldir (57). Bazı çalışmalar ise kanonik ve kanonik olmayan Wnt yolaklarının beta kateninin hücre içine girmesi ve ilgili genlerin transkripsiyonu için ortak çalıştığını belirtmektedir (61). Bu nedenle Wnt inhibitörleri başta meme kanseri olmak üzere diğer kanserlerde preklinik çalışmalarda denenmektedir (4) (Şekil 10). Ancak bu izole denemelerde klinik uygulamaya yansiyacak net bir başarı elde edilememiştir. Bunun muhtemel nedenlerinden bir tanesi de Wnt-beta katenin yolağının başka birçok yolakla etkileşmesi ve bu uyarıların kanser hücreleri dışında sağlıklı hücrelerde de gerekli olmasıdır. Bu nedenle tedavi etkinliğini artırmak için PORCN inhibitörleri gibi kombine blokaj yaptığı düşünülen moleküller araştırılmaktadır (Şekil 10).



Şekil 9. Klasik ve klasik olmayan Wnt yolakları ve olası terapötik yaklaşımlar (53)

2.4. Wnt Yolak inhibitörleri

Wnt yolağı klasik ve klasik olmayan alt sinyal akış mekanizmaları ile oldukça karmaşıktır. Bu yolak üzerinde yer alan farklı moleküller üzerinden etki eden farklı inhibitörler araştırma aşmasındadır ve sürekli yeni inhibitörler tanımlanmaktadır (53).

Beta-katenin yıkım kompleksine yönelik tankiraz inhibitörleri, özgün beta-katenin inhibitörleri, aynı anda klasik ve klasik olmayan yolakları baskıladığı düşünülen PORCN inhibitörleri, özgün LRP5/6 inhibitörleri veya reseptörlere karşı monoklonal antikorlar bunlardan bazılarıdır.

2.4.1. XAV939

XAV939, tankiraz1 ve tankiraz2 yi özgün olarak inhibe eden bir küçük molekül inhibitördür. Kimyasal adı 4H-Thiopyrano[4,3-d]pyrimidin-4-one, 3,5,7,8-tetrahydro-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]'dir. Tankiraz aktivitesini bloke ederek axin-GSK3 β kompleksi proteinlerini artırır ve beta-katenin yıkımını artırarak Wnt klasik yolak etkilerini baskılar (62).

2.4.2. Niklosamid

İlk defa 1958 yılında sentezlenmiş olan Niklosamid antihelmintik bir ilaçtır. Bu özelliği ile halen Dünya Sağlık Örgütü Temel İlaçlar listesi içinde yer almaktadır. Tenyalarda oksidatif fosforilasyonu bloke ederek etki etmektedir. Kolorektal ve meme kanser hücre hatlarında LRP5/6 reseptörü etkisini bloke ederek kanser hücre popülasyonlarını azalttığı ve fare deneylerinde kolon kanseri üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. LRP5/6 reseptörü blokajı dışında farklı mekanizmalar ile de etkili olabileceği düşünülmektedir (63).

Meme kanseri hücre popülasyonlarında KKH gelişimi, ilaç direnci ve invazyon özelliklerini azaltmak için çok sayıda moleküler tedavi yaklaşımı preklinik aşamada denenmektedir. Wnt uyarısının başta kolon kanseri olmak üzere birçok kanserde rolü olduğu uzun süredir kanıtlanmış olmasına rağmen, Wnt kanonik ve kanonik olmayan uyarıları için halen netleşmiş bir tedavi yaklaşımı geliştirilebilmiş değildir. Kanonik ya kanonik olmayan Wnt uyarısı için izole tek inhibitör kullanımı genelde başarılı değildir. Bu iki yolağın KKH gelişiminde birleşerek çalıştığını düşündüren az sayıdaki çalışma göz önünde bulundurularak kombine şekilde kanonik ve kanonik olmayan yolakların bloke edilmesinin meme kanseri kök hücre popülasyonunu anlamlı şekilde azaltacağı ve saldırgan özellikleri baskılayacağı öngörülmektedir.

2.5. Çalışmanın Amacı

Meme kanseri, sık görülen ve tedavi seçeneklerindeki ciddi gelişmelere rağmen halen saldırgan davranışlı alt grupları nedeniyle yüksek mortalite problemi yaratan bir kanser türüdür. Özellikle saldırgan olarak kabul edilen üçlü negatif meme kanserleri başta olmak üzere, kanser hücre popülasyonu içinde bulunan KKH özellikleri taşıyan hücrelerin

tedaviye direnci artırdığı, sessiz duruma geçerek yıllar sonra bile nüksler ile ortaya çıkabildiği klinik takiplerde gösterilmiştir. Bu KKH popülasyonlarında Wnt, Notch ve Hedgehog yolaklarının daha fazla rol aldığı çok sayıda araştırmada gösterilmiştir. Bu yolaklara yönelik olarak, KKH'leri için hedeflenmiş tedavi seçenekleri araştıran artan sayıda çalışma mevcuttur. Wnt yolağı için yapılan çalışmaların çoğunda klasik Wnt/beta-katenin yolağı tek molekül ile baskılanmaya çalışılmaktadır. Klasik Wnt yolağı ile sinerjistik çalıştığı gösterilmiş olan Wnt-kalsiyum yolağına yönelik KKH çalışmaları çok kısıtlıdır. Biz bu çalışmamızda, meme kanseri popülasyonlarının çoğunu temsil eden, hem ER+ hem de üçlü negatif meme kanser hücre popülasyonlarında, klasik Wnt yolağı ve klasik olmayan Wnt-kalsiyum yolağının kombine şekilde baskılanması ile KKH popülasyonunun ve dediferansiasyonunun azaltılmasını hedefledik. Bu şekilde kombine baskılanma ile hem beta-kateninin etkin şekilde azalacağı, hem de hücre içine beta-katenin geçişi önlenerek kök hücre popülasyonunu azalacağı öngörülmektedir. KKH popülasyonundaki baskılanmanın üçlü negatif hücre hatlarında daha belirgin olması beklenmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz, Kimyasal Madde ve Solüsyonlar

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Laminar flow (HeraSafe KS Class II Safety Cabin)

İnkübatör (Hereaus HeraCell 150i, Almanya)

İnverted mikroskop (Olympus, Japonya)

Santrifüj cihazı (Harrier, İngiltere)

Vorteks (Dragon Laboratory, Çin)

Spektrofotometre (Epoch, Biotek, ABD)

Otomatik mikropipet (10 µl, 100 µl, 1000 µl skalalarında, Gilson)

Otomatik çok kanallı pipet (20-200 µl skalasında Gilson)

pH Metre (Consort C1020)

Mini Protean Tetra Cell (BioRad, Almanya)

Akım sitometri (BD FACS Canto II, BD Biosciences, ABD)

3.1.2. Hücre kültürü için kullanılan besiyerleri ve kimyasallar

Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) (Biochrome AG, Almanya)

Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM, high glucose) (Biochrome AG, Almanya)

Fetal bovine serum (Biochrome AG, Almanya)

Antibiyotik (PSA) (Penicilin&Streptomycin) (Biochrome AG, Almanya)

Trypsin-EDTA (Biochrome AG, Almanya)

Tyrphan blue (Sigma-Aldrich, ABD)

DMSO (Sigma-Aldrich, ABD)

Albumin (Sigma-Aldrich, ABD)

3.1.3. Kullanılan kimyasallar, tampon ve çözeltiler

Akrilamid (Sigma-Aldrich, ABD)

Anti CD133 Monoklonal antikor (BD; ABD)

Anti CD44 Monoklonal antikor (BD; ABD)

APS (Sigma-Aldrich, ABD)

Bisakrilamid (Sigma-Aldrich, ABD)
Bradford Solüsyonu (5X)
Bradford solüsyonu (5X)
Brom fenol blue (Sigma-Aldrich, ABD)
Comassie blue brilliant R (Sigma-Aldrich, ABD)
Coomassie brillant blue G250 (Sigma-Aldrich, ABD)
Distile su
Estradiol (Assos, Türkiye)
MTT ([3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide])
(Sigma-Aldrich, ABD)
MTT (5 mg/ml konsantrasyonda, PBS ile hazırlanmış)
Niklosamid (Sigma-Aldrich, ABD)
SDS %10 (50 g SDS+ 5 ml 1 N HCL+ 500 ml distile su)
Thapsigargin (Sigma-Aldrich, ABD)
Tris- Base (Sigma-Aldrich, ABD)
Western Bright ECL HRP-K (Advansta, ABD)
XAV939 (Selleck Chemicals, ABD)

3.1.4. Hücre hatları

MDA-MB-231 meme kanser hücre hattı: (HTB26) American Type Culture Collection (ATCC), ABD

MCF-7 meme kanser hücre hattı: American Type Culture Collection (ATCC), ABD

3.2. Araştırma Planı ve Yöntemler

Çalışma grupları aşağıdaki gibi planlanmıştır. İnhibitörler IC₅₀ dozda kombine olarak kullanılmışlardır.

1. Kontrol grubu (hiçbir uygulama yapılmadı)
2. Hücreiçi Wnt kanonik yol inhibisyonu ve Wnt kalsiyum yolağı inhibisyonu: XAV-939 + thapsigargin (X+T grubu)
3. Wnt kanonik yol inhibisyonu ve LRP5/6 reseptörü blokajı: XAV-939 + Niclosamide (X+N grubu)

4. LRP5/6 reseptörü blokajı ve Wnt kalsiyum yolağı inhibisyonu: Niclosamide + thapsigargin (T+N grubu)
5. Kombine Wnt kanonik yolak artı Wnt kalsiyum yolağı inhibisyonu ve LRP5/6 reseptörü blokajı: XAV-939 + thapsigargin + Niclosamide (X+T+N grubu)

3.2.1. Hücre kültürü:

MDA-MB-231 hücreleri DMEM, MCF-7 hücreleri RPMI-1640 besiyeri içerisinde %10 fetal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin içeren karışımda 25 cm²'lik flasklara ekildi. Oluşturulan hücre kültürleri %5 CO₂ ve % 95 nem içeren 37 °C sabit sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin gelişimi inverted mikroskop ile takip edilerek 2-3 günde bir hücreler pasajlanarak yeterli sayıya ulaşması sağlandı. Hücre sayımları Thoma lamı ile yapıldı, canlılıklar Trypan mavisi atma testi ile değerlendirildi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler diğer yöntemler için kullanıldı.

Deneyler öncesinde MCF7 hücre hattında KKH oluşumunu artırarak kullanılan inhibitörlerin etkinliğini daha net görmek için, daha önce tanımlandığı şekli ile (64, 65) hücre hattı ortamına inhibitörler uygulanmadan 24 saat önce 1 nM östrodiol uygulandı. Tüm deneysel çalışmalar 3 defa tekrarlandı.

3.2.2. MTT yöntemi ile IC₅₀ konsantrasyonlarının belirlenmesi:

MTT([3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]) testi sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan enzimatik bir testtir. Bu test kullanılarak hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. MTT testi temel olarak mitokondriyal aktiviteyi değerlendiren bir testtir. Ortamdaki metabolik olarak aktif canlı hücre miktarı ne kadar fazla ise mitokondriyal aktivite de yüksek olacaktır. NADPH bağımlı oksidoredüktaz enzimleri tarafından MTT molekülünün tetrazolium halkasının parçalanması ilkesine dayanmaktadır. Mitokondri enzimleri tarafından indirgendiğinde sarı renkli tetrazolium kristalleri mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Oluşan kristaller 540 nm dalga boyunda optik yoğunluklarının ölçülmesi ile değerlendirilir.

Yöntem 96 kuyucuklu plakalarda çalışıldı ve uygulama aşağıdaki şekilde yapıldı:

1. İlk kolon besiyeri kontrol kolonu olup 150 µl besiyeri eklendi, 2. kolon hücre kontrol kolonudur ve 100 µl besiyeri eklendi. 3. kolon en yüksek ilaç dozun eklendiği kolon olduğundan boş bırakıldı. 4-12 arasındaki tüm kolonlara da 100 µl besiyeri eklendi.
2. En yüksek ilaç dozu 200 µl olacak şekilde boş olan 3. kolona konuldu.
3. İlaç yatay olarak 100 µl dilüe edilerek dağıtıldı.
4. Kuyu başına 15000/50 µl hücre gelecek şekilde hücre süspansiyonu tüm kuyulara dağıtıldı.
5. Plak belirlenen sürede (48 saat) 37 °C de inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyonun ardından 20 µl MTT kuyulara dağıtıldı.
7. 37 °Cde 4 saat inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon sonunda tüm kuyulara 100 µl %10 SDS eklenerek bir gece inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyonun ardından 540 nm değerinde okutularak sonuçlar kaydedildi.

Uygulama yapılmayan hücrelerin optik değerlerinden kör okumanın değerleri çıkartılarak elde edilen verilerden grafik çizildi. Grafiğin eğimi hesaplanarak, bu eğime uygun olan, hücrelere uygulanan kimyasalların IC₅₀ dozları hesaplandı.

3.2.3. Hücre Kültüründen Protein Miktar Analizi

Bradford tarafından geliştirilen metotla total protein içeriği belirlendi. 5 kat konsantre (5X) olarak hazırlanan Bradford solüsyonu karanlık ortamda +4°C'de saklandı. 5X solüsyonunu hazırlamak için 500 mg Coomassie brilliant blue G250, 250 mL etanol ve 500 mL fosforik asit eklendi, solüsyon 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan 5X solüsyonu 1X'e seyreltildi ve süzüldü. BSA (Bovine serum albumin) taze olarak, 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

Örnekler hazırlanırken 15 µl örnek + 235 µl distile su olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Kontrol tüpü (kör) Bradford ve distile su içerecek şekilde hazırladı. Tüplere sırasıyla Bradford solüsyonu, distile su ve örnek koyuldu. Hazırlanan tüpler 10 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda tüpler iyice vortekslendi ve 96 kuyucuklu kaplara konuldu. 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve absorbans değerlerine göre oranlar belirlendi. Belirlenen oranlara uygun grafik formüle edilerek çizildi.

3.2.4. Western Blot

Western Blot, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide kullanılan önemli bir teknik olup, saflaştırılan kompleks protein karışımından spesifik proteinleri belirlemede kullanılır. Tekniğin temelinde büyüklüğüne göre ayırma, katı bir desteğe aktarma ve hedef proteini görselleştirmek için uygun bir birincil ve ikincil antikor kullanarak işaretleme bulunmaktadır.

Örneklerin protein miktarının belirlenmesini takiben, örnekler SDS PAGE kuyucuklarına yüklendi. Önce paketleyici daha sonra ayırıcı jelde yürütüldü ve peşinden membrana transfer edildi. Membrana transfer sonrasında membranlar öncelikle fosfo B catenin, axin 1 ve axin 2 spesifik monoklonal antikorlarla daha sonra uygun sekonder antikorlar ile işaretlendi. Housekeeping protein olarak GAPDH kullanıldı. İşaretleme sonrası protein bantları kemilüminesans ile görünür hale getirilerek görüntü kaydedildi ve ImageJ yazılımı aracılığıyla bantların yoğunluğu belirlendi.

SDS-PAGE (w/v)	Ayırıcı Jel (ml) %12	Paketleyici Jel (ml) %4
Jel solüsyonu	1,7	2,1
dH ₂ O	2	0,5
Ayırıcı Jel Solüsyonu	1,3	-
Paketleyici Jel Solüsyonu	-	0,38
SDS	0,05	0,03
APS	0,05	0,03
TEMED	0,002	0,003
Toplam Hacim	5	3

Jel Solüsyonu

14,6 g akrilamid ile 0,4 g bisakrilamid tartıldı, 50 ml dH₂O içinde çözdürüldü. Filtreden süzdürüldü. +4°C'de karanlıkta muhafaza edildi.

Ayırıcı Jel Solüsyonu (1.5 M, 100 ml)

18,15 g Tris-base tartıldı, pH:8,8 olarak ayarlandı. 100 mL'ye dH₂O ile tamamlanıp, +4°C'de saklandı.

Paketleyici Jel Solüsyonu

6 g Tris-base tartıldı, pH:6,8 olarak ayarlandı. 100 ml'ye dH₂O ile tamamlanıp, +4°C'de saklandı.

SDS (10 % w/v, 10 ml)

1 g SDS tartıldı, 10 ml'ye dH₂O ile tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

APS (10 % w/v, 1 ml)

100 mg amonyumpersülfat 1 ml'ye dH₂O ile tamamlandı. Her deney öncesi taze hazırlandı.

Ayırıcı jel döküldükten sonra üzerini kapatacak kadar isopropanol eklendi. Jel polimerleştikten sonra isopropanol uzaklaştırıldı ve paketleyici jel döküldü. 1X elektroforez solüsyonu %0,1 SDS içerecek şekilde hazırlandı. Taraklar kuyulara zarar vermeden dikkatlice çıkarıldı ve tanka yerleştirildi.

Running (Elektrot) Solüsyonu (10X, 50 ml)

15 g Tris-base ve 72 g Glisin tartıldı, solüsyon dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Örnek yüklemek için, 4X örnek dilüsyon buffer örnekle karıştırılarak 1X'e dilue edildi. Örnekler 95°C'de 5 dk denatüre edildi. Örnekler 30 µg protein içerecek şekilde yüklendi.

Örnek Dilüsyon Solüsyonu (4X, 10 ml)

2,5 ml Tris-HCl, 4 ml gliserol, 2 ml β-merkaptoetanol, 0,8 g SDS ve 0,001 g bromfenolblue karıştırıldı. Solüsyon dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı. Karanlıkta +4°C'de saklandı.

Elektroforez paketleyici jel için 100 V, ayırıcı jel için 140 V olacak şekilde ayarlandı.

Jeldeki toplam hücre proteinlerini görüntülemek için jel, 1 saat Comassie Blue boyama solüsyonu ile boyandı. Renksizleştirme solüsyonu ile arada değiştirilerek 1 gece çalkalayıcıda bekletildi.

Comassie Mavisi Boyama Solüsyonu (400 ml)

Comassie blue brilliant R 0,4 g tartıldı. 200 ml metanol ve 48 ml glasial asetik asit ile karıştırıldı. Solüsyon dH₂O ile 400 ml'ye tamamlandı. Filtre kağıdından süzüldü ve karanlıkta +4°C'de saklandı.

Renksizleştirme Solüsyonu (500 ml)

150 mL metanol ile 35 ml glasial asetik asit karıştırıldı, Solüsyon dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı. Filtre kağıdından süzüldü. Karanlıkta +4°C'de saklandı.

0,45 µm nitroselüloz membrana transfer solüsyonu içinde elektroforetik olarak transfer edildi. Membran ve filtre kağıtları transfer solüsyonu ile ıslatıldı.

Transfer (Blotting) Solüsyonu (4l)

12,114 g Tris-base, 57,65 g Glisin tartıldı. 800 ml metanol eklendi. Solüsyon dH₂O ile 4 l'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Transfer 90 dk 90 V'da gerçekleştirildi.

Transfer sonrası membran TBST Buffer ile 10 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklandı.

TBST (Equilibration) Solüsyonu (1l)

29,25 g sodyumklorit ile 3,16 g Tris-HCl tartıldı. 500 µL Tween 20 eklendi. Solüsyon dH₂O ile 1 l'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

Bloklama Solüsyonu (300 ml)

15 g albümin tartıldı, 300 ml'ye TBST ile tamamlandı. +4°C'de saklandı.

+4°C'de membran monoklonal antikor ile gece boyu inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5 er dakika TBST ile yıkandı. Peroksidaz konjugatı olan Goat Anti-Mouse IgG ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 3 kez TBST ile yıkandıktan sonra görüntüleme aşamasına geçildi.

3.2.5. KKH popülasyonunun belirlenmesi

Uygulama yapılan hücre kültür hatlarından toplanan hücre popülasyonunun içindeki kök hücrelerin belirlenmesi amacıyla meme kanser hücreleri için özgün olduğu bildirilmiş olan insan anti-CD44 (FITC işaretli) ve anti-CD133 (PerCp işaretli) antikorları ile işaretlenme yapılarak akım sitometri ile değerlendirme yapıldı.

Akım sitometri:

Bunun için hücreler 100 µL CellWash tamponu içinde süspanse edildi. Üzerlerine floresan konjuge antikorlar, uygun kombinasyon ve ideal konsantrasyonlarda koyulup +4C⁰'de, karanlıkta, 40 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneklerle 2 ml CellWash tamponu eklendi, santrifüjlenerek yıkandı (400xg'de 5 dk). Sonrasında 150 µl CellWash tamponu ile süspanse edilen hücreler akım sitometri cihazı (BD FACS Canto II cihazı ve BD FACSDiva yazılımı) ile okundu ve veri dosyalar.fcs (*flow cytometry standard*) dosya formatında FlowJo yazılımına (Tree Star, ABD) aktarıldı. Yüzey molekül ifadeleri analiz edildi.

Ortalama floresan yoğunlukları (OFY) değerlendirilirken, kullanılan floresan ve cihaz voltaj farklılıklarını dışlayabilmek için yapılan analizdeki OFY değerleri aynı analizde bakılan otofloresan OFY değerlerine bölündü.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin değerlendirilmesi için PASW 18 istatistik programı (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.) kullanılmıştır. Çoklu gruplar arasındaki farklılıklar için ANOVA testi, ikili gruplar arası farklılıklar için Student t test kullanılmıştır. Gruplararası dağılımın homojen olmaması durumunda ANOVA için post-hoc test olarak Dunnett's T3, gerektiğinde nonparametrik test olarak ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U test ve çoklu grup karşılaştırmaları için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. İstatistiksel testler yapılırken %95 güvenlik aralığı için alfa değeri 0.05 olarak alınıp $p \leq 0.05$ olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi ile belirlenmiş olan XAV939, Thapsigargin ve Niclosamid IC₅₀ değerleri

MTT hücre proliferasyon testlerinin üçer kez tekrarlanan 48 saat analizi sonrasında XAV939 IC₅₀ dozu MCF-7 için 121,41 μ M, MDA-MB-231 için 210,53 μ M olarak bulunmuştur.

Niclosamid IC₅₀ dozu MCF-7 için 79.81 μ M, MDA-MB-231 için 138,78 μ M olarak bulunmuştur.

Thapsigargin IC₅₀ dozu MCF-7 için 18.71 μ M, MDA-MB-231 için 6,82 μ M olarak bulunmuştur.

Tablo 3: MCF7 ve MDA-MB231 hücre hatlarında XAV939, Niclosamide ve Thapsigargin ile 48 saat için MTT yöntemiyle elde edilen IC₅₀ değerleri. Değerler μ M ($\pm$ SD) olarak ifade edilmiştir.

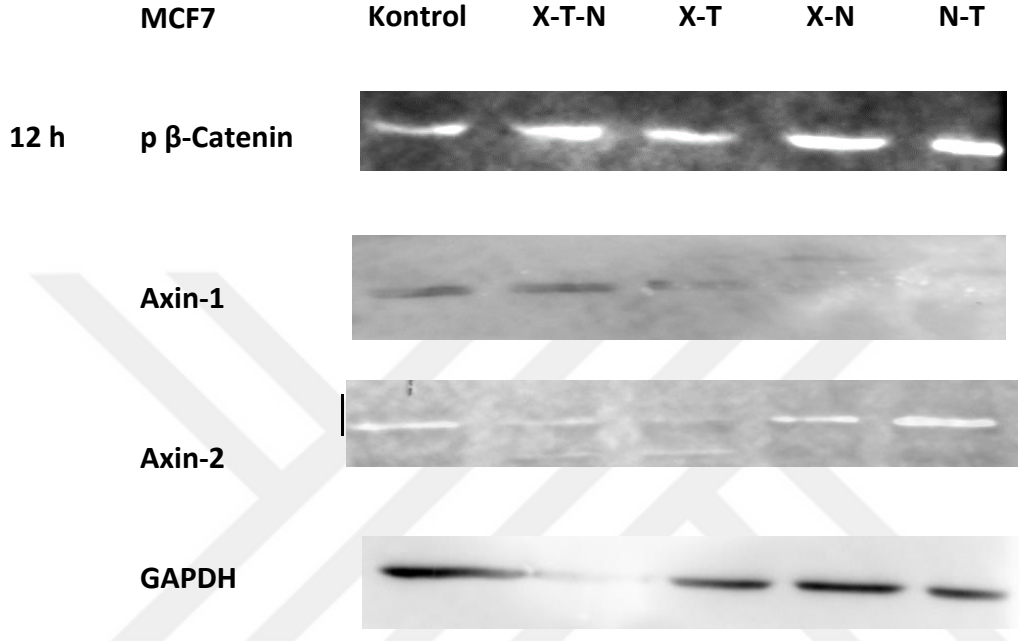
	MCF7	MDA-MB-231
XAV939	121,41 ($\pm$ 16,48)	210,53 ($\pm$ 38,10)
Niklosamid	79,81 ($\pm$ 17,18)	138,78 ($\pm$ 30,13)
Thapsigargin	18,71 ($\pm$ 13,24)	6,82 ($\pm$ 2,04)

MCF7 hücreleri için MTT deneyleri sonrası elde edilen IC₅₀ değerleri dikkate alınarak sublethal dozlar olarak uygulama dozları XAV939 için 60 μ M, Thapsigargin için 9 μ M, Niclosamid için 40 μ M olarak belirlenmiştir.

MDA-MB-231 hücreleri için MTT deneyleri sonrası elde edilen IC₅₀ değerleri dikkate alınarak sublethal dozlar olarak uygulama dozları XAV939 için 100 μ M, thapsigargin için 3,5 μ M, Niclosamid için 70 μ M olarak belirlenmiştir.

4.2. Western Blot Analiz Bulguları

MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında planlanan çalışma gruplarında XAV939, niclosamide ve thapsigargin ikili ve üçlü kombine 12 ve 24 saat uygulamaları sonrasında beta-katenin, axin1 ve axin2 düzeyleri Western blot tekniği ile değerlendirilmiştir.



Şekil 10. MCF7 hücre hattında 12 saatlik uygulama sonrasında jel elektroforez görüntüleri (X=XAV939, T=Thapsigargin, N=Niklosamid)

Tablo 4. MCF hücre hattında 12 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi.

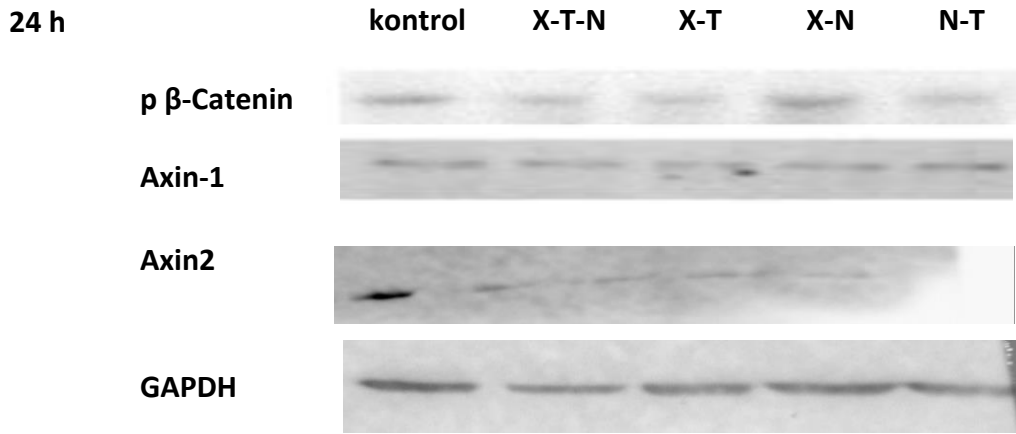
PROTEİN	ÇALIŞMA GRUPLARI					
	MCF7 12 Saat					
	Kontrol	XAV939+ Thapsigargin + Niclosamide	XAV939+ Thapsigargin	XAV939+ Niclosamid	Thapsigargin + Niclosamid	P değeri
Fosfo Beta Katenin	1^{b,c,d}	0,75^{a,b}	0,71^{a,b,c,d}	0,87^{a,b,c}	0,97^{a,b,d}	0,001
Axin1	1^{b,c,d}	0,81^{b,c,d}	0,71^{a,c,d}	0,43^{a,b,c,e}	0,05^{a,b,c,d}	0,0001
Axin2	1^{b,c,d,e}	0,17^{a,b}	0,13^a	0,15^{a,c}	0,12^{a,b,c}	0,0001

Üst harf karakterleri istatistiksel açıdan birbirinden anlamlı farkı olan grupları ifade etmektedir.

Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında fosfo beta-katenin düzeyi gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık göstermektedir (p=0,001). Gruplar ikili olarak birbirleri ile karşılaştırıldığında X+T+N ve X+T gruplarında beta-katenin düzeyi kontrol grubu ve diğer uygulama gruplarına göre anlamlı şekilde düşüktür (p= 0,005, p=0,008) (Tablo 4).

Axin1 için bütün gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı düzeyde fark mevcuttur (p=0.0001). Grupların ikili karşıştırmalarında Axin1 düzeyi Thapsigargin-Niclosamide grubunda kontrole göre 0,05 kata düştüğü için diğer grupların hepsinden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p=0,0001). Axin1 için X+N grubu, X+T+N ve X+T gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (p=0,001)

Axin2 için bütün gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark mevcuttur (p=0,0001). T+N grubunda axin2'nin control grubuna göre 0,12 kat azalması X+T+N ve X+N gruplarından anlamlı şekilde farklıdır (p=0,001)



Şekil 11. MCF7 hücre hattında 24 saatlik uygulama sonrasında jel elektroforez görüntüleri (X=XAV939, T=Thapsigargin, N=Niklosamid)

Tablo 5. MCF hücre hattında 24 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi.

PROTEİN	ÇALIŞMA GRUPLARI					
	MCF7 24 Saat					
	Kontrol	XAV939+ Thapsigargin+ Niclosamide	XAV939+ Thapsigargin	XAV939+ Niclosamide	Thapsigargin + Niclosamide	P değeri
Fosfo Beta Katenin	1 ^a	0.29 ^{a,b}	0.32 ^{a,d}	0.92 ^{b,c,d}	0.19 ^{a,b,c,d}	0.001
Axin1	1 ^a	0.31 ^{a,e}	0.48 ^{a,e}	0.36 ^{a,e}	0.08 ^{a,b,c,d}	0.0001
Axin2	1 ^a	0.21 ^{a,c,e}	0.13 ^{a,b,d}	0.18 ^{a,c,e}	0.12 ^{a,b,d}	0.0001

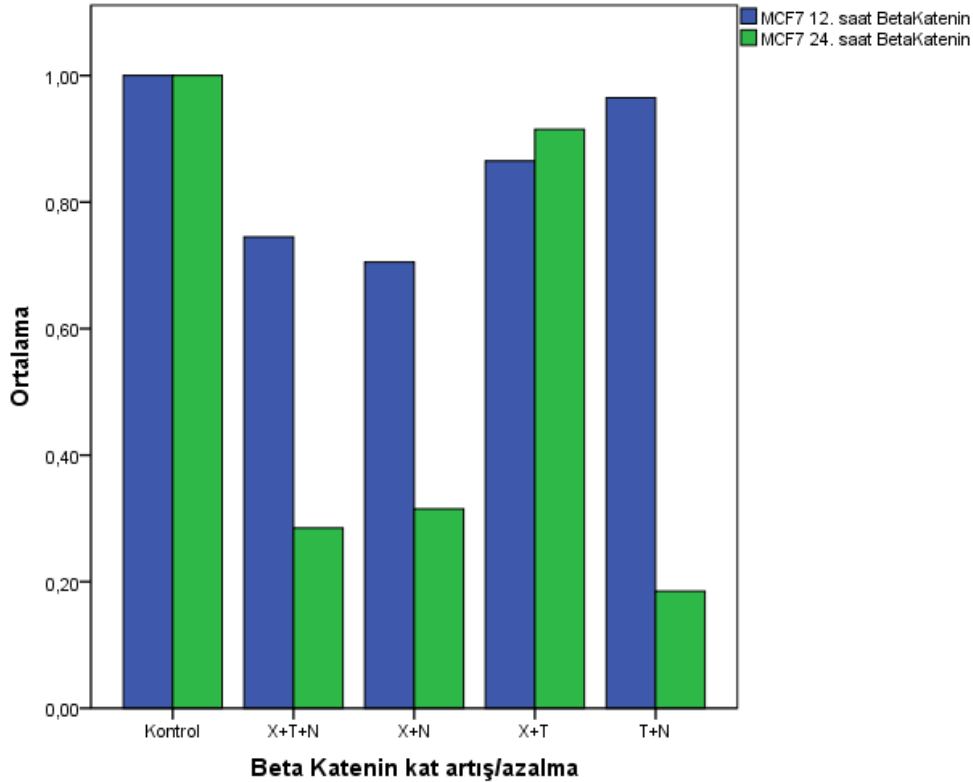
Üst harf karakterleri istatistiksel açıdan birbirinden anlamlı farkı olan grupları ifade etmektedir.

Fosfo Beta-katenin düzeyi açısından gruplar aralarında karşılaştırıldığında MCF7 hücrelerinde 24 saat uygulama sonrasında gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık mevcuttur (p=0,001). Thapsigargin-Niclosamide grubunda beta-katenin düzeyi kontrole göre 0,19 kata düştüğü için hem kontrol grubundan, hem de diğer gruplardan anlamlı şekilde farklı bulunmuştur (p=0,001) (Şekil 11).

Beta-katenin düzeyi açısından gruplar aralarında karşılaştırıldığında MCF7 hücrelerinde 24 saat uygulama sonrasında gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık

mevcuttur ($p=0.001$). Thapsigargin-Niclosamide grubunda beta-katenin düzeyi kontrole göre 0.19 kata düştüğü için hem kontrol grubundan, hem de diğer gruplardan anlamlı şekilde farklı bulunmuştur ($p=0.001$) (Şekil 11) (Tablo 5).

Ayrıca bütün inhibisyon grupları kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük olarak bulunmuştur ($p=0.001$).



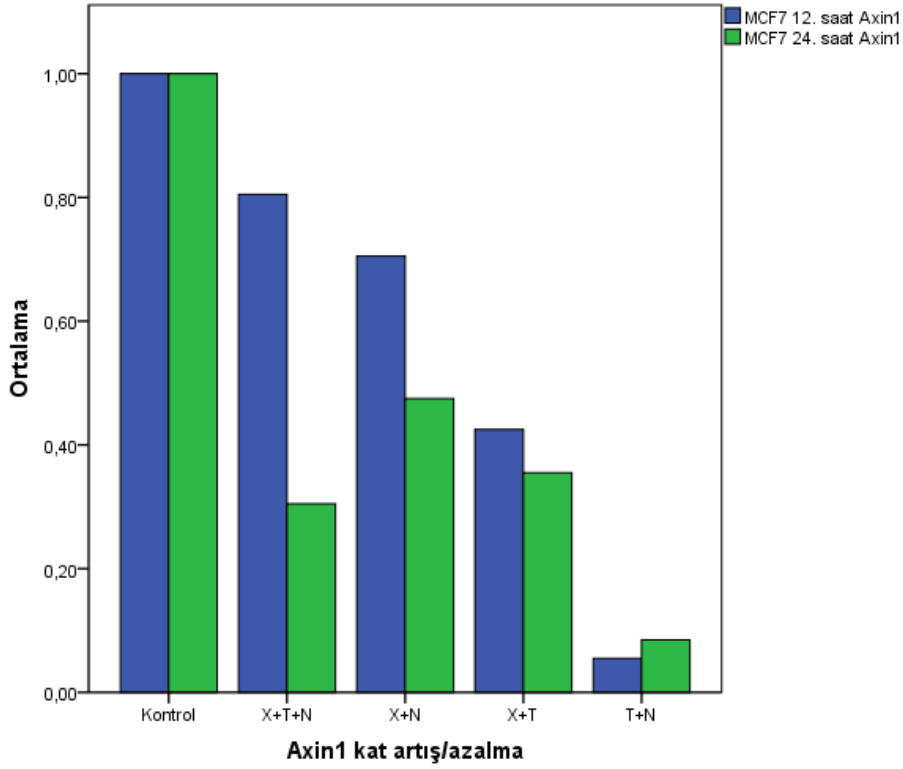
Grafik 1. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen fosfo beta-katenin değişim oranları

Axin1 ve axin2 düzeyleri MCF7 hücre hattında 24 saat uygulama sonrasında Thapsigargin-Niclosamide grubunda kontrole göre anlamlı şekilde düşerek 0,08 kat ve 0,12 kat olarak bulunmuştur. Bu durum gruplar arasında ciddi anlamlı fark yarattığı gibi gruplar arası değişkenliğin (varyansın) de anlamlı şekilde farklı olmasına yol açmıştır. Bu nedenle axin1 ve axin2 için post-hoc testler parametrik olmayan testler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

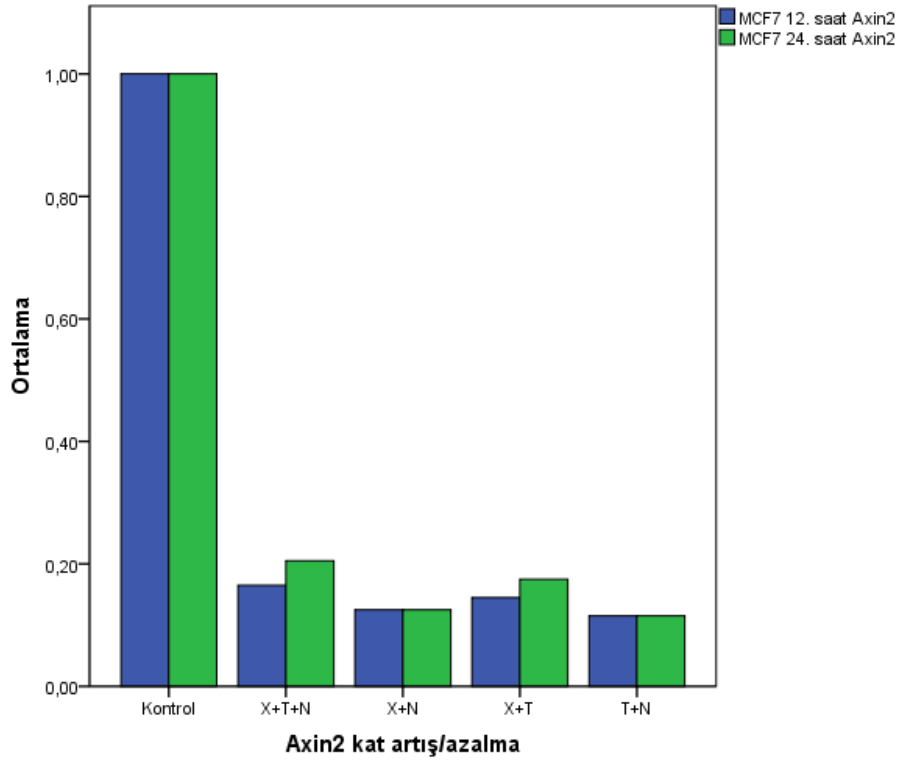
Axin1 için gruplar arasında anlamlı fark mevcuttur ($p=0,0001$) ve Thapsigargin-Niclosamide grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında hepsinden anlamlı şekilde düşüktür (bütün karşılaştırmalar için $p=0,0001$) (Grafik 2).

Axin2 için gruplar karşılaştırıldığında anlamlı fark mevcuttur ($p=0,0001$).

Gruplar ikili karşılaştırıldığında, X+T ve T+N grupları diğer uygulama gruplarına göre axin2 yönünden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,001$, $p=0,002$) (Grafik 3).

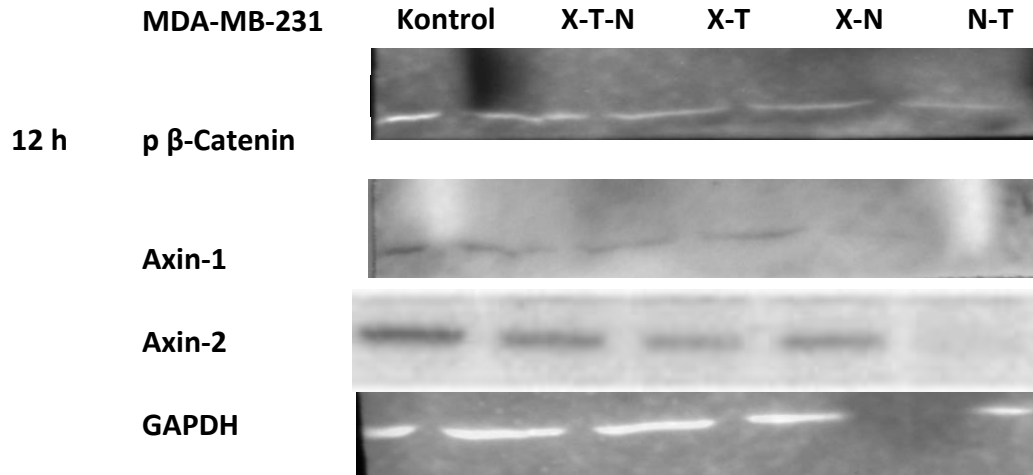


Grafik 2. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen axin1 değişim oranları



Grafik 3. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen axin2 değişim oranları

MCF7 hücre hattında Thapsigargin-Niclosamid grubunda 12. Saatten itibaren 24 saati de kapsayan şekilde belirgin axin1 ve axin2 düzeylerinde düşme dikkati çekmektedir. Ayrıca niclosamide kombinasyonu uygulanan bütün gruplarda 24 saat uygulama sonrasında belirgin ve istatistiksel anlamlı düzeyde beta-katenin düşüklüğü olduğu dikkati çekmektedir (Grafik 2 ve 3).

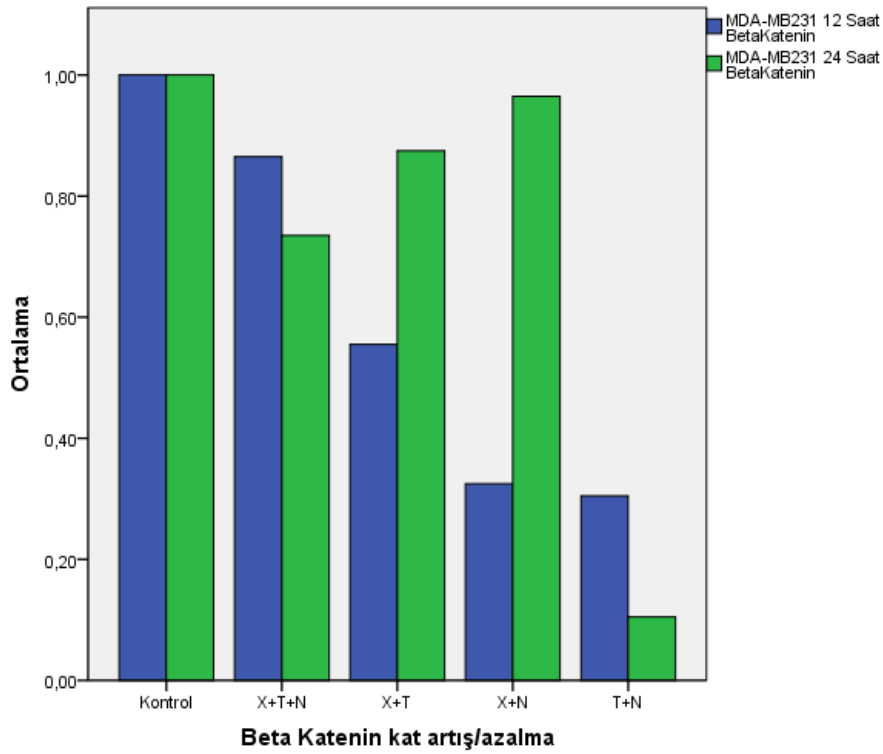


Şekil 12. MDA-MB-231 hücre hattında 12 saatlik uygulama sonrasında jel elektroforez görüntüleri (X=XAV939, T=Thapsigargin, N=Niklosamid)

Tablo 6. MDA-MB-231 hücre hattında 12 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi.

PROTEİN	ÇALIŞMA GRUPLARI					
	MDA-MB-231 12 SAAT					
	Kontrol	XAV939+ Thapsigargin + Niclosamid	XAV939+ Thapsigargin	XAV939+ Niclosamid	Thapsigargin+ Niclosamid	P değeri
FosfoBeta Katenin	1 ^{b,c,d,e}	0.87 ^{a,d,e}	0.56 ^{a,d,e}	0.33 ^{a,b,c}	0.31 ^{a,b,c}	0.0001
Axin1	1 ^{c,d,e}	1.01 ^{c,d,e}	0.46 ^{a,b,d,e}	0.32 ^{a,b,c}	0.28 ^{a,b,c}	0.0001
Axin2	1 ^{b,c,d,e}	0.68 ^{a,e}	0.44 ^{a,e}	0.62 ^{a,e}	0.10 ^{a,b,c,d}	0.0001

Üst harf karakterleri istatistiksel açıdan birbirinden anlamlı farkı olan grupları ifade etmektedir.



Grafik 4. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen fosfo beta-katenin değişim oranları

MDA-MB-231 hücre hattında 12 saat uygulama sonrasında fosfo beta katenin düzeyi için gruplar karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur (p=0,0001).

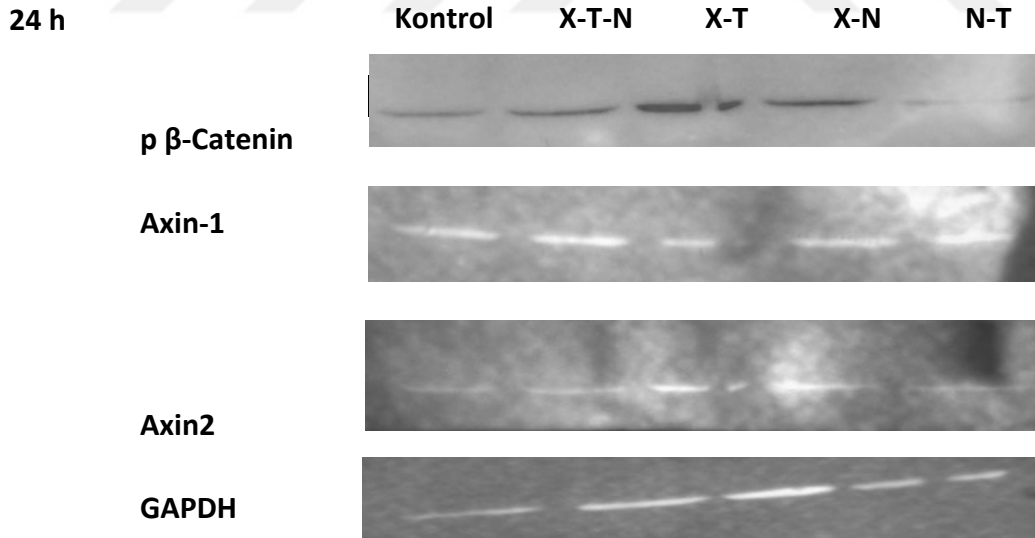
Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında bütün uygulama grupları kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşüktür ($p=0,0001$) (Grafik 4).

X+N ve T+N gruplarında beta-katenin düzeyi diğer uygulama gruplarından anlamlı düşük olarak bulunmuştur ($p=0,0001$).

MDA-MB-231 hücre hattında 12 saat uygulama sonrasında axin1 için gruplar karşılaştırıldığında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$).

X+N ve T+N grupları 12 saat uygulama sonrasında axin1 düzeyi için diğer uygulama gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,0001$) (Grafik 5).

MDA-MB-231 hücre hattında 12 saat uygulama sonrasında axin2 düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). Bütün inhibisyon uygulanan gruplarda axin2 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,001$). Thapsigargin-Niclosamide grubunda 0,10 katı bulan düşüklük nedeniyle diğer bütün uygulama gruplarından ciddi anlamlı şekilde farklı bulunmuştur ($p=0,0001$) Grafik 5).



Şekil 13. MDA-MB-231 hücre hattında 24 saatlik uygulama sonrasında jel elektroforez görüntüleri (X=XAV939, T=Thapsigargin, N=Niklosamid)

Tablo 7. MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat kimyasal uygulama sonrası çalışma gruplarında gözlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 proteinlerinin kat değişimi

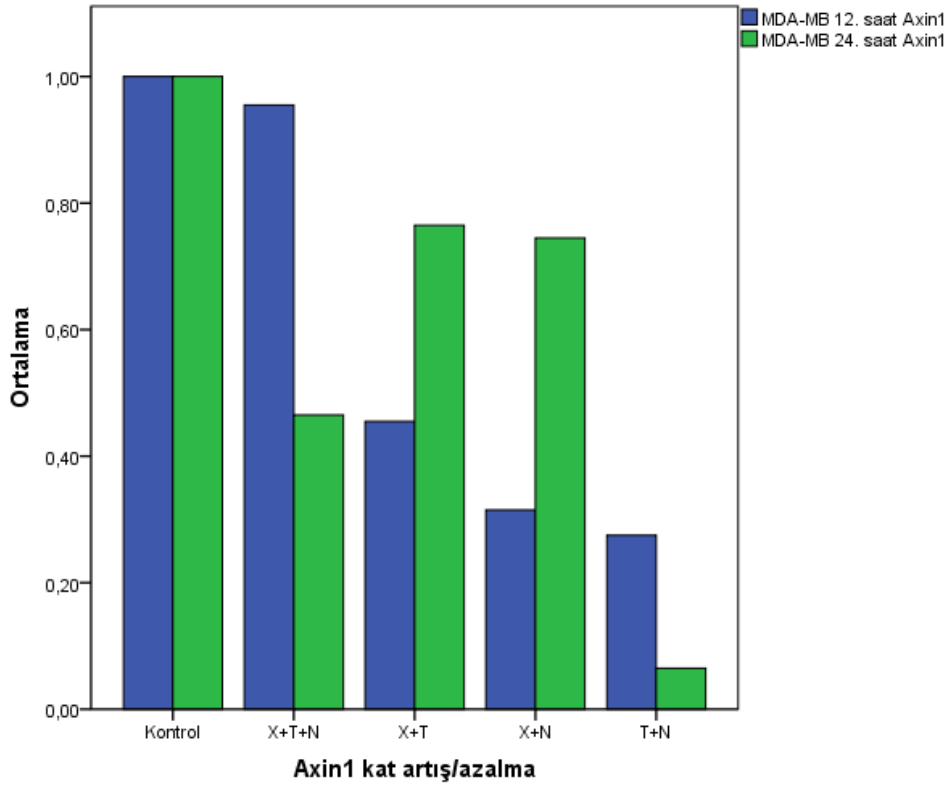
PROTEİN	ÇALIŞMA GRUPLARI					
	MDA-MB-231 24 SAAT					
	Kontrol	XAV939+ Thapsigargin + Niclosamide	XAV939+ Thapsigargin	XAV939+ Niclosamide	Thapsigargin + Niclosamide	p değeri
FosfoBeta Katenin	1 ^{b,c,e}	0,74 ^{a,d,e}	0,88 ^{b,e}	0,98 ^{b,e}	0,11 ^{b,c,d,e}	0,0001
Axin1	1 ^{b,c,d,e}	0,47 ^{a,c,d,e}	0,77 ^{a,b,e}	0,75 ^{a,b,e}	0,06 ^{a,b,c,d}	0,0001
Axin2	1 ^{b,c,d,e}	0,67 ^{a,e}	0,45 ^{a,e}	0,64 ^{a,e}	0,19 ^{a,b,c,d}	0,0001

Üst harf karakterleri istatistiksel açıdan birbirinden anlamlı farkı olan grupları ifade etmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat uygulama sonrasında beta-katenin düzeyi için gruplar karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur (p=0,0001).

Thapsigargin-Niclosamide grubunda 0,11 kat düzeyinde düşüş nedeniyle bu grup diğer uygulama grupları ve kontrol grubundan anlamlı şekilde farklıdır (her karşılaştırma için p=0,0001). Ayrıca X+T+N grubu kontrol grubuna göre anlamlı düşüktür (p=0,001) (Tablo 7).

MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat uygulama sonrasında axin1 düzeyi için gruplar arasında anlamlı fark mevcuttur (p=0,0001).



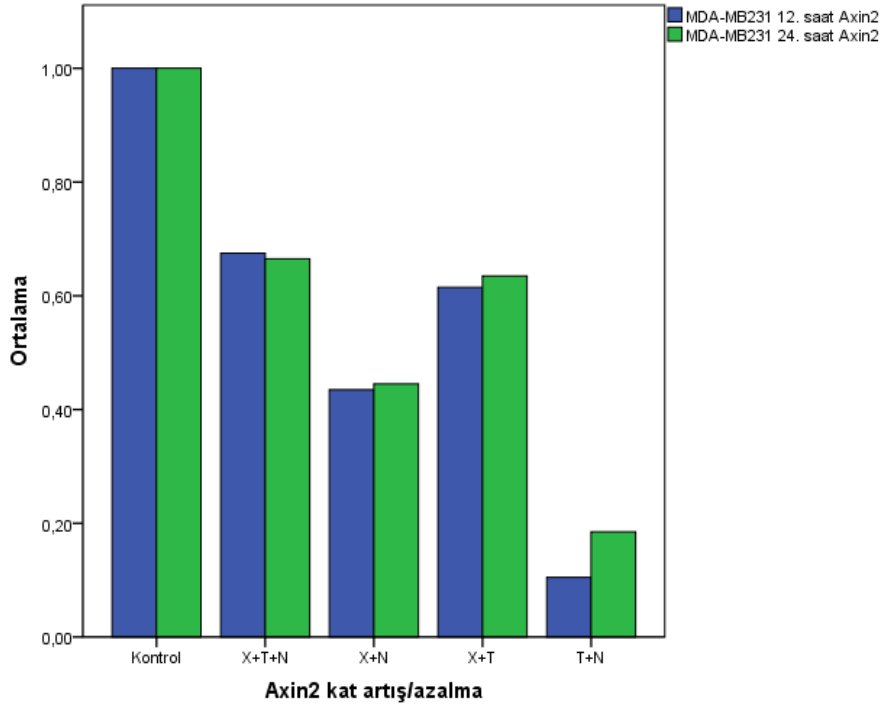
Grafik 5. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 uygulama sonucunda western blot yöntemiyle belirlenen axin1 değişim oranları

Axin1 için grupların ikili karşılaştırmalarında bütün uygulama grupları kontrolden anlamlı şekilde düşüktür ($p=0,001$). X+T+N grubu ve T+N grubu, axin1 için diğer uygulama gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuşlardır ($p=0,001$) (Grafik 5).

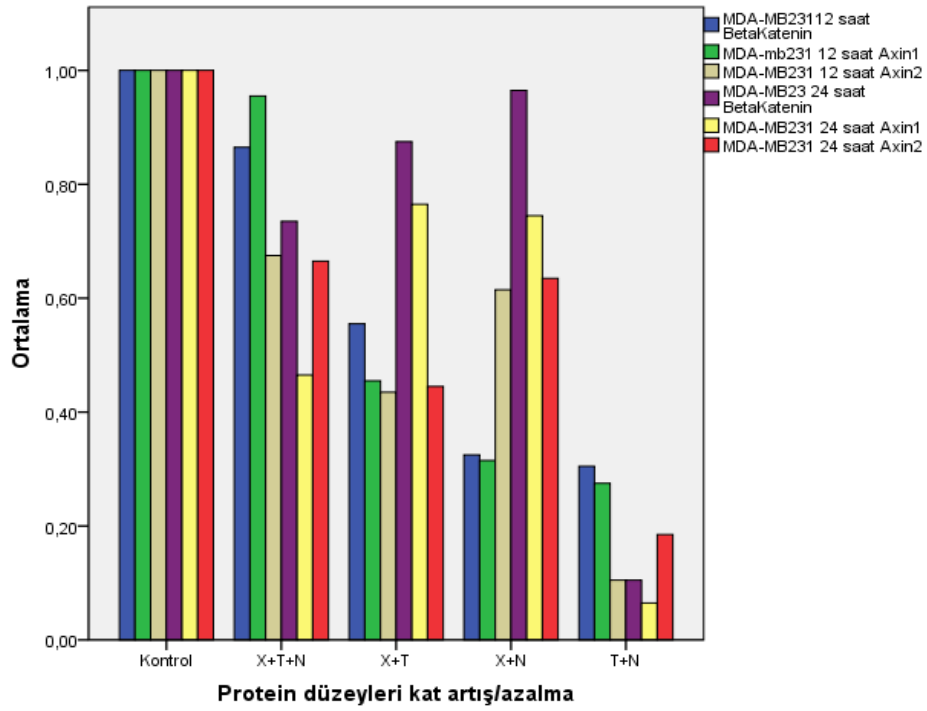
Thapsigargin-Niclosamide grubunda axin1 düzeyi diğer bütün uygulama gruplarına göre ciddi anlamlılık düzeyinde düşük bulunmuştur ($P=0,0001$).

MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat uygulama sonrasında axin2 düzeyleri için gruplar arasında çoklu karşılaştırmada anlamlı fark mevcuttur ($p=0,0001$).

Grupların ikili karşılaştırmalarında bütün uygulama grupları axin2 için kontrolden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,001$). T+N grubu inhibisyon uygulanan diğer grupların hepsinden anlamlı şekilde düşük olarak farklılaşmaktadır (bütün karşılaştırmalar için $p=0,0001$) (Grafik 6).



Grafik 6. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda belirlenen axin2 değişim oranları



Grafik 7. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda western blot yöntemiyle belirlenen beta-katenin, axin1 ve axin2 toplu değişim grafiği. (Her grup için soldaki ilk 3 sütun 12. Saat, sağdaki 3 sütun 24. Saat değerlerini göstermektedir)

Özellikle MDA-MB-231 hücre hattında Thapsigargin-Niclosamide grubunda 12. Saatten itibaren başlayıp 24. Saati de kapsayan, fosfo beta-katenin, axin1 ve axin2 düzeylerinin hepsinde diğer uygulama gruplarına göre belirgin olarak düşüklüğe yol açan etkinlik söz konusudur (Grafik 7).

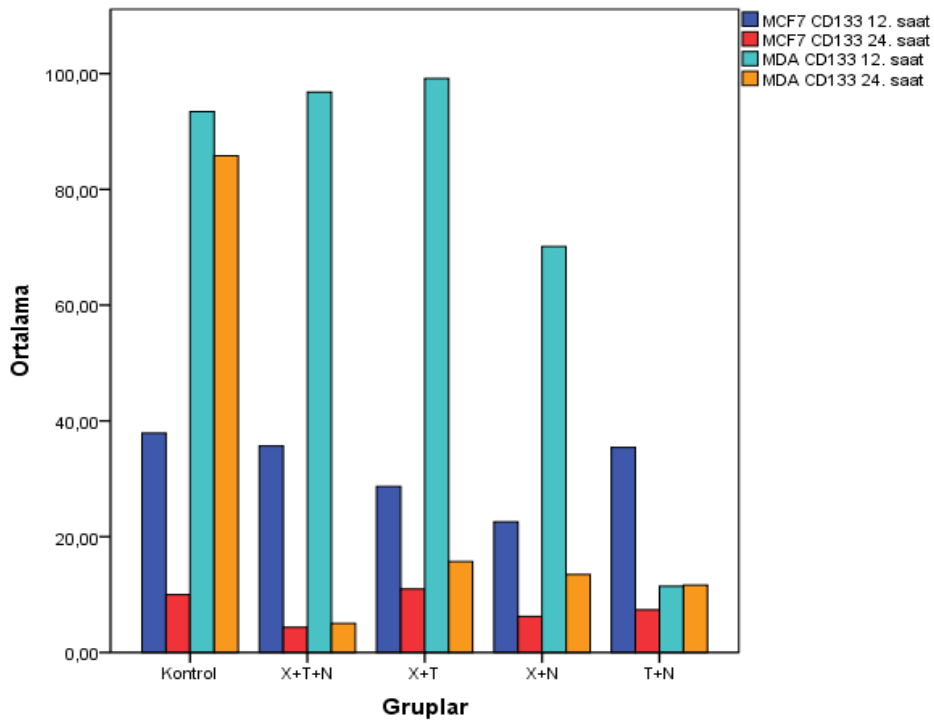


4.3. AKIM SİTOMETRİ BULGULARI

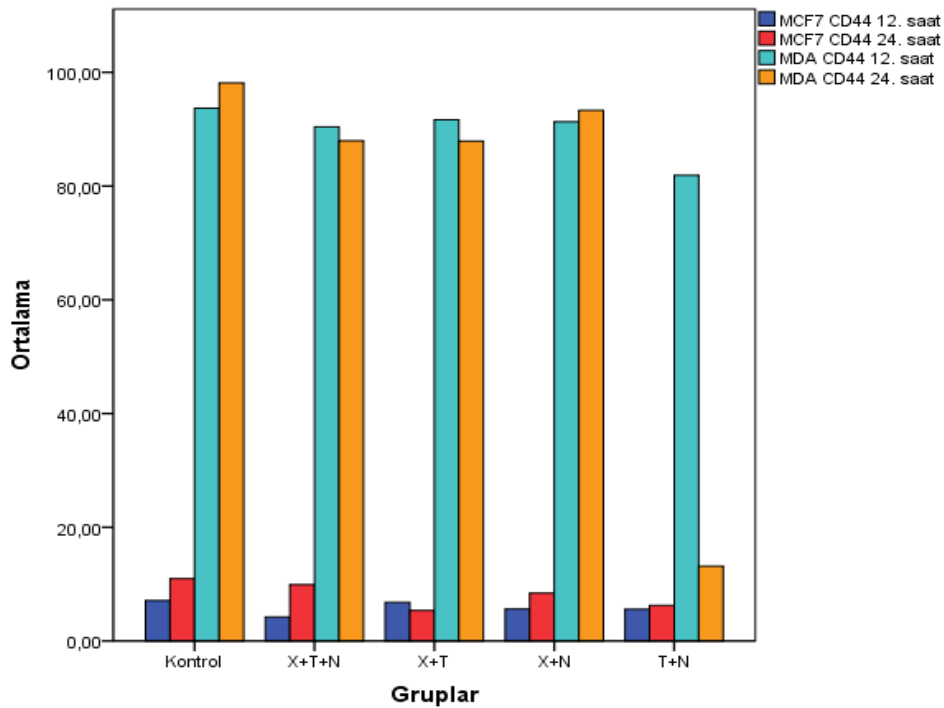
MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında planlanan çalışma gruplarında XAV939, niclosamide ve thapsigargin ikili ve üçlü kombine uygulamaları sonrasında 12. ve 24. saatlerde hücre kültürleri içinde CD133 ve CD44 yüzey işareti taşıyan KKH popülasyonları akım sitometri kullanarak tanımlanmaya çalışılmıştır.

Tablo 8. Akım sitometri okumaları sonrası toplam hücre popülasyonu içinde CD133 ve CD44 işaretli kök hücre popülasyonları için 12 ve 24 saat uygulama sonucunda elde edilen yüzde cinsinden değerler ve istatistiksel analizi (Her grup için ortalama değer ve altında $\pm$ ile standart sapma değeri verilmiştir)

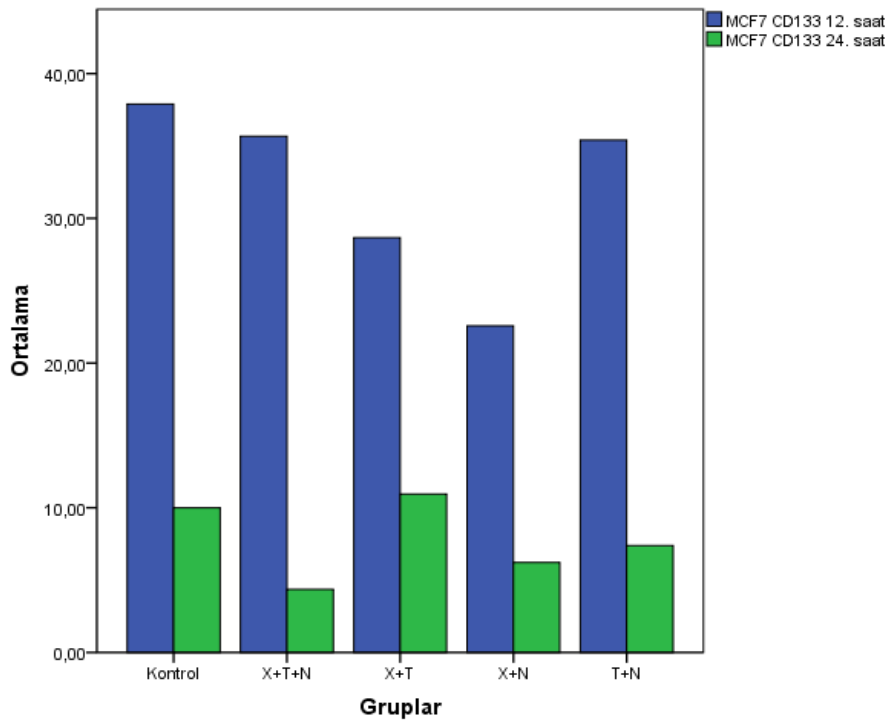
ÇALIŞMA GRUBU	HÜCRE HATTI			
	MCF7		MDA-MB-231	
12 Saat	CD133	CD44	CD133	CD44
Kontrol	37,9	7,1	93,4	93,7
	$\pm 2,59$	$\pm 0,80$	$\pm 5,42$	$\pm 1,82$
XAV939+ Thapsigargin+ Niclosamide	35,7	4,2	96,8	90,4
	$\pm 8,44$	$\pm 0,68$	$\pm 1,90$	$\pm 7,85$
XAV939+ Thapsigargin	28,7	6,8	99,2	91,7
	$\pm 11,59$	$\pm 0,88$	$\pm 1,11$	$\pm 2,41$
XAV939+ Niclosamide	22,6	5,6	70,1	91,3
	$\pm 2,32$	$\pm 0,42$	$\pm 50,26$	$\pm 5,01$
Thapsigargin+ Niclosamide	35,4	5,6	11,4	81,9
	$\pm 16,35$	$\pm 0,35$	$\pm 4,85$	$\pm 17,70$
p değeri	0,356	0,002	0,004	0,57
24 Saat				
Kontrol	9,99	10,96	85,8	98,13
	$\pm 3,85$	$\pm 1,00$	$\pm 5,28$	$\pm 0,86$
XAV939+ Thapsigargin+ Niclosamide	4,36	9,92	5,04	87,96
	$\pm 2,42$	$\pm 3,62$	$\pm 1,59$	$\pm 6,89$
XAV939+ Thapsigargin	10,95	5,38	15,69	87,90
	$\pm 2,09$	$\pm 1,84$	$\pm 9,10$	$\pm 7,59$
XAV939+ Niclosamide	6,22	8,43	13,47	93,3
	$\pm 1,28$	$\pm 3,22$	$\pm 4,13$	$\pm 2,20$
Thapsigargin+ Niclosamide	7,39	6,28	11,63	13,15
	$\pm 3,14$	$\pm 4,56$	$\pm 4,54$	$\pm 4,28$
p değeri	0,07	0,222	0,0001	0,0001



Grafik 8. MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında uygulama gruplarında 12 ve 24 saat uygulama sonrasında elde edilen “CD133⁺” yüzey pozitiflik oranları



Grafik 9. MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında uygulama gruplarında 12 ve 24 saat uygulama sonrasında elde edilen “CD44⁺” yüzey pozitiflik oranları

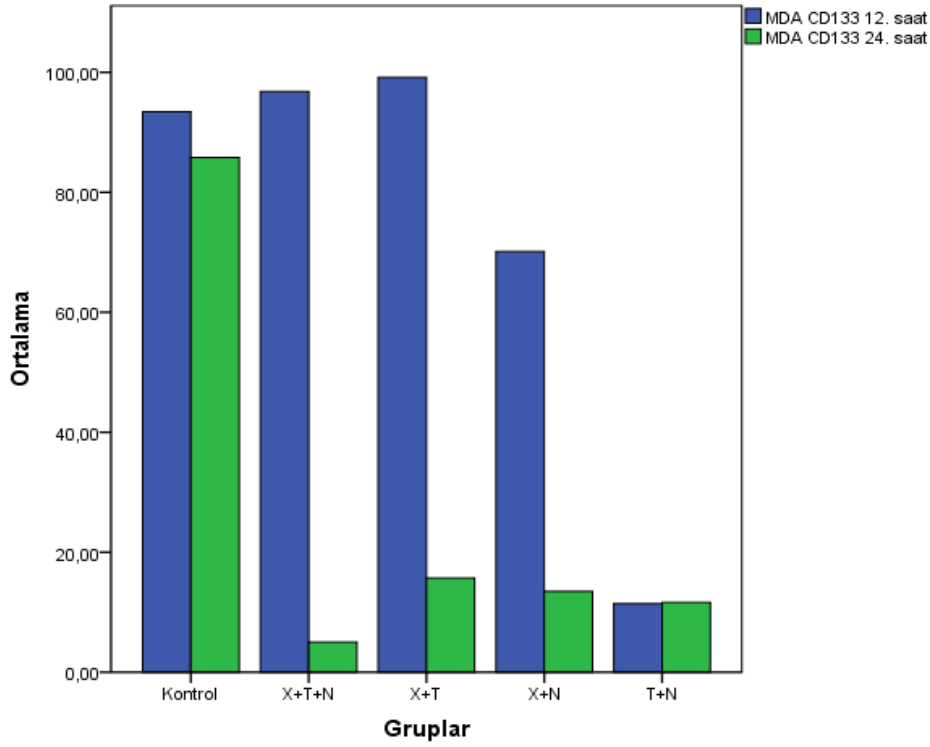


Grafik 10. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonrasında tespit edilen CD133⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri

MCF7 hücre hattında akım sitometri ile tespit edilen CD133 pozitif hücrelerin 12 saat uygulama sonrasında gruplar arası karşılaştırmasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,356$).

MCF7 hücre hattında, 12 saat uygulama sonrası, uygulama gruplarında CD 133⁺ hücre oranları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre sadece X-N grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p=0,03$) (Grafik 10).

CD133 için gruplar 24 saat uygulama sonuçları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık ortaya çıkmamıştır ($p=0,07$). X+T+N grubunda X+T grubuna göre istatistiksel olarak belirgin azalma saptanmıştır ($p=0,04$).

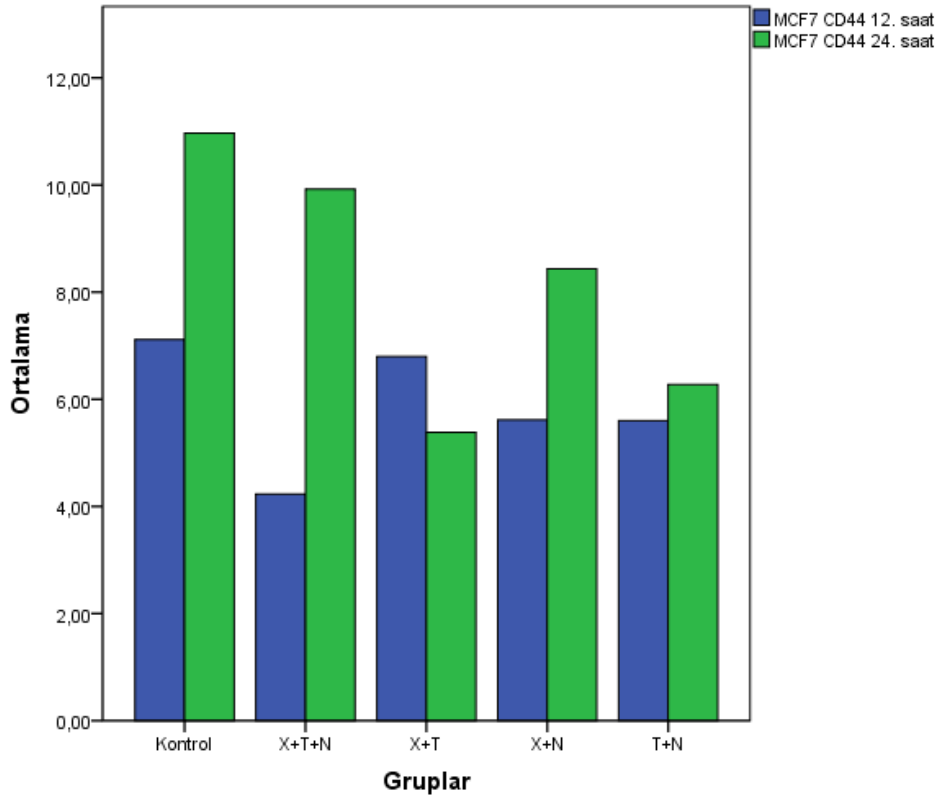


Grafik 11. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saatt uygulama sonrasında tespit edilen CD133⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri

MDA-MB-231 hücre hattında tespit edilen CD133 pozitif hücrelerin 12 saat uygulama sonrasında grupların kendi arası karşılaştırmasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p=0,004$).

Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Thapsigargin-Niclosamide grubunda diğer bütün gruplara göre anlamlı şekilde azalma gözlenmiştir ($p<0,05$).

MDA-MB-231 hücre hattında, 24 saat uygulama sonrası, uygulama gruplarında CD 133⁺ hücre oranları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma olduğu görülürken ($p=0,0001$), uygulama grupları arasında bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Grafik 11).

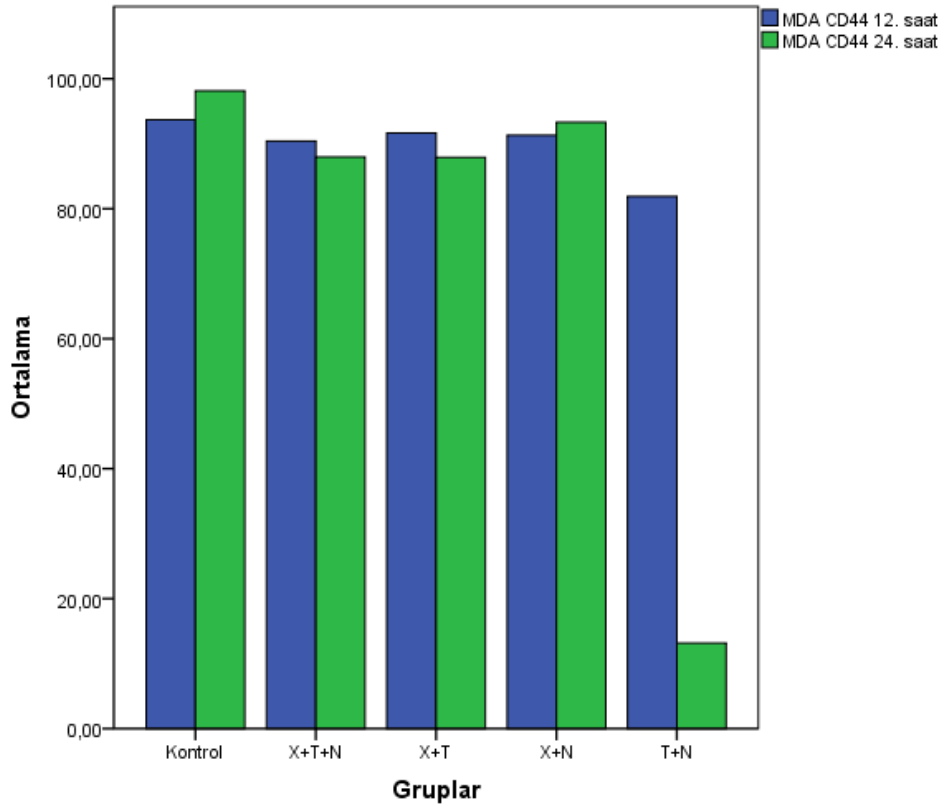


Grafik 12. MCF7 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda tespit edilen CD44⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri

MCF7 hücre hattında 12 saat uygulama sonrasında tespit edilen CD44⁺ hücre oranları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık mevcuttur ($p=0,002$).

İkili karşılaştırmalarda en düşük ortalama değere sahip olan X+T+N grubu, kontrol grubundan ($p=0,002$) ve X+T grubundan ($p=0,005$) anlamlı şekilde farklıdır (Grafik 12).

24 saat uygulama sonrasında CD44⁺ hücreler için karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,222$). Grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında da anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. X+T grubu ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlılık düzeyine yaklaşmaktadır ($p=0,08$) (Grafik 12).



Grafik 13. MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saat uygulama sonucunda tespit edilen CD44⁺ KKH ortalama (yüzde) değerleri

MDA-MB-231 hücre hattında ilk 12 saat uygulama sonrasında inhibisyon yapılan gruplarda inhibitörlerin anlamlı bir etkisi ortaya çıkmadı. Buna bağlı olarak KKH oranları çok yüksek olarak korundu ve CD44⁺ hücreler yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0,57$).

24 saat uygulama sonrasında Thapsigargin-Niclosamide grubunda izlenen CD44⁺ KKH sayısındaki ciddi düşüş nedeniyle gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark ortaya çıkmıştır ($p=0,0001$) (Grafik 13).

Sadece T+N grubunda gözlenen CD44⁺ KKH sayısındaki ciddi azalma nedeniyle, yapılan ikili karşılaştırmalarda T+N grubu diğer grupların hepsinden anlamlı şekilde farklılık göstermektedir ($p=0,0001$).

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanserdir ve genel olarak kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Meme kanserleri histopatolojik özellikleri dışında moleküler özellikleri ve davranış olarak da homojen bir hastalık değildir. İmmünohistokimya ve mRNA analizi ile farklı alt gruplar ayırt edilebilir. İmmünohistokimyasal analizler rutin klinik uygulamada genellikle ER (östrojen reseptörü), PR (progesteron reseptörü), Her2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü) ve Ki67 proteini durumunu belirlemek için yapılır. Bu rutin immünohistokimyasal analiz, tedavi stratejisini belirlemek için biyolojik belirteçler olarak hizmet ederler. ER-pozitif tümörler, her ikisi de ER fonksiyonuna müdahale eden antiöstrojenlere ve aromataz inhibitörlerine yanıt verir, Her2-pozitif tümörler, anti-Her2 antikoru trastuzumab gibi Her2'ye yönelik ilaçlara yanıt verir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %70-75 kadarı ER ve % 10-15 kadarı Her2 eksprese eder ve bu durum hedefe özgü tedaviyi destekleyen önemli bir özelliktir. Üçüncü bir immünohistokimyasal alt tip olan üçlü negatif meme kanseri, ER, PR ve Her2'den yoksundur ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 12 kadarını temsil eder. Şu anda üçlü negatif meme kanserleri için hedefe özgü bir tedavi mevcut değildir. Bunun yerine üçlü negatif meme kanseri hastaları kemoterapi ile tedavi edilir. Kemoterapi ileri evre ER-pozitif ve Her2-pozitif tümörlerde de yaygın olarak kullanılır. Genel olarak, ışınlama genellikle meme kanserinde ek bir tedavi olarak uygulanır. Tedavilerin farklılaşarak gelişmesi, gelişmiş ülkelerde meme kanseri mortalitesinin azalmasına ciddi anlamda katkıda bulunmuştur (66, 67). Fakat mortalite azalmış olmasına rağmen, en sık görülen kanser olan meme kanseri için toplam mortalite sayısı hala yüksektir.

Meme kanseri KKH tedaviye direnç etkenlerini ve tedavi zorluklarını bilerek, burada rol alan mekanizmalar üzerinden olası tedavi çözümlerine katkıda bulunabilmek amacıyla modellememizi KKH popülasyonunun azaltılması ve hedefli tedavi üzerine odakladık. Meme kanseri KKH gelişimi, davranışı ve idamesi üzerine etki eden birçok hücre içi yolak mevcuttur. Özellikle meme kanserlerinde ön planda KKH aktivitesi ile ilişkilendirilen 3 ana yolak Wnt, Notch ve Hedgehog'dur. Ancak bu yollar birbirleri ile etkileşebildiği gibi diğer hücre içi sinyal akış yolları ve molekülleri ile de etkileşime girmektedirler. Bu sinyal yollarından bazıları PI3K/AKT, Ras/Raf/MEK1/ERK, Nükleer Faktör Kappa B (NFkB), TGFβ ve JAK/STAT yollarıdır. Bahsi geçen bu yollardan Wnt yolağının özellikle meme

kanseri KKH aktivitesinin sürdürülmesinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (53, 68). Wnt sinyal yolağı oldukça karmaşık olup hücre yüzeyinde Wnt sinyal iletimi için 19 wnt proteini, yedi protein ailesinden 15'ten fazla reseptör ve ko-reseptör ile eşleşmektedir: Frizzled, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 5 (LRP5) ve LRP6, reseptör tirozin kinaz benzeri yetim reseptör 1 (ROR1) ve ROR2, protein tirozin kinaz 7 (PTK7), reseptör tirozin kinaz (RYK), kas iskelet reseptörü tirozin kinaz (MUSK) ve heparan sülfat proteoglikanlar olan syndecan ve glipikan (69). Bu nedenle klasik ve birkaç adet klasik olmayan yolağa bölünmüş olarak karşımıza çıkmaktadır. Klasik yolak uyarı süreci beta-katenine bağlıdır ve öncelikle Frizzled ve onun ilişkili reseptörü LRP5/6 üzerinden ilerler. Wnt1, Wnt3A, Wnt8 çoğunlukla klasik yolağı uyarırken Wnt5A ve Wnt11 daha çok klasik olmayan yollar ile ilişkilidir (57, 70).

Klasik Wnt yolu ve meme kanseri

Beta-kateninin gastrointestinal ve meme kanserlerinde KKH aktivitesinde, EMT'de ve ilaç direncinde rolü olduğu gösterilmiştir. Meme kanserlerinde KKH aktivitesinde rol alabilen Her2, beta-kateninin hedeflerinden biridir (70). Beta-katenin meme kanserlerinde kötü prognoz ile ilişkilidir ve özellikle üçlü negatif meme kanser hücrelerinde nükleer beta-katenin boyanma oranı çok daha yüksektir (71, 72). Wnt klasik yolağının ER pozitif meme kanser hücrelerinde de aktif olduğu ve KKH aktivitesinde rol aldığı gösterilmiştir (26).

Kanonik olmayan Wnt yolları ve meme kanseri

Meme kanserinde rol oynayan kanonik olmayan bir yolak Wnt-ROR (reseptör tirozin kinaz benzeri yetim reseptör) yolağıdır. ROR1 ifadelenmesi üçlü negatif meme kanserlerinde en yüksektir. ROR1 ve ROR2 proteinlerinin yüksek seviyede bulunması kötü prognoz ile ilişkilidir (73, 74). Ayrıca Wnt-PKA yolağı ve Hedgehog yolları KKH hücrelerinde PI3K/AKT bağlantısı üzerinden GSK3 β (glikoz sentaz kinaz 3 beta) düzeyini baskılamak için etkileşebilirler. GSK3 β düzeyinin baskılanması beta-katenin düzeyini artıracak için KKH aktivitesinde role sahiptir ve özellikle üçlü negatif meme kanser hücrelerinde daha belirgindir (75, 76). Ancak literatürde beta-kateninin hücre içine geçişte Wnt-kalsiyum yolağının önemli rolü gösterilmiş olmasına rağmen (61), Wnt yolağı mekanizmalarına yönelik olarak KKH'leri hedefleyen çalışmalar arasında Wnt-kalsiyum yolağını tek veya kombine şekilde hedefleyen çalışmaya rastlanmamıştır.

Genelde klasik Wnt yolağına yönelik tankiraz inhibitörleri veya özgün beta-katenin inhibitör tedavileri gibi yaklaşımlar mevcuttur. Klasik Wnt yolağı, Frizzled reseptörü üzerinden bloke edildiğinde hücre LRP5/6 reseptörü ifadenmesini artırarak bunu aşabilmektedir. Muhtemelen modelleme zorlukları nedeniyle meme kanseri KKH'leri üzerinde çok fazla kombine inhibitör çalışması bulunmamaktadır. Thapsigargin ile az sayıda meme kanser hücre çalışması olmakla birlikte bunlar KKH'lerine yönelik değildir. Bu nedenle biz çalışmamızda, meme kanseri KKH aktivitesinde önemli rolü olan beta-kateninin, hem klasik yolak üzerinden fosfobeta-katenin olarak üretimini baskılamayı hem de üretilse bile nükleusa geçişini bloke edebilmek stratejisi için Wnt-kalsiyum yolağını baskılamayı planladık. Bu amaçla klasik yolağı baskılayan tankiraz inhibitörü XAV939 ile LRP5/6 reseptörünü bloke eden niklosamid ve endoplazmik kalsiyum salınımını bloke eden thapsigargini ER+ ve üçlü negatif meme kanser hücre hatları üzerinde kombine olarak IC₅₀ düzeyinde uyguladık.

MCF7 hücre hattında ilk 12 saat uygulama sonrasında beta-katenin düzeyinde bazı gruplarda anlamlı düşüş olsa da bütün gruplar kontrole göre 0,75 kat ve üzerinde kalmıştır. Buna karşın 24 saat uygulama sonrasında inhibisyon etkisinin belirginleştiği dikkati çekmektedir. Başta thapsigargin-niklosamid grubu belirgin olmak üzere niklosamid verilen bütün gruplarda beta-katenin düzeyi 24saat uygulama sonrasında 0,3 kat veya altına düşmüştür.

MDA-MB-231 hücre hattında ise ilk 12 saat uygulama sonrasında fosfo beta-katenin düzeyi XAV939-thapsigargin ve thapsigargin-niklosamid gruplarında 0,3 kat ve altına düşerek anlamlı şekilde baskılanmıştır. Dikkat çeken nokta ise 24 saat uygulama sonrasında XAV939-thapsigargin ve XAV939-niklosamid gruplarında belirlenen fosfo beta-katenin düzeyinin 12 saat uygulama sonrasında elde edilen değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde artmış olmasıdır. Bu durumda, kullanılan inhibitörlerin olası antagonistik etkisi olabileceği akla gelmektedir. Thapsigargin-niklosamid grubunda ise beta-katenindeki düşüş sürmüştür ve 0.11 kat düzeyine inmiştir.

Her 2 hücre hattında da XAV939-thapsigargin grubunda 24 saat uygulama sonrasında fosfo beta-katenin düzeyinin 12. Saate göre artmış olması Wnt klasik yolağının yetersiz baskılanması ile açıklanabilir. Olası bir inhibitörler arası antagonistik etki de söz konusu olabilir. Her 2 hücre hattında da thapsigargin-niklosamid grubu 24 saat uygulama

sonrasında fosfo beta-katenin düzeyini etkin şekilde baskılamayı başarmıştır. Bu nedenle sadece XAV939 ile beta-katenin destrüksiyon kompleksi üzerinden gerçekleştirilen klasik Wnt yolağı inhibisyonu beta-katenin düzeyini yeterince baskılayamamaktadır. Buna karşın thapsigargin-niklosamid grubunda her 2 hücre hattında da 24 saat uygulama sonrasında etkili bir beta-katenin düşüşü gözlenmiştir ve bu etkinlik MDA-MB-231 hücre hattında ilk 12 saat içinde de belirgindir. Bu bulgu da literatür ile uyumludur çünkü üçlü negatif meme kanser hücre hatlarının Wnt yolağına daha fazla bağımlı olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir. Bununla ilişkili olarak, MCF7 hücre hattının ilk 12 saat uygulama sonrasında Wnt yolağı inhibisyonuna beta-katenin düşüşünde az cevap vermesi, ER+ olup daha diferansiye bir hücre hattı olması ve Wnt yolağına daha az bağımlı olması özellikleri ile açıklanabilir.

Her 2 hücre hattında da 24 saat uygulama sonrasında en etkili fosfo beta-katenin düşüşü thapsigargin-niklosamid grubunda gözlenmiş olup bu bulgular LRP5/6 reseptörü üzerinden gerçekleşen klasik Wnt yolağı baskılanmasının etkin olduğunu ve Thrasivoulou ve arkadaşları tarafından önerilen (61) Wnt klasik yolağı ile Wnt-kalsiyum yolaklarının sinerjistik etki gösterdiği varsayımı ile de uyumludur.

Axin1 düzeyleri her 2 hücre hattında da kabaca beta-katenin düzeyleri ile paralellik göstermektedir. Axin1 normal şartlarda beta-katenin yıkım kompleksinin bir parçası olduğu için Wnt uyarısı baskılandığında kısmen artması ve beta-kateninin azalması beklenir. Ancak çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda axin1 ve beta katenin ilişkisinin sanıldığı kadar basit olmadığı, Wnt inhibitörlerinin kullanıldığı durumlarda axin1 cevabının değişken olması ve hücre yapısında e-kaderine bağlı olarak da ciddi miktarda hücre içi axin1 bulunması nedeniyle axin1 düzeylerinin her zaman sağlıklı hücrelerdeki gibi bulunamayacağını belirten çalışmalar mevcuttur (77, 78)

Axin2 gen ifadenmesi hücre içine geçen beta-katenin ile uyarılmaktadır. Çeşitli yayınlarda klasik Wnt yolağı baskılanması sonrasında ifadenmenin baskılanma sonrası azalıp, 7 gün veya sonrasında arttığı belirtilmektedir (79). Çalışmamızda her 2 hücre grubunda da 12. ve 24. saatlerde axin2 düzeylerinde inhibisyon gruplarında anlamlı düşüşler gözlemlendi. Genelde literatür ile uyumlu olarak axin2 düzeyleri beta-katenin düşüşü ile paralellik göstermekte idi, anlamlılık düzeyi en yüksek düşüşler thapsigargin-niklosamid gruplarında idi. Ancak MCF7 hücre hattında ilk 12 saatte ciddi düzeyde fosfo

beta-katenin düşüşü olmamasına rağmen axin2 düzeyleri bütün gruplarda 0,2 kat ve altına düşmüş görünmektedir. Bunun dışında MDA-MB-231 hücre hattında XAV939-thapsigargin ve XAV939-niklosamid gruplarında 24 saat uygulama sonrasında fosfo beta-katenin yüksek düzeylerine paralel axin2 düzeyleri bulunması inhibisyon etkisi ile uyumludur.

Hücre kültürlerinde uygulama gruplarında KKH yüzey belirleyiciler için akım sitometri ile CD133⁺ ve CD44⁺ hücreler değerlendirildiğinde MCF7 hücre hattında 12 saat uygulama sonrasında CD133⁺ hücre oranlarına bakıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. Bu durum MCF7 hücre hattında ilk 12 saatte fosfo beta-katenin baskılanmasının çok az olması ile uyumludur. 24 saat uygulama sonrasında ise MCF7 hücre hattında CD133 pozitif hücre oranları bütün gruplarda 12 saat uygulama ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşmüştür (p=0.0001). Bu durum beta-katenin düşüşü ile paralellik göstermektedir ve düşüşler niklosamid verilen gruplarda daha fazladır. Kontrol grubunda da 12 saat uygulama sonrasında CD133⁺ hücre oranının düşmüş olması akla teknik nedenleri getirmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında ise CD133⁺ hücre oranları 12 saat uygulama sonrasında thapsigargin-niklosamid grubunda ciddi anlamlı şekilde düşüş göstermiştir. 24 saat uygulama sonrasında ise bütün inhibisyon gruplarında kontrol grubuna göre ciddi oranda düşme gözlenmiştir. En düşük CD133⁺ hücre oranları %3.9 ile XAV939-thapsigargin-niklosamid grubunda gözlenmiştir. Bu durum yine Wnt yolağının üçlü negatif meme kanserlerinde KKH popülasyonu aktivitesinde daha baskın rolü ile açıklanabilir.

CD44⁺ hücreler açısından bakıldığında MCF7 hücre hattında 12 saat uygulama sonrasında XAV939-thapsigargin-niklosamid grubundaki hafif anlamlı düşme dışında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Anlamlı olmasa da, inhibisyon gruplarının hepsinde kontrol grubuna göre CD44⁺ hücrelerin hafif düşük olması kısmi inhibisyon etkisini vurgulamaktadır. 24 saat uygulama sonrasında ise MCF7 hücre hattında KKH oranları 12 saat uygulamaya göre hafif artmış görünmektedir. Bu durum MCF7 hücre hattının KKH aktivitesi için Wnt yolağına çok bağlı olmaması ve olası başka yolları kullanarak KKH popülasyonunu baskılanmadan kaçırdığını düşündürmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattında ise 12 saat uygulama sonrasında inhibisyon gruplarında CD44⁺ hücreler üzerinde anlamlı bir etki veya düşme gözlenmemiştir. Ancak 24 saat uygulama sonrasında thapsigargin-niklosamid grubunda CD44⁺ hücrelerde ciddi bir düşüş söz konusudur. Bu durum aynı hücre grubunda gözlenen beta-katenin cevabı ile de paralellik göstermektedir. Bu gözlemin en olası nedeni, MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanser hücrelerinde KKH popülasyonunun daha yüksek olması, Wnt yolağına daha fazla bağımlı olması ve baskın olan Wnt yolağının thapsigargin-niklosamid kombinasyonu ile daha etkin şekilde baskılanmış olmasıdır. Bulgularımız, CD44⁺ hücrelerin tedaviye daha dirençli ve muhtemelen CD133⁺ hücrelerden farklı bir grup olduğunu düşündürmektedir. Literatürde de CD44⁺/CD24⁻ KKH'lerin daha dirençli ve saldırgan olduğu vurgulanmaktadır.

Sonuç olarak ER⁺ ve üçlü negatif meme kanser hücre hatları ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak üçlü negatif meme kanser hücrelerinin daha saldırgan yapısını, daha yüksek orandaki KKH varlığını ve bunlara ait moleküler belirteçleri gösterdik. Wnt klasik yolak ile kombine olarak diğer yolakların baskılanmasını gerçekleştirerek MDA-MB-231 hücre hattında özellikle 24. Saat bulgularında KKH popülasyonunun azaltılması yönünde net bulgular elde ettik. Buna karşın MCF7 hücre hattında ilk 12 saat uygulama sonrasında fosfo beta-katenin düzeyinin baskılanamaması ve CD44⁺ hücreler üzerinde etkili ve azaltıcı bir inhibisyon etkisi yaratılamaması nedeniyle bu hücre hattında Wnt yolağının veya yolaklarının çok etkin olmadığına dair kanıtlar elde edilmiştir. Çalışmamızda literatürde ilk defa olarak klasik Wnt yolağı ile birlikte thapsigargin kullanarak meme kanser hücre hatlarında Wnt-kalsiyum yolağı kombine blokajı gerçekleştirilmiştir.

Thapsigargin-niklosamid kombine uygulaması yapılan gruplarda her 2 hücre hattında da beta-katenin ve axin2 24 saat uygulama sonrasında etkin şekilde baskılanmıştır ve MDA-MB-231 hücre hattında hem CD133⁺ hem CD44⁺ hücre popülasyonlarını etkin şekilde baskılayan tek inhibitör kombinasyonu bu gruptur. Çalışmamız daha önce tek bir çalışmada önerilen Wnt klasik yolak ve Wnt-kalsiyum yolağı sinerjisini kanser hücreleri üzerinde test ederek doğrulamıştır. Meme kanseri KKH lerinde XAV939 kullanılarak tankiraz inhibisyonu ile gerçekleştirilen Wnt klasik yolak inhibisyonu kısmen başarılı olsa da KKH popülasyonunu azaltmada etkin olmadığı gösterilmiştir. Niklosamid ile LRP5/6 reseptörü üzerinden gerçekleştirilen Wnt klasik yolak baskılanmasının çok etkili olduğu ve

bunun Wnt-kalsiyum ya da diğer kombinasyonlar ile kullanılmasının üçlü negatif meme kanserlerinde KKH leri azaltmada etkin olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmamızın sonuçları, özellikle dünyada meme kanserleri içinde %12-15 i bulan üçlü negatif meme kanserlerinde hedeflenmiş tedavi gerekliliğini desteklemektedir. Çalışmamızın sonuçlarının önemli bir mortalite sebebi olan meme kanserli hastalar için KKH lerindeki mekanizmaların aydınlatılması ve yeni hedeflenmiş tedavi seçenekleri geliştirilmesi için yol göstereceğini düşünüyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

ER+ ve üçlü negatif meme kanser hücre hatları ile gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak üçlü negatif meme kanser hücrelerinin daha saldırgan yapısını, daha yüksek orandaki KKH varlığını ve bunlara ait moleküler belirteçler gösterilmiştir. Wnt klasik yolak ile kombine olarak diğer yolakların baskılanmasını gerçekleştirerek MDA-MB-231 hücre hattında özellikle 24. Saat bulgularında KKH popülasyonunun azaltılması yönünde net bulgular elde edilmiştir.

MCF7 hücre hattında 12 saat uygulama sonrasında fosfo beta-katenin düzeyinin baskılanamaması ve CD44⁺ hücreler üzerinde etkili ve azaltıcı bir inhibisyon etkisi yaratılamaması nedeniyle bu hücre hattında Wnt yolağının veya yolaklarının çok etkin olmadığına dair kanıtlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda literatürde ilk defa olarak klasik Wnt yolağı ile birlikte thapsigargin kullanarak meme kanser hücre hatlarında Wnt-kalsiyum yolağı kombine blokajı gerçekleştirilmiştir.

Thapsigargin-niklosamid kombine uygulaması yapılan gruplarda her 2 hücre hattında da beta-katenin ve axin2 24 saat uygulama sonrasında etkin şekilde baskılanmıştır ve MDA-MB-231 hücre hattında hem CD133⁺ hem CD44⁺ hücre popülasyonlarını etkin şekilde baskılayan tek inhibitör kombinasyonu bu gruptur.

Çalışmamız daha önce tek bir çalışmada önerilen Wnt klasik yolak ve Wnt-kalsiyum yolağı sinerjisinin varlığını kanser hücreleri üzerinde test ederek doğrulamıştır.

Meme kanseri KKH lerinde XAV939 kullanılarak tankiraz inhibisyonu ile gerçekleştirilen Wnt klasik yolak inhibisyonu kısmen başarılı olsa da KKH popülasyonunu azaltmada etkin olmadığı gösterilmiştir. Niklosamid ile LRP5/6 reseptörü üzerinden gerçekleştirilen Wnt klasik yolak baskılanmasının çok etkili olduğu ve bunun Wnt-kalsiyum ya da diğer kombinasyonlar ile kullanılmasının üçlü negatif meme kanserlerinde KKH leri azaltmada etkin olduğu ortaya konulmuştur.

Bulgularımız, CD44 pozitif hücrelerin tedaviye daha dirençli ve muhtemelen CD133⁺ hücrelerden farklı bir grup olduğunu düşündürmektedir. Literatürde de CD44⁺/CD24⁻ KKH'lerin daha dirençli ve saldırgan olduğu vurgulanmaktadır. Bu nedenle daha selektif olarak, benzer çalışmanın CD44⁺/CD24⁻ ve aynı zamanda ALDH + KKH'lerin kültürden seçilerek hedeflenmiş tedavi yaklaşımının bu hücreler üzerinde denenmesi başarıyı artıracaktır.

Niklosamid antihelmintik bir ilaçtır. LRP5/6 reseptörünü bloke ederek Wnt/beta-katenin uyarısını baskıladığı net olarak bilinse de olası fosforilasyon ayrıştırıcı etkisi ile Notch, STAT3, NF-kB yolları ve GSK3beta ile etkileşerek geniş bir yelpazede etki ediyor olabilir. Bu ayrımı yapabilmek için, modelin genişletilerek daha çok hücre hattında diğer sinyal yollarının ve gen ifadelerinin çalışılması mekanizmanın netleştirilmesi için uygun olacaktır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz Wnt klasik yolak artı Wnt-kalsiyum yolağı kombine blokaj etkisinin *in vitro* ve *in vivo* senkron şekilde test edilerek tedavi etkinliği açısından daha güvenilir veriler elde edilmesi planlanacaktır.

Çalışmamızın sonuçları, özellikle dünyada meme kanserleri içinde %12-15 i bulan üçlü negatif meme kanserlerinde hedeflenmiş tedavi gerekliliğini desteklemektedir. Çalışmamızın sonuçlarının önemli bir mortalite sebebi olan meme kanserli hastalar için KKH aktivitesini belirleyen mekanizmaların aydınlatılması ve yeni hedeflenmiş tedavi seçenekleri geliştirilmesi için yol göstereceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Wörmann B. Breast cancer: basics, screening, diagnostics and treatment. Grundlagen, Früherkennung, Diagnostik und Therapie. *Med Monatsschr Pharm.* 2017;40(2):55- 64.
2. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. El cáncer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. *Radiologia.* 2017;59(5):368- 379. doi:10.1016/j.rx.2017.06.003
3. Lin PC, Hsieh HY, Chu PC, Chen CS. Therapeutic Opportunities of Targeting Histone Deacetylase Isoforms to Eradicate Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1939. Published 2018 Jul 2. doi:10.3390/ijms19071939
4. Zarshenas MM, Mohammadi-Bardbori A. A medieval description of metastatic breast cancer; from Avicenna's view point. *Breast.* 2017 Feb;31:20-21. doi: 10.1016/j.breast.2016.10.019. Epub 2016 Oct 27. PMID: 27810694.
5. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol.* 2010 Jun;4(3):192-208. doi: 10.1016/j.molonc.2010.04.004. Epub 2010 Apr 18. PMID: 20452298; PMCID: PMC5527938.
6. Li J, Chen Z, Su K, Zeng J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jul 1;8(7):8500-5. PMID: 26339424; PMCID: PMC4555752.
7. O'Connor CJ, Chen T, González I, Cao D, Peng Y. Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: a potential target and prognostic marker. *Biomark Med.* 2018 Jul;12(7):813-820. doi: 10.2217/bmm-2017-0398. Epub 2018 Jun 15. PMID: 29902924.
8. Eun K, Ham SW, Kim H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep.* 2017 Mar;50(3):117-125. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.3.222. PMID: 27998397; PMCID: PMC5422023.
9. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003 Oct;36 Suppl 1(Suppl 1):59-72. doi: 10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x. PMID: 14521516; PMCID: PMC6495427.

10. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004 Sep 20;23(43):7274-82. doi: 10.1038/sj.onc.1207947. PMID: 15378087.
11. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-8.
12. Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* 2008;88:459-63.
13. Hardt O, Wild S, Oerlecke I, Hofmann K, Luo S, Wiencek Y, et al. Highly sensitive profiling of CD44(+)/CD24(-) breast cancer stem cells by combining global mRNA amplification and next generation sequencing: Evidence for a hyperactive PI3K pathway. *Cancer Lett* 2012;325:165-74.
14. Wang D, Cai C, Dong X, Yu QC, Zhang XO, Yang L, et al. Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature* 2015;517:81-4.
15. Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* 2011;11:254-67.
16. Olsson E, Honeth G, Bendahl PO, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringner M, et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 2011;11:418.
17. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol* 2011;64:937-46.
18. Hiraga T, Ito S, Nakamura H. EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation. *Int J Cancer* 2016;138:1698-708.
19. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:497-512.
20. Peitzsch C, Tyutyunnykova A, Pantel K, Dubrovska A. Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin Cancer Biol* 2017;44:10-24.
21. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 2013;31:539-44.
22. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol* 2012;22:396-403.

23. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology* 2008;75:75-84.
24. Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2013;1828:1989-2001
25. Jia D, Tan Y, Liu H, Ooi S, Li L, Wright K, et al. Cardamonin reduces chemotherapy enriched breast cancer stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016;7:771-85.
26. Wang N, Wang Z, Peng C, You J, Shen J, Han S, et al. Dietary compound isoliquiritigenin targets GRP78 to chemosensitize breast cancer stem cells via betacatenin/ABCG2 signaling. *Carcinogenesis* 2014;35:2544-54.
27. Saha S, Mukherjee S, Khan P, Kajal K, Mazumdar M, Manna A, et al. Aspirin Suppresses the Acquisition of Chemoresistance in Breast Cancer by Disrupting an NFkappaBIL6 Signaling Axis Responsible for the Generation of Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 2016;76:2000-12.
28. Sims-Mourtada J, Opdenaker LM, Davis J, Arnold KM, Flynn D. Taxane-induced hedgehog signaling is linked to expansion of breast cancer stem-like populations after chemotherapy. *Molecular carcinogenesis* 2015;54:1480-93.
29. Xie Q, Wang S, Zhao Y, Zhang Z, Qin C, Yang X. MiR-519d impedes cisplatinresistance in breast cancer stem cells by down-regulating the expression of MCL-1. *Oncotarget* 2017;8:22003-13.
30. Wang X, Gu J, Zhou M, He Z, Ferrone S. Overexpression of miR-489 enhances efficacy of 5-fluorouracil-based treatment in breast cancer stem cells by targeting XIAP. *Oncotarget* 2017;8:113837-46.
31. Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell* 2012;47:570-84.
32. Achuthan S, Santhoshkumar TR, Prabhakar J, Nair SA, Pillai MR. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2011;286:37813-29.
33. Mukherjee P, Gupta A, Chattopadhyay D, Chatterji U. Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci Rep* 2017;7:9170.

34. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The Response of CD24-/low /CD44+ Breast Cancer–Initiating Cells to Radiation. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2006;98:1777-85.
35. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:618-23
36. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CRJ, Chen ZS. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat* 2015;18:1-17.
37. Dittmer J. Breast cancer stem cells: Features, key drivers and treatment options. *Semin Cancer Biol.* 2018 Dec;53:59-74. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.07.007. Epub 2018 Jul 27. PMID: 30059727.
38. Liang L, Kaufmann AM. The Significance of Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastasis and Anti-Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 29;24(3):2555. doi: 10.3390/ijms24032555. PMID: 36768876; PMCID: PMC9917228.
39. Southam CM, Brunschwig A, Levin AG, Dizon QS. Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer.* 1966 Nov;19(11):1743-53. doi: 10.1002/1097-0142(196611)19:11<1743::aid-cnrcr2820191143>3.0.co;2-u. PMID: 5925282.
40. Brunschwig A, Southam CM, Levin AG. Host resistance to cancer. Clinical experiments by homotransplants, autotransplants and admixture of autologous leucocytes. *Ann Surg.* 1965 Sep;162(3):416-25. doi: 10.1097/00000658-196509000-00011. PMID: 5318670; PMCID: PMC1476908.
41. Hamburger A, Salmon SE. Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest.* 1977 Oct;60(4):846-54. doi: 10.1172/JCI108839. PMID: 302265; PMCID: PMC372433.
42. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):730-7. doi: 10.1038/nm0797-730. PMID: 9212098.
43. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):106-10. doi: 10.1038/nature05372. Epub 2006 Nov 19. PMID: 17122772.

44. Wang RA, Li ZS, Zhang HZ, Zheng PJ, Li QL, Shi JG, Yan QG, Ye J, Wang JB, Guo Y, Huang XF, Yu YH. Invasive cancers are not necessarily from preformed in situ tumours - an alternative way of carcinogenesis from misplaced stem cells. *J Cell Mol Med*. 2013 Jul;17(7):921-6. doi: 10.1111/jcmm.12078. Epub 2013 Jun 7. PMID: 23741988; PMCID: PMC3822897.
45. Fábián Á, Vereb G, Szöllösi J. The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy. *Cytometry A*. 2013 Jan;83(1):62-71. doi: 10.1002/cyto.a.22206. Epub 2012 Sep 20. PMID: 22997049.
46. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007 May 1;67(9):4010-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4180. PMID: 17483311.
47. DA Cruz Paula A, Lopes C. Implications of Different Cancer Stem Cell Phenotypes in Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2017 May;37(5):2173-2183. doi: 10.21873/anticancer.11552. PMID: 28476780.
48. Sharma B, Sharma RP, Prakash R. Enhancement of ethylemethane sulfonate-induced frequency in *Drosophila* by dimethyl sulphoxide. *Experientia*. 1973 Aug 15;29(8):1029-30. doi: 10.1007/BF01930445. PMID: 4354750.
49. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):231. doi: 10.1016/0092-8674(91)90633-a. PMID: 1846319.
50. van 't Veer LJ, van Kessel AG, van Heerikhuizen H, van Ooyen A, Nusse R. Molecular cloning and chromosomal assignment of the human homolog of int-1, a mouse gene implicated in mammary tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 1984 Nov;4(11):2532-4. doi: 10.1128/mcb.4.11.2532-2534.1984. PMID: 6513929; PMCID: PMC369085.
51. Kostriken R, Weisblat DA. Expression of a Wnt gene in embryonic epithelium of the leech. *Dev Biol*. 1992 May;151(1):225-41. doi: 10.1016/0012-1606(92)90229-a. PMID: 1577189.
52. Sidow A. Diversification of the Wnt gene family on the ancestral lineage of vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 1;89(11):5098-102. doi: 10.1073/pnas.89.11.5098. PMID: 1534411; PMCID: PMC49236.

53. Katoh M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *Int J Oncol.* 2017 Nov;51(5):1357-1369. doi: 10.3892/ijo.2017.4129. Epub 2017 Sep 19. PMID: 29048660; PMCID: PMC5642388.
54. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018 Jan;62:50-60. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.002. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29169144; PMCID: PMC5745276.
55. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2017 Mar;36(11):1461-1473. doi: 10.1038/onc.2016.304. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27617575; PMCID: PMC5357762.
56. Gajos-Michniewicz A, Czyz M. WNT Signaling in Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 9;21(14):4852. doi: 10.3390/ijms21144852. PMID: 32659938; PMCID: PMC7402324.
57. MacDonald BT, He X. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Dec 1;4(12):a007880. doi: 10.1101/cshperspect.a007880. PMID: 23209147; PMCID: PMC3504444.
58. Wang Z, Li B, Zhou L, et al. Prodigiosin inhibits Wnt/ β -catenin signaling and exerts anticancer activity in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(46):13150- 13155. doi:10.1073/pnas.1616336113
59. Zeng R, Huang J, Zhong MZ, Li L, Yang G, Liu L, Wu Y, Yao X, Shi J, Wu Z. Multiple Roles of WNT5A in Breast Cancer. *Med Sci Monit.* 2016 Dec 22;22:5058-5067. doi: 10.12659/msm.902022. PMID: 28005837; PMCID: PMC5201118.
60. Fan J, Wei Q, Liao J, Zou Y, Song D, Xiong D, Ma C, Hu X, Qu X, Chen L, Li L, Yu Y, Yu X, Zhang Z, Zhao C, Zeng Z, Zhang R, Yan S, Wu T, Wu X, Shu Y, Lei J, Li Y, Zhang W, Haydon RC, Luu HH, Huang A, He TC, Tang H. Noncanonical Wnt signaling plays an important role in modulating canonical Wnt-regulated stemness, proliferation and terminal differentiation of hepatic progenitors. *Oncotarget.* 2017 Apr 18;8(16):27105-27119. doi: 10.18632/oncotarget.15637. PMID: 28404920; PMCID: PMC5432321.
61. Thrassivoulou C, Millar M, Ahmed A. Activation of intracellular calcium by multiple Wnt ligands and translocation of β -catenin into the nucleus: a convergent model of Wnt/ Ca^{2+} and Wnt/ β -catenin pathways. *J Biol Chem.* 2013 Dec

- 13;288(50):35651-9. doi: 10.1074/jbc.M112.437913. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24158438; PMCID: PMC3861617.
62. Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, Charlat O, Wiellet E, Zhang Y, Wiessner S, Hild M, Shi X, Wilson CJ, Mickanin C, Myer V, Fazal A, Tomlinson R, Serluca F, Shao W, Cheng H, Shultz M, Rau C, Schirle M, Schlegl J, Ghidelli S, Fawell S, Lu C, Curtis D, Kirschner MW, Lengauer C, Finan PM, Tallarico JA, Bouwmeester T, Porter JA, Bauer A, Cong F. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009 Oct 1;461(7264):614-20. doi: 10.1038/nature08356. Epub 2009 Sep 16. PMID: 19759537.
 63. Lu W, Lin C, Roberts MJ, Waud WR, Piazza GA, Li Y. Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *PLoS One*. 2011;6(12):e29290. doi: 10.1371/journal.pone.0029290. Epub 2011 Dec 16. PMID: 22195040; PMCID: PMC3241710.
 64. Fillmore CM, Gupta PB, Rudnick JA, Caballero S, Keller PJ, Lander ES, Kuperwasser C. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 14;107(50):21737-42. doi: 10.1073/pnas.1007863107. Epub 2010 Nov 22. PMID: 21098263; PMCID: PMC3003123.
 65. Kurebayashi J, Koike Y, Ohta Y, Saitoh W, Yamashita T, Kanomata N, Moriya T. Anti-cancer stem cell activity of a hedgehog inhibitor GANT61 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2017 May;108(5):918-930. doi: 10.1111/cas.13205. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28211214; PMCID: PMC5448645.
 66. Toriola AT, Colditz GA. Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138:665-73.
 67. Njor S, Nystrom L, Moss S, Paci E, Broeders M, Segnan N, et al. Breast cancer mortality in mammographic screening in Europe: a review of incidence-based mortality studies. *J Med Screen* 2012;19:33-41
 68. Sulaiman A, McGarry S, Li L, Jia D, Ooi S, Addison C, et al. Dual inhibition of Wnt and Yes-associated protein signaling retards the growth of triple-negative breast cancer in both mesenchymal and epithelial states. *Mol Oncol* 2018;12:423-440

69. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:767-79
70. Schade B, Lesurf R, Sanguin-Gendreau V, Bui T, Deblois G, O'Toole SA, et al. betaCatenin signaling is a critical event in ErbB2-mediated mammary tumor progression. *Cancer Res* 2013;73:4474-87.
71. Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, Arnedos M, Lambros MB, MacKay A, et al. beta-Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Mod Pathol* 2011;24:209-31
72. Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* 2010;176:2911-20
73. Cui B, Zhang S, Chen L, Yu J, Widhopf GF, 2nd, Fecteau JF, et al. Targeting ROR1 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* 2013;73:3649-60.
74. Henry C, Quadir A, Hawkins NJ, Jary E, Llamosas E, Kumar D, et al. Expression of the novel Wnt receptor ROR2 is increased in breast cancer and may regulate both beta-catenin dependent and independent Wnt signalling. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141:243-54
75. Sun Y, Wang Y, Fan C, Gao P, Wang X, Wei G, et al. Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Mol Cancer* 2014;13:137
76. Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2784-9
77. Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJ, Maurice MM, Mahmoudi T, Clevers H. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1245-56. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.002. PMID: 22682247.
78. Chinge NO, Little GH, Baniwal SK, Adisetiyo H, Xie Y, Zhang T, O'Laughlin A, Liu ZY, Ulrich P, Martin A, Mhawech-Fauceglia P, Ellis MJ, Tripathy D, Groshen S, Liang C, Li Z, Schones DE, Frenkel B. RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and β -catenin activation in ER-positive breast cancer. *Nat Commun*. 2016 Feb 26;7:10751. doi: 10.1038/ncomms10751. PMID: 26916619; PMCID: PMC4773428.

79. Leung EY, Askarian-Amiri ME, Sarkar D, Ferraro-Peyret C, Joseph WR, Finlay GJ, Baguley BC. Endocrine Therapy of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells: Early Differential Effects on Stem Cell Markers. *Front Oncol.* 2017 Sep 4;7:184. doi: 10.3389/fonc.2017.00184. PMID: 28929082; PMCID: PMC5591432.

