

T.C.  
NECMETİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BELİNOSTAT'IN (PXD101) MCF-7 MEME KANSERİ KÖK  
HÜCRELERİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeliha TUNCER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman  
Prof. Dr. Ercan Kurar

KONYA-2019

T.C.  
NECMETİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BELİNOSTAT'IN (PXD101) MCF-7 MEME KANSERİ KÖK  
HÜCRELERİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeliha TUNCER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman  
Prof. Dr. Ercan Kurar

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 171318003 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2019

## TEZ ONAY SAYFASI

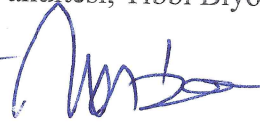
Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi 'Zeliha TUNCER'in "Belinostat'ın (PXD101) MCF-7 Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Etkinliğinin Araştırılması" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.  
Konya, Türkiye / 11.06.2019

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İmzası



Jüri Üyesi

Doç.Dr. H. Gül Dursun

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İmzası



Jüri Üyesi

Prof.Dr. Tülin Çora

Selçuk Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

İmzası



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 12/06/2019 tarih ve 11/06 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

## APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled "Investigation of the Effect of Belinostat (PXD101) on MCF-7 Breast Cancer Stem Cells" by "*Zeliha TUNCER*" that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of "Medical Biology", Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan

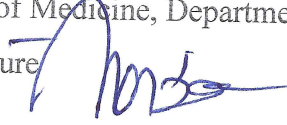
Konya, Türkiye / 11.06.2019

Principal Advisor

Prof. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan University, Meram Faculty of Medicine, Department of Medical Biology

Signature



Examination Committee Member

Doç.Dr. H. Gül DURSUN

Necmettin Erbakan University

Meram Faculty of Medicine

Department of Medical Biology

Signature



Examination Committee Member

Prof.Dr. Tülin ÇORA

Selcuk University

Faculty of Medicine

Department of Medical Genetics

Signature



This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.



Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

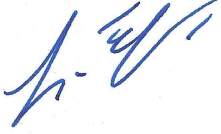
Date and Signature

## BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

22.05.2019.

Zeliha TUNCER



# TURNİTİN RAPORU

Ercan Kurar | Kullanıcı Bilgisi | Mesajlar | Öğretmen | Türkiye | Topluak | Yardım | Çıkış

turnitin

Ödevler Öğrenciler Not Defteri Kütüphaneler Takvimi Tertipna Tercihler

GÖRÜNTÜLENİYOR: ANASAYFA > SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ A.D. > BELİNOSTAT'IN (PXD101) MCF-7 MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

**Bu sayfa hakkında**  
Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

**BELİNOSTAT'IN (PXD101) MCF-7 MEME KANSERİ KÖK HÜCR...**  
GELEN KUTUSU | GÖRÜNTÜLENİYOR: YENİ ÖDEVLER

Dosyayı Gönder

Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

YAZAR	BAŞLIK	BENZERLİK	PUANLA	CEVAP	DOSYA	ÖDEV NUMARASI	TARİH
<input type="checkbox"/>	Zeynep TUNCER	BELİNOSTAT'IN (PXD101) MCF-7 MEME KANSER...	%13	--	--	1134907692	23-May-2019

Prof.Dr. Ercan KURAR  
Danışman Öğretim Üyesi  
N.E.Ü. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli tez danışmanın Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Ercan KURAR'a,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve birikimleri ile desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Hasibe VURAL'a ve Doç.Dr. H. Gül DURSUN'a

Her türlü soruna karşı bana güven ve cesaret veren, tez çalışmalarımın boyunca desteğini esirgemeyen hayattaki en büyük şansım annem Emine TUNCER'e ve sevgili Aileme,

KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekan'ı Prof.Dr. Neyhan ERGENE'ye ve Dekan yardımcısı Prof.Dr. Taner ZIYLAN'a,

Tez çalışmam sırasında deneyimlerinden yararlandığım Ayça EMSEN'e ve Arş.Gör. Tuğçe DURAN'a,

Laboratuvar imkanları ve tez çalışmama katkılarından dolayı Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Tülin ÇORA'ya,

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Arş.Gör. Ebru AVCI'ya, Arş.Gör.Dr. Canan EROĞLU'na ve Arş.Gör.Dr. İlknur ÇINAR'a,

Bu tez çalışmasını destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI .....	ii
APPROVAL .....	iii
TURNİTİN RAPORU .....	v
SİMGE VE KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Meme kanseri .....	3
2.1.1. Meme kanseri risk faktörleri .....	3
2.1.2. Meme kanseri histopatolojisi .....	4
2.1.3. Meme kanserinin evrelendirilmesi .....	6
2.1.4. Meme kanserinin belirtileri.....	6
2.1.5. Meme kanserinin tanısı .....	6
2.1.6. Meme kanserinin tedavisi.....	7
2.2. Belinostat (PXD101).....	9
2.3. Kök hücreler.....	7
2.3.1. Kök hücre tarihçesi .....	10
2.3.2. Kök hücre biyolojisi .....	10
2.3.3. Elde edildikleri kaynak dokuya göre kök hücre çeşitleri .....	13
2.4. Yolaklar.....	21
2.4.1. Wnt sinyal yolağı.....	22
2.4.2. Notch sinyal yolağı.....	24
2.4.3. Hedgehog sinyal yolağı.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve kimyasallar .....	28
3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar .....	28
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler .....	28
3.2. . Hücre kültürü .....	29
3.2.1. . Hücre hattının dondurulması .....	29
3.2.2. . Dondurulmuş hücre hatlarının çözündürülmesi .....	29
3.2.3. Hücre hattının pasajlanması.....	30
3.3. Belinostat stok solüsyonunu hazırlanması .....	30
3.4. Belinostat'ın sitotoksik etkisinin belirlenmesi .....	30
3.5. FACS ile CD44 <sup>+</sup> , CD24 <sup>-</sup> meme kanseri kök hücrelerinin ayrıştırılması.....	31
3.6. Kaspaz-3 aktivitesi analizi .....	32

3.7. Gerçek zamanlı kantitatif PZR analizi .....	33
3.7.1. Total RNA izolasyonu.....	33
3.7.2. cDNA sentezi .....	34
3.7.3. Primer dizaynı .....	34
3.7.4. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR).....	34
3.8. Tümörfaz (Sphere) Oluşumu .....	35
3.9. İstatistik analiz .....	36
4.BULGULAR .....	37
4.1. Hücre Kültürleri.....	37
4.2. Belinostat'ın sitotoksik etkisi .....	37
4.3. Belinostat'ın kanser kök hücre oranı üzerine etkisi .....	38
4.4. Belinostat'ın MCF-7 ve MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinde Kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkisi. ....	38
4.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bulguları .....	38
4.6. Tümörfaz (Sphere) Oluşumu .....	45
5. TARTIŞMA .....	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	54
7. KAYNAKLAR .....	55
8. ÖZGEÇMİŞ .....	67
9. EK.....	68

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABC:</b>	ATP bağlayıcı kaset
<b>ALDH1:</b>	Aldehit dehidrogenaz
<b>AML:</b>	Akut miyeloid lösemi
<b>APC:</b>	Adenomatöz polipozis coli
<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection
<b>BCRP1:</b>	Meme kanseri rezistans proteini
<b>BCSC:</b>	Meme kanseri kök hücreleri
<b>CASP3:</b>	Kaspaz 3, Apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
<b>CD:</b>	Cluster of differentiation
<b>CD133:</b>	Prominin-1
<b>CD49f:</b>	İntegrin alpha 6
<b>CK1:</b>	Kazein kinaz 1
<b>cDNA:</b>	Komplementer deoksiribonükleik asit
<b>DMSO:</b>	Dimetil sülfoksit
<b>Dsh:</b>	Dishevelled
<b>DNMTi:</b>	DNA metiltransferaz inhibitör
<b>DLL4:</b>	Delta benzeri ligandı 4
<b>DCIS:</b>	Ductal karsinom in situ
<b>EGF:</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>EMT:</b>	Epitelyal mezankimal geçiş
<b>ER:</b>	Östrojen reseptörü
<b>FACS:</b>	Fluorescence –activated cell sorting
<b>FDA:</b>	Food and Drug Administration
<b>FGF:</b>	Fibroblast büyüme faktörü
<b>GSI:</b>	Gamma sekretaz inhibitörleri
<b>GSK3:</b>	Glikojen sentaz kinaz3
<b>HATi:</b>	Histon asetiltransferaz inhibitör
<b>HDACi:</b>	Histon deasetilaz inhibitör
<b>HDMi:</b>	Histon demetilaz inhibitör
<b>HER2:</b>	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
<b>Hh:</b>	Hedgehog
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	Öldürücü doz 50

<b>IGF:</b>	İnsülin büyüme faktörü
<b>IVF:</b>	<i>İn vitro</i> fertilizasyon
<b>İPKH:</b>	İndüklenmiş Pluripotent kök hücre
<b>KKH:</b>	Kanser Kök Hücre
<b>KLL:</b>	Kronik lenfositik lösemi
<b>KML:</b>	Kronik miyeloid lösemi
<b>LCIS:</b>	Lobüler karsinom in situ
<b>LRP:</b>	Lipoprotein reseptör ilişkili protein
<b>MAM:</b>	Mastermind
<b>MKC:</b>	Meme koruyucu cerrahi
<b>MR:</b>	Manyetik rezonans görüntüleme
<b>ng:</b>	Nanogram
<b>NICD:</b>	NOTCH intraselüler domain
<b>NKH:</b>	Nöral kök hücreler
<b>NSCLC:</b>	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
<b>NOD/SCID:</b>	Nonobese Diabetic/Severe combined immunodeficiency
<b>PBS:</b>	Fosfat tampon solüsyonu
<b>PR:</b>	Progesteron reseptörü
<b>PZR:</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PXD101:</b>	Belinostat
<b>RPM:</b>	Dakikada devir sayısı
<b>SMO:</b>	Smoothened
<b>SP:</b>	Side popülasyon
<b>TNM:</b>	Tümör-nod-metastaz
<b>TGF-B:</b>	Transforming growth factor beta
<b>US:</b>	Ultrasonografi
<b>WHO:</b>	World Health Organization
<b>WIF1:</b>	WNT inhibitory factor-1
<b>XTT:</b>	23-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Totipotent ve pluripotent kök hücreler .....	12
Şekil 2.2. Multipotent kök hücreler .....	12
Şekil 2.3. Karsinogenez modelleri .....	14
Şekil 2.4. Kanser kök hücre hipotezleri .....	15
Şekil 2.5. Meme Kanseri Kök Hücre (BCSC) model formasyonları .....	19
Şekil 2.6. Wnt/B-katenin Sinyal Yolağı.....	22
Şekil 2.7. Notch Sinyal Yolağı.....	24
Şekil 2.8. Hedgehog Sinyal Yolağı.....	26
Şekil 3.1. Bradford protein standart eğrisi .....	33
Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattı (X10 büyütme).....	37
Şekil 4.2. Belinostat'ın MCF-7 hücre canlılığına etkisi.....	37
Şekil 4.3. Belinostat uygulanmış MCF-7 meme kanseri hücreleri (10X büyütme) .....	38
Şekil 4.4. İnsan Embriyonik böbrek HEK 293 hücre hattı kontrol (X10 büyütme) .....	38
Şekil 4.5. İnsan Embriyonik böbrek HEK-293 hücre hattı doz (X10 büyütme).....	38
Şekil 4.6. FACS Analizi.....	39
Şekil 4.7. Belinostat'ın MCF-7 hücrelerinde Kaspaz -3 aktivitesi üzerine etkisi ..... (*>0,05) .....	40
Şekil 4.8. Belinostat'ın MCF-7 kanser kök hücrelerinde Kaspaz -3 aktivitesi üzerine etkisi (*>0,05) .....	40
Şekil 4.9. RNA örnekleri agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.10. Çalışmada kullanılan genlerin melt analizleri.....	42
Şekil 4.11. Hedgehog yolağında önemli genlerin agaroz jel görüntüsü .....	43
Şekil 4.12. Metastaz, Wnt ve Notch yolağında önemli genlerin agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 4.13. Kök hücre beliteçlerinin genlerin agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 4.14. Apoptoz yolağında önemli genlerin agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 4.15. Belinostat'ın MCF-7 hücreleri gen ifadelerine etkisi .....	44
Şekil 4.16. Belinostat'ın HEK-293 hücreleri gen ifadelerinde etkisi .....	45
Şekil 4.17. Belinostat'ın MCF-7 CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> kök hücreleri gen ifadelerine etkisi	45
Şekil 4.18. Kök hücrelerde tümörfaz oluşumu.....	45

## **TABLÖLAR DİZİNİ**

<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan cihazlar.....	28
<b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri.....	28
<b>Tablo 3.3.</b> Çalışmada kullanılan MCF-7 hücre hattının özellikleri.....	29
<b>Tablo 3.4.</b> Çalışmada kullanılan HEK-293 hücre hattının özellikleri.....	29
<b>Tablo 3.5.</b> Çalışmada kullanılan primer dizileri.....	35

# ÖZET

T.C.  
NECMETİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## BELİNOSTAT'IN (PXD101) MCF-7 MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeliha TUNCER  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2019

Meme kanseri dünya genelinde olduğu gibi Türkiye’de de kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olmaya devam etmektedir. Tümör gelişimi ve metastazından sorumlu olduğu düşünülen ‘kanseri kök hücreleri’ kanser kitlesi içinde bulunan hücre popülasyonudur. Normal kök hücreler gibi kanser kök hücrelerde birçok farklı hücreye farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Kanseri kök hücreleri terapötik direncin gelişiminde rol alan kilit bir mekanizmada önemli rolü bulunmaktadır. Epigenomikteki son gelişmeler, epigenetik düzenlemenin kanser tedavisine katkıda bulunduğu anahtar mekanizmaları aydınlatmıştır. Epigenetik modüle edici ilaçlar, kanser tedavisi için kanser kök hücreleri hedefleyen yeni yaklaşımlar ile umut vaat etmektedir. Belinostat, periferel T hücreli lenfoma tedavisi için FDA tarafından 2014’te onaylanan bir histon deasetilaz inhibitörüdür. Son zamanlarda Belinostat maling ve maling olmayan hastalıkların tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bu yüzden, Belinostat’ın meme kanseri kök hücreleri üzerindeki etkisinin araştırılmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Belinostat’ın MCF-7 kanser hücrelerinde hücre canlılığına etkisi XTT yöntemi ile belirlenmiştir. Belinostat’ın MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi, kaspaz-3 analizi ile belirlenmiştir. Belinostat uygulaması sonrası MCF-7 hücrelerinden FACS yöntemi ile CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> kanser kök hücreler elde edilmiştir. FACS yöntemi ile elde edilen kanser kök hücrelerinin tümörfaz oluşumu incelenmiştir. HEK-293, MCF-7 ve MCF-7 kanser kök hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Apoptoz, Metastaz, Wnt, Hedgehog, Notch ve kök hücre belirteçleri ile ilişkili genlerin ifadesindeki değişiklikler kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR) ile analiz edilmiştir.

Belinostat’ın MCF-7 kanser hücrelerinde IC<sub>50</sub> değeri 48 saat için 5 µM olarak bulunmuştur. Kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. FACS analizi sonuçlarına göre MCF-7 kanser hücrelerinin %2’sinin kanser kök hücre olduğu saptanmıştır ve Belinostat’ın IC<sub>50</sub> değeri muamelesi sonrasında MCF-7 hücre miktarında %44 ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücre miktarında ise %66 oranında azalma gözlenmiştir. Tümörfaz ile kök hücre varlığı doğrulanmıştır. qPZR sonuçlarına göre, Belinostat uygulaması sonrası, MCF-7 kanser kök hücrelerinde Wnt, metastaz, Notch, Hedgehog kendini yenileme yollarında önemli genler ile kök hücre belirteci genlerinde anlamlı azalışa neden olduğu saptanmıştır.

Çalışmadan elde edilen bulgular, Belinostat’ın meme kanseri kök hücrelerinde farklılaşma ve kendini yenileme yolları üzerinden etkili olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Belinostat, FACS, meme kanseri kök hücreleri, Wnt, Notch ve Hedgehog yolağı

## SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

ZELİHA TUNCER

DEPARTMENT OF MEDICAL BIOLOGY  
MASTER THESIS/ KONYA 2019

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BELINOSTAT (PXD101) ON MCF-7 BREAST CANCER STEM CELLS

Breast cancer continues to be the most common type of cancer among women worldwide as well as in Turkey. Cancer stem cells which are thought to be responsible for tumor development and metastasis, are the cell population within the cancer mass. Cancer cells, like normal stem cells, have the ability to differentiate into many different cells. Cancer stem cells have a key mechanism of therapeutic resistance. Recent developments in epigenomics have highlighted key mechanisms in which epigenetic regulation contributes to cancer treatment. Epigenetic modulating drugs promises novel approaches targeting cancer stem cells for cancer treatment. Belinostat is a histone deacetylase inhibitor approved by the FDA in 2014 for the treatment of peripheral T-cell lymphoma. Recently, Belinostat has been widely used in maling and non-maling diseases. Therefore, it is thought that investigating the effect of Belinostat on breast cancer stem cells will contribute to the literature.

The effect of Belinostat on cell viability in MCF-7 cancer cells was determined by XTT method. Caspase-3 activity in MCF-7 cells of Belinostat was determined by the Caspase-3 assay kit. After Belinostat application, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> MCF-7 cancer stem cells were isolated from by FACS method. Tumor sphere formation were examined using the cancer stem cells obtained by the FACS method. RNA isolation and cDNA synthesis were performed from HEK-293, MCF-7 and MCF-7 cancer stem cells. Changes in expression of genes associated with apoptosis, metastasis, Wnt, Hedgehog, Notch, and stem cell markers were analyzed by quantitative real-time PCR (qPZR).

The IC<sub>50</sub> value of Belinostat in MCF-7 cancer cells was found to be 5 µM for 48 hours. No significant change in caspase-3 activity was detected. According to FACS analysis, 2% of MCF-7 cancer cells were found to be cancer stem cells and after treatment of the IC<sub>50</sub> value of Belinostat. MCF-7 cell count was decreased by %44 and MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> stem cell count was decreased by %66. Stem cells presence were confirmed by tumor sphere assay. According to the qPZR results, it was found that in the gene expression of apoptosis, metastasis, Wnt, Notch, Hedgehog, stem cell marker genes were downregulated in general after Belinostat application.

According to the results of this study Belinostat is effective in differentiation and self- renewal of breast cancer stem cells.

**Keywords:** Belinostat, FACS, breast cancer stem cell line, Wnt, Notch and Hedgehog signaling pathway

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Proliferasyon, farklılaşma ve normal hücrelerin sağkalımı çok hücreli organizmalarda özenli bir şekilde düzenlenmektedir. Bu düzenleme kanser hücrelerinde kaybolmuştur. Kanser hücrelerin anormal farklılaşması ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize bir hastalıktır.

Kanser, ölüm nedeni olarak dünya genelinde ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO; World Health Organization) raporuna göre, 2015 yılında kanserden dolayı ölüm 8.8 milyon olarak hesaplanmıştır. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanserleri erkeklerde görülen en yaygın kanser çeşitleridir. Meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanserleri kadınlarda daha yaygındır.

Artan kanser insidansı kanser tedavilerine yeni yaklaşımların oluşturulması gereğini doğurmuştur. Bu doğrultuda yapılan çalışmalardan elde edilen veriler kanserin kök hücre özelliği taşıyan bir grup hücre tarafından oluşturulduğunu göstermiştir (Dick 2009).

Kanser kök hücrelerinin (KKH) sitotoksik ajanlara ve radyasyona karşı bir direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu direncin DNA hasarını tanıma ve onarma kabiliyetindeki artış, apoptotik yollardaki aktivite azlığı, kemoterapötik ajanların hem hücre içerisine alınmasındaki yetersizlik hem de bu ajanların hücre dışına atılımındaki artışa bağlı olabileceği gösterilmiştir (Gottesman ve ark. 2002).

Normal kök hücreler ve KKH'leri kendini yenileme, farklılaşabilme, belirli sinyal yollarından etkilenme (Wnt, Notch vb.), telomeraz enzim aktivitesi, DNA onarım mekanizması, apoptoza direnç ve ABC taşıyıcı proteinler sayesinde kemoterapötiklere direnç gibi benzer özelliklere sahiptir (Liu ve ark. 2004). Ayrıca kanser kök hücreleri hücre yüzey belirteçleri, embriyonik sinyal yolları ve detoksifikasyon enzim sistemlerine sahiptir (Spillane ve Henderson 2007).

Kansere karşı kullanılan tedavi yöntemlerinde tümörün küçültülmesi amaçlanmaktadır. Fakat tümörün devamlılığını sağlayan kanser kök hücreleri yok edilmediği sürece kanser kendini tekrarlayabilmektedir. Dolayısıyla, kanser kök hücrelerini hedefleyen yeni tedaviler geliştirilmesinin kritik önemi bulunmaktadır (Koren ve Fuchs 2016; Li ve ark. 2017).

Kanser kök hücre tedavileri; kanser kök hücre yüzey belirteçlerinin spesifik

antikorlar ile hedeflenmesini, kemoterapi ve radyoterapiye direnç sağlayan yolların engellenmesini, kendini yenilemede görevli sinyal yollarının bloklanmasını içermektedir. Kanser kök hücre tedavisinde Wnt, Hedgehog ve Notch kendini-yenileme sinyal yollarının monoklonal antikorlar bloklanması ile ilgili çalışmalar örnek olarak verilebilir (Colvin ve Mori 2017).

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanserdir (Li ve ark. 2017). Meme kanserinin tedavisinde yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine rağmen, metastaz, ilaç direnci ve nüksetme önemli problemler arasında yer almaktadır. Dolayısıyla, meme kanseri kök hücrelerini hedefleyen tedaviler ile meme kanserinin, tekrarlanmasını ve metastazını engellenebileceği düşünülmektedir (Dandawate ve ark. 2016).

Histon deasetilazlar fizyolojik olarak gen ifadesinin epigenetik düzenlenmesinde önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Histon deasetilaz inhibitörleri ise histon ve histon olmayan proteinlerin asetilasyonunu değiştirir. Farklı yollarda gen ifadesi değişimi ile hücre yaşamı, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi hücresel olayları düzenleme ve antikanser aktivite etkileri görülmüştür (Manal ve ark. 2016). Histon deasetilaz inhibitörleri potansiyel antikanser ilaç olarak nitelendirilmektedir (Manal ve ark. 2016).

Belinostat, bir histon deasetilaz inhibitörüdür. Periferik T hücreli lenfoma tedavisi için FDA tarafından 2014'te onaylanmıştır (Campbell ve Thomas 2017). Belinostat'ın non-hodgkin lenfoma ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisi ile aynı zamanda sarkoma tedavisinde doxorubicin ile kombine kullanımının antikanser etkinliği tespit edilmiştir. Belinostat ve diğer histon deasetilazların kanser ve malign olmayan hastalıklarla ilgili klinik çalışmaları genişleyerek devam etmektedir (Apuri ve Sokol 2016; Ong ve ark. 2016; Vitfell ve Rasmussen 2016). Ancak, bu etkilerinin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına konusunda detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Kanseri

Kanser dünyada kardiovasküler hastalıklardan sonra en sık ölüm nedeni olmaya devam eden major sağlık sorunlarından biridir. Meme kanseri ise dünyada en yaygın ikinci kanser türüdür. Kadınlarda en sık rastlanan kanser türü meme kanseridir. Globocan 2012 verilerine göre tüm kanser teşhislerinin %25'ini oluşturur. 2018 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tahmini meme kanseri vakası %30, tahmini ölüm ise %14 olarak hesaplanmıştır (Siegel ve ark. 2018).

Sağlık Bakanlığı Türkiye Kanser İstatistiklerine göre tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen kanser %24.9 ile meme kanseridir ve 2017 yılında 16.646 kadına meme kanseri teşhisi konulmuştur (www.saglik.gov.tr).

#### 2.1.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

##### *Ailede Meme Kanseri Hikayesi*

Aile hikayesinde özellikle birinci derecede (ebeveyn yada kardeş) meme kanseri olan kadınlarda meme kanserine yakalanma riski, ailesinde meme kanseri vakası olmayanlara göre daha yüksektir. Eğer bireye genç yaşta meme kanseri teşhisi konulmuş veya iki memede de kanser varsa birinci derece akrabalarında meme kanserine yakalanma riski daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012).

##### *Genetik yatkınlık*

Çok sayıda çalışmaya konu olan meme kanseri genleri BRCA1 ve BRCA2 meme kanseri geninde gerçekleşen kalıtsal mutasyon (genetik değişiklik) tüm kadın meme kanserlerinin %5-10'unu ve erkek meme kanserlerinin %5-20'sini ve ailesel meme kanserlerinin ise %15-20'sini oluşturur (Tung ve ark. 2016). Bu mutasyonlar genel popülasyonda nadirdir. Daha sık olarak etnik ve coğrafi olarak izole edilmiş gruplarda örneğin Ashkenazi Yahudilerinde (Doğu Avrupa) daha fazladır (Gabai-Kapara ve ark. 2014).

##### *Menstruasyon Döngüsü*

Meme kanseri riski erken menstruasyon ve geç menopoza ilişkili olarak artmaktadır. Meme kanseri riskini menstruasyon için her erken yıl %5, menopoza için her geciken yıl ise %3 arttırmaktadır (Beral ve ark. 2004).

### *Hamilelik*

Otuz beş yaş öncesi ilk gebelik ve fazla sayıda çocuğa sahip olmak meme kanseri riskini azaltmaktadır (Lambertini ve ark. 2016).

### *Emzirme*

Emzirme süresinin bir yıl veya daha fazla olması meme kanseri riskini azaltmaktadır (Faupel-Badger ve ark. 2013).

### *Hormonal Doğum Kontrolü*

Oral kontraseptiflerin kullanımı meme kanser riskinde küçük bir artış meydana getirir ve kullanımı kesildiği zaman bu risk ortadan kaybolmaktadır (Bassuk ve ark. 2015).

### *Postmenopoze Hormon Tedavisi*

Menopoz sonrası yapılan hormon tedavilerinde uzun süreli ve aralıksız hormon kullanımının meme kanseri riskini arttırdığı gözlenmektedir (Chlebowski ve ark. 2013).

### *Obezite, Fiziksel Aktivite ve Diyet*

Obezitenin özellikle menopoz sonrası alınan kiloların meme kanseri riskinde artışa neden olduğu gözlenmektedir (La Vecchia ve ark. 2011). Düzenli fiziksel aktivite yapan kadınların yapmayanlara göre meme kanseri riskinin %10-20 daha düşük olduğu gözlenmiştir (Pizot ve ark. 2016). Meyve ve sebze tüketiminin artmasına bağlı olarak meme kanseri riskinin azaldığına dair giderek artan kanıtlar bulunmaktadır (Farvid ve ark. 2016). Karotenoidlerin kandaki seviyesinin artışına bağlı olarak meme kanserinin azaldığına dair aktif çalışmalar devam etmektedir (Bakker ve ark. 2009).

### *Alkol Tüketimi*

Alkol tüketiminin östrojen ve androjen düzeylerini artırması dolayısıyla meme kanseri riskini arttırdığı gözlenmiştir (Liu ve ark. 2015).

### *Radyasyon*

Göğüs bölgesinde radyasyon maruziyeti meme kanseri riskini artırmaktadır (Preston ve ark. 2002)

### *2.1.2. Meme Kanseri Histopatolojisi*

Meme karsinomları histolojik olarak *in situ* ve invaziv olmak üzere iki gruba ayrılır. Ductal karsinom *in situ* (DCIS) ve lobüler karsinom *in situ* (LCIS) olmak üzere iki ana tip *in situ* meme kanseri vardır. DCIS karsinoma memenin

duktuslarından kaynaklanır ve bazal membranı aşmamış kanserlerdir. LCIS ise memenin lobüllerlerinin içinde büyüyen ve invaziv kanser geliştirmek için güçlü bir risk taşımaktadır (Allred 2010).

Meme kanserlerinin %80'i invazivdir ve bazal membranı aşarak memenin dokularına yayılma özelliğindedir. İnvaziv karsinom; tubular karsinom, ductal lobüler karsinom, invaziv lobüler karsinom, infiltratif duktal karsinom, müsinöz karsinom, medüller karsinom ve infiltratif lobüler olarak sınıflandırılmıştır (Malhotra ve ark. 2010).

Gen ifadesi profileme teknikleri meme kanserinin moleküler alt tiplerinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Dört ana moleküler alt tip rutin olarak değerlendirilen biyolojik belirteçler olarak; hormon (östrojen veya progesteron) reseptörlerinin varlığı veya yokluğu (HR+/HR-), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin aşırı seviyeleri (HER2, büyüme destekleyici protein), ve HER2 geninin kopyaları (HER2+/HER2-) kullanılması ile belirlenmiştir (Cheang ve ark. 2015).

#### *Luminal A (HR +/HER2-) (%71)*

Bu kanserler diğer alt tiplere göre yavaş büyür ve daha az agresiftir. Luminal A tümörleri, anti-hormon tedavisine daha duyarlı oldukları için kısa vadede en iyi prognoz ile ilişkilidir (Haque ve ark. 2012).

#### *Üçlü negatif (HR-/HER2-) (%12)*

Östrojen reseptörü (ER-), Progesteron reseptörü (PR-) ve (HER2-) olduğu için üçlü negatif olarak adlandırılır. Üçlü negatif meme kanseri kısmen bu tümörler için hedeflenmiş tedaviler olmadığı için diğer alt tiplere göre daha kötü bir prognoza sahiptirler (Bianchini ve ark. 2016).

#### *Luminal B (HR+/HER2+) (%12)*

Luminal A kanserlerinde olduğu gibi Luminal B kanserleri de ER+'dir. Fakat Ki67 (proliferasyon biyobelirteci) ve HER2 açısından son derece pozitif olarak tanımlanır. Luminal A kanserlerine göre daha kötü sağkalım ile ilişkilidir (Haque ve ark. 2012).

#### *HER2 pozitif (HR-/HER2+) (%5)*

HER2 pozitif kanserler, diğer alt tiplerden daha agresif olarak büyür ve yayılır. HR+ kanserlere kıyasla daha kısa vadede prognoz ile ilişkilidir (Haque ve ark. 2012).

### *2.1.3. Meme kanserinin evrelendirilmesi*

Kanserde TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. Tümörlerin TNM evreleme sistemi; tümörün boyutu, tümörün meme içinde ve bitişik dokulara ne dereceye kadar yayıldığını (T), yakındaki lenf nodlarına yayılım derecesini (N), uzak metastazların varlığı ve yokluğunu (M) içermektedir (Amin ve ark. 2017).

T, N ve M evreleri belirlendikten sonra 0, I, II, III, ve IV evreleri belirlenmektedir. Evre 0 in situ'de (invaziv olmayan) anormal hücreler duktus bazal membrane içerisinde. Evre I erken evre invaziv kanserdir ve evre IV'e kadar artış olabilmektedir. Evre IV hastalığın en ileri aşamasıdır (Giuliano ve ark. 2017).

### *2.1.4. Meme kanserinin belirtileri*

Meme kanserinin en yaygın semptomu memede ele gelen kitledir. Memenin tamamı veya bir kısmında şişkinlik, meme derisinde iritasyon, çukurlanma, yara veya kızarıklık, memede ağrı, memebaşından içe doğru geri çekilme, memebaşı derisinde soyulma ve kabuklanma, memebaşından akıntı gelmesi, memede büyüme, şekil ve renkte asimetri oluşumu meme kanserinin belirtileridir (Feizi ve ark. 2018).

### *2.1.5. Meme kanserinin tanısı*

Meme kanserinin mümkün olduğunca erken tanısı, tedavi için başarı şansını arttırmaktadır. Meme kanseri tanısında sıklıkla kullanılan üç yöntem vardır. Bunlar; kendi kendine muayene, görüntüleme yöntemleri ve biyopsi yöntemleridir.

#### *2.1.5.1. Kendi kendine muayene*

Tanının ilk adımını kendi kendine muayene oluşturmaktadır. Her kadın 20 yaşından itibaren kendini ayda bir kez adet başlangıcından 5-7 gün sonra hormon etkisinin en az olduğu dönemde muayene etmelidir. Memelerin simetrik olup olmadığı kontrol edilir. Meme derisinde ve meme başında değişiklik ve ele gelen kitlenin olup olmadığına bakılır.

#### *2.1.5.2. Görüntüleme yöntemleri*

##### *Mamografi*

Tanı yöntemleri arasında meme kanserini en erken saptayabilen ve memenin görüntülenmesi sağlayan en temel yöntemdir. Mamografi memenin görüntü dedektörü ve kompresyon plakası arasında sıkıştırılıp X ışını verilmesi ile memenin önden ve yandan iki farklı görüntüsü alınmasıdır. Herhangi bir belirti olmasa bile 40 yaşın üzerinde tüm kadınların mamografik tarama yaptırılmaları önerilmektedir.

Standart mamografi yanında dijital mamografi yöntemi de kullanılmaktadır. Digital mamaografi de ise görüntü üç boyutlu şekilde dijital ortama kayıt olmaktadır (Souza ve ark. 2013).

#### *Ultrasonografi (US)*

Ses dalgaları ile görüntü elde edilmesidir. Memenin üzerine jel sürülmesi ve US aparatının meme üzerinde gezdirilmesi ile oluşan görüntüleri kayıt etme işlemini içermektedir. Genellikle meme dokusu yoğun olan kadınlarda mamografide meme dokusu tarafından kapatılan ve saptanamayan kanserleri görüntülemek için kullanılmaktadır (Melnikov ve ark. 2016).

#### *Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR)*

Manyetik Rezonans manyetik alan içerisinde radyofrekans dalgaları ile görüntü elde edilmesidir. Hastanın hareketsiz şekilde cihazın içine yatması gerekmektedir. Nörosütümülator, kalp pili olanlar için önerilmeyen bir yöntemdir. MR sırasında kullanılan Gadolinum maddesi tümör dokusunu daha iyi boyadığı için kanser ayrımı kolaylaştırma açısından iyi bir yöntemdir (Haas ve ark. 2016).

#### *2.1.5.3. Biyopsi*

İğne biyopsilerigörüntüleme yöntemleri ile birlikte meme kanseripataloji örneklerinin alınması ve tanısı koymak için kullanılan bir yöntemdir. İnce iğne aspirasyon biyopsileri ise memede şüpheli bölgeden ince bir iğne ile kistlerin boşaltılmasını içermektedir (Chen ve ark. 2016).

#### *2.1.6. Meme Kanseri Tedavisi*

Meme kanserinin tedavi kararı hastanın yaşı, menopoz durumu, kanserin evresi ve biyolojik özellikleri ile risk ve faydalar göz önüne alındıktan sonra hasta ve hekim tarafından birlikte yapılır. Meme kanseri tedavisi cerrahi tedavi yanında rekürrens riskini azaltmak için radyasyon terapisi, kemoterapi, hormonal tedavi ve hedefe yönelik tedaviyi kapsamaktadır (Hwang ve ark. 2013).

#### *Cerrahi*

Meme kanseri cerrahisinin temel amacı kanserin giderilmesi ve evresinin belirlenmesidir. Cerrahi tedavi, meme koruyucu cerrahi (MKC) ve mastektomi içerir.

#### *Radyasyon Tedavisi*

Radyasyon tedavisi kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili ışınların kullanılmasıdır. Genellikle göğüs duvarı, meme veya koltuk altına ameliyat sonrası

uygulanır. Meme kanseri tekrarlama riskini azalttığı için meme koruyucu cerrahi (MKC) genellikle radyoterapi ile birlikte yapılmaktadır (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)).

### *Kemoterapi*

Kemoterapi bir veya birden fazla anti-kanser ilacı kullanımını gerektiren bir kanser tedavi çeşididir. Kemoterapinin yararı tümörün boyutu, lenf düğümlerinin sayısı, östrojen veya progesterone reseptörlerinin varlığı ve kanser hücrelerinde HER2'nin aşırı ifadesi dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır (Carey ve ark. 2007). Kombinasyon şeklinde verilen ilaçların tek başına verilen ilaçlara göre daha etkili olduğu bilinmektedir. Kemoterapi 3-6 aylık toplam süreye sahiptir.

### *Hedefe Yönelik Terapi*

Son zamanlarda meme kanser tedavisinde hedefe yönelik tedaviler başta HER-2 pozitif meme kanseri olmak üzere kullanılmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %17'sinde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) HER2'nin aşırı üretilmesine neden olmaktadır. Trastuzumab, HER2 proteinini doğrudan hedefleyen ilk onaylanmış monoklonal antikordur. Erken evre HER2+ meme kanseri için standart kemoterapiye Trastuzumab eklenmesi ile sağkalımda artış gözlenmiştir (Romond ve ark. 2005).

### *Hormon Tedavisi*

Yumutalıkların ürettiği bir hormon olan östrojen, HR+ meme kanserlerinin büyümesini teşvik eder. Bu tümörlere sahip olan hastalara östrojen seviyelerini düşürmek ve östrojenin meme kanseri hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkilerini bloke etmek için hormon tedavisi uygulanır. Meme kanseri için hormon tedavisi premenopozal ve postmenopozal kadınlarda farklı olabilir (Mirkin 2018).

Tamoksifen, meme kanseri hücrelerinin yüzeyindeki östrojen reseptörlerini baskılayacak şekilde tasarlanmış kemoterapik bir ilaçtır. Tamoksifen östrojenin reseptöre bağlanmasını engeller ve meme kanseri hücrelerinin büyümesini durdurur. Tamoksifen erken ve ileri HR+ meme kanserini premenopozal ve postmenopozal kadınlarda tedavi etmek için kullanılır. Erken evre HR+ meme kanserinin en az 5 yıl boyunca tamoksifen tedavisinin nüks oranını yaklaşık %40 azalttığı gösterilmiştir Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).

Aromataz inhibitörleri meme kanserinde kullanılan bir hormon tedavisidir. Aromataz inhibitörleri östrojen üretimini durdurur ve tümörlerin östrojen tarafından büyümesini engeller (Burstein ve ark. 2014).

## 2.2. Belinostat (PXD101)

Son on yıl içinde, epigenetik ilaçlar kanser tedavisi için yoğun olarak kullanılmaktadır. DNMTi (DNA metiltransferaz inhibitör); HATi (Histone asetiltransferaz inhibitör); HDACi (Histone deasetilaz inhibitör) ve HDMi (Histone demetilaz inhibitör) antikanser tedavisinde kullanılan epigenetik ilaçlardır (Kejık ve ark. 2017).

Yaygın olarak kullanılan sitostatikler ile HDACi'lerin kullanımları terapötik etkinliği önemli ölçüde artırmaktadır. HDACi'lerin sitostatik etkiler üzerindeki etkisi apoptotik sinyalin artırılması, tümörjenik ve proangiogenik faktörlerin ekspresyonunun azalması ve DNA tamir sistemlerinin baskılanması gibi farklı mekanizmaların kombinasyonu olarak etki göstermektedir (McLaughlin ve La Thangue 2004).

HDACi'lerin en önemli tarafı ilaç direncini düşürmesidir (Bamodu ve ark. 2018). Histonların N-terminal uçlarında lizinlerden asetil gruplarının uzaklaştırılması, kromatin yoğunlaşmasına ve transkripsiyonel baskılanmaya neden olur. Bu nedenle HDACi'lerin uygulanması daha açık bir kromatin yapısı meydana getirir ve DNA'yı hedefleyen kemoterapötik ajanların erişebilirliğini artırır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, özellikle kanser tedavisinde bu yaklaşımın büyük potansiyeli olduğunu göstermektedir (Dovzhanskiy ve 2012).

Belinostat (ticari ismi Beleodaq ve PXD101 olarak bilinir) bir histone deasetilaz inhibitörüdür. Belinostat sınıf I ve II HDAC'leri baskılayan bir hidroksamattır.  $C_{15}H_{14}N_2O_4S$  moleküler formülüne sahiptir. Belinostat H4'de asetilasyonu artırmaktadır (Ong ve ark. 2016). Topo Target tarafından hematolojik malignite ve solid tümör tedavisinde kullanılmak için geliştirilmiştir. Periferik T hücreli lenfoma tedavisi için FDA tarafından 2014'te onaylanmıştır (Campbell ve Thomas 2017). Histone deasetilaz inhibitörleri antikanser amaçlı hematolojik kanserlerde kullanılmaya başlanmıştır. Belinostat'ın non-hodgkin lenfoma (Apuri ve Sokol 2016) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC; Ong ve ark. 2016) tedavisi ile aynı zamanda sarkoma tedavisinde doxorubicin ile kombine kullanımının (Vitfell-Rasmussen ve ark. 2016) antikanser etkinliği tespit edilmiştir. Belinostat ve diğer histone deasetilazların kanser ve malign olmayan hastalıklarla ilgili klinik çalışmaları genişleyerek devam etmektedir. Örneğin, nörolojik dejeneratif,

inflamasyon ve kardiovasküler hastalıklarda Belinostat'ın kullanılabilirliği ve etkinliği konusunda çalışmalar devam etmektedir (Yoon ve Eom 2016).

### 2.3. Kök Hücreler

#### 2.3.1. Kök Hücre Tarihçesi

Kök hücre terimi 1960'lı yıllarda Kanadalı bilim adamı Ernest McCulloch ve James Till'in kemik iliğindeki bir grup hücrenin kan hücrelerini oluşturduğunu gösteren çalışmaları ile ilk kez terminolojiye kazandırılmıştır (Sharkis 2005). Kemik iliğinin kan ve immun hücrelerini oluşturma özelliğinin keşfinden sonra 1968'de Robert A. Good bağışıklık eksikliği olan çocuga sağlıklı kardeşinden kemik iliği naklini gerçekleştirmiş ve başarılı olmuştur (Starzl 2007).

1981'de Martin Evans, Matt Kaufman ve Gail Martin fare blastositlerin iç hücre kitlelerinden (ICM) izole ettikleri pluripotent hücreleri fare embriyonik kök hücreleri olarak adlandırmışlardır (Smith 2010). 1992 yılında ilk kez Dr. David Harris tarafından kordon kanı elde edilip dondurulmuş ve 1994 yılında Amerika Birleşik Devletlerin'de ilk kordon kanı bankası kurulmuştur (Karagöz 2007). 1992 yılında Nöral kök hücreler (NKH) elde edilmiş ve çoğaltılması için nöroküre kültür sistemi kullanılmıştır (Rietze ve Reynolds 2006).

1996 yılında Wilmut ve ark. tarafından memeli epitel hücreden klonlanmış olan ilk memeli Dolly'nin doğumu rapor edilmiştir (Wilmut ve ark. 2007). 1998'de James Thomson ise IVF (in vitro fertilizasyon) yöntemi ile elde edilen embriyolardan insan embriyonik kök hücreleri keşfedilmiştir (Thomson ve ark. 1998).

Geçmişten bugüne kök hücre çalışmaları iki aşamada ilerlemiştir; ilk aşama embriyonik kök hücre çalışmaları, ikinci aşama ise somatik hücrelerin yeniden programlanması ile elde edilen kök hücre çalışmalarıdır (Yamanaka 2013).

Somatik hücreler retroviral gen aktarım metodu kullanılarak transkripsiyon faktörleri ile (Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) yeniden programlanması sonucu indüklenmiş pluripotent kök hücreye (İPKH) dönüştürülmüştür (Takahashi ve Yamanaka 2006).

#### 2.3.2. Kök Hücre Biyolojisi

Kök hücrelerin özellikleri pluripotensi (stemness), kendini yenileyebilme (self-renewal) ve farklılaşabilme yeteneği olmak üzere 3 ana başlık altında toplanabilir (Spillane ve Henderson 2007).

Pluripotensi kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliktir. Organizmadaki kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi birbirinden farklıdır ve farklılaşma kapasitesi iç ve dış etkenler ile programlanmaktadır. Dış etkenler hücrenin diğer hücrelerin salgıladığı parakrin moleküller, diğer hücrelerin salgıladığı otokrin faktörler, reseptörlerin ligandları ile etkileşimi ve hücre içi yolları içermektedir. İç etkenler ise farklılaşmadan sorumlu Nanog, Oct-4 ve Sox-2 transkripsiyon faktörlerini içermektedir (Boyer ve ark. 2005).

Kendini yenileme (self-renewal) kök hücrelerin gerektiğinde sayılarını korumak için çoğalmalarıdır. Kök hücrelerin kendini yenileme yetkinliği farklılaşma ile zıt çalışır yani farklılaşma arttıkça bölünme kabiliyeti azalır (Karaşahin 2012).

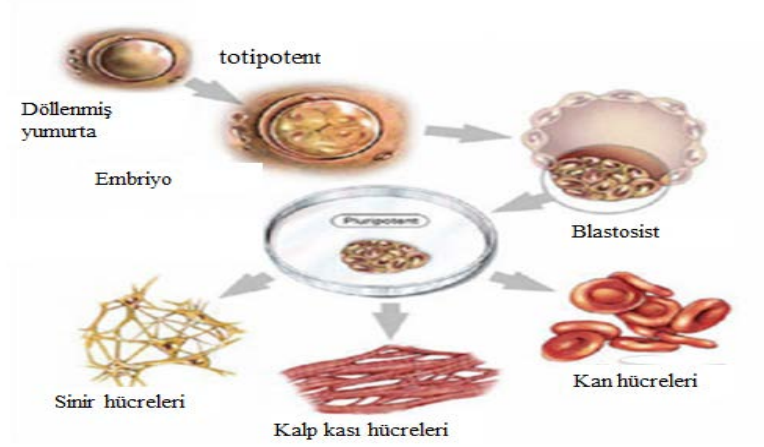
Farklılaşma (plastisite) kök hücrelerin sinir, kalp, kas gibi birden fazla hücre tipini oluşturabilmesidir. Farklılaşma biyokimyasal ve fenotipik işlemler bütünüdür. Kök hücrenin kök hücre veya farklılaşmış bir hücre olmasına ise epigenetik mekanizmalar karar verir (Lister ve ark. 2011). Farklılaşma kapasitesine göre kök hücreler totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve multipotent olmak üzere 3 gruba ayrılırlar.

#### *2.3.2.1. Totipotent Kök Hücreler*

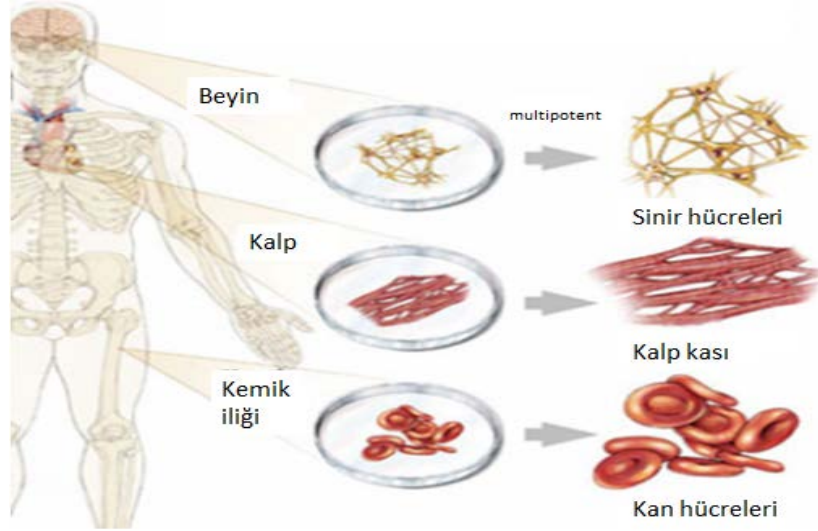
Zigot oluşumundan blastosist aşamasına kadar olan sürede (erken embriyonik dönem) embriyonun farklılaşmamış ve sınırsız çoğalabilme yeteneğine sahip kök hücreleridir. Vücuttaki her hücre tipine dönüşebilme özelliğine sahiplerdir (Şekil 2.1). Embriyo, embriyo sonrası bütün dokuları, embriyo dışı plasenta ve amniotik membran gibi yapıları oluşturur (Avcılar ve ark. 2018).

#### *2.3.2.2. Pluripotent Kök Hücreler*

Fertilizasyon sonrası 5. güne kadar blastula aşamasında hücreler totipotent özelliktedir. Beşinci günden itibaren hücreler farklılaşmaya başlayarak blastosist olarak adlandırılan küresel şekil haline gelirler. Blastosist içerisindeki hücreler pluripotent özelliktedirler ve tüm organizmayı oluşturabilecek kapasiteye sahip değillerdir fakat yaklaşık 200 hücre çeşidine farklılaşabilirler (Şekil 2.1). Blastosist iç hücre kütleleri embriyonik kök hücre kaynağıdır ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakalarının kökenini oluşturmaktadır (Kolios ve Moodley 2013).



Şekil 2.1. Totipotent ve pluripotent kök hücreler (<https://www.hucreler.gen.tr/pluripotent-kok-hucre.html>)



Şekil 2.2. Multipotent kök hücreler ([http://www.fibiler.com/Multipotent-Kok-Hucre\\_Materyal\\_13699](http://www.fibiler.com/Multipotent-Kok-Hucre_Materyal_13699))

### 2.3.2.3. Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler embiyonik gelişimin ilerleyen safhalarındaki sadece bulunduğu doku ve organdaki hücre tiplerine farklılaşabilen ve kendini yenileme özelliği olan erişkin kök hücrelerdir. Multipotent kök hücreler kemik iliği, sinir, deri gibi dokularda bulunur (Şekil 2.2) ve hasar gören doku ver organların yenilenmesini sağlar (Bieback ve ark. 2004). Kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreler kan hücrelerini (trombosit, lökosit, eritrosit) oluşturan mutipotent kök hücrelerdir.

Tek bir hücre serisine farklılaşabilen kendini yenileme özelliği olan hücreler ise unipotent kök hücrelerdir. Hücreler gelişim aşaması ilerledikçe farklılaşma özelliklerini kaybederler. Kas kök hücreleri multipotent kök hücrelere örnektir ve sadece olgun kas hücrelerine dönüşebilirler (Çetin ve Oral 2010).

### 2.3.3. Elde Edildikleri Kaynak Dokuya Göre Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynak dokuya göre embriyonik kök hücre, fetal kök hücre, erişkin kök hücre ve kanser kök hücre olmak üzere 4 gruba ayrılırlar.

#### 2.3.3.1. Embriyonik Kök Hücreler

Blastosist aşamasında iç hücre kitlesinde bulunan pluripotent karaktere sahip üç germ tabakasından köken alan hücrelere farklılaşabilme özelliğinde olan hücrelerdir (Kirschstein 2001). Blastosist iç hücre kütesinden elde edilen pluripotent kök hücreler yüksek telomeraz aktivitesi göstermektedir ve çok hızlı çoğalma kapasitesine sahiptir (Keller ve Snodgrass 1999).

İnsan embriyonik kök hücreleri yüzey antijeni alkalen fosfataz proteini ve aynı zamanda farklılaşmamış kök hücre belirteci olan (Oct-4, Sox-2, Klf-4 ve Nanog) transkripsiyon faktörlerini ifade etmektedir (Marks ve ark. 2012). Embriyonik kök hücreler uygun besi ve kültür ortamlarında istenilen yönde farklılaştırılarak tedavide kullanılmaktadır fakat blastosiste yapılan müdahalelerden dolayı etik, dini ve politik tartışmalar ortaya çıkarmıştır (Yao ve ark. 2006).

#### 2.3.3.2. Fetal Kök Hücreler

Fetal kök hücreler, abortus veya gebeliğe son verilen durumlarda elde edilen fetüsten izole edilmektedir. Embriyonik kök hücrelere oranla daha yavaş çoğalmaktadır fakat pluripotent özelliğinden dolayı bilimsel çalışmalarda embriyonik kök hücrelere alternatif olmaktadır (Stewart ve ark. 2006).

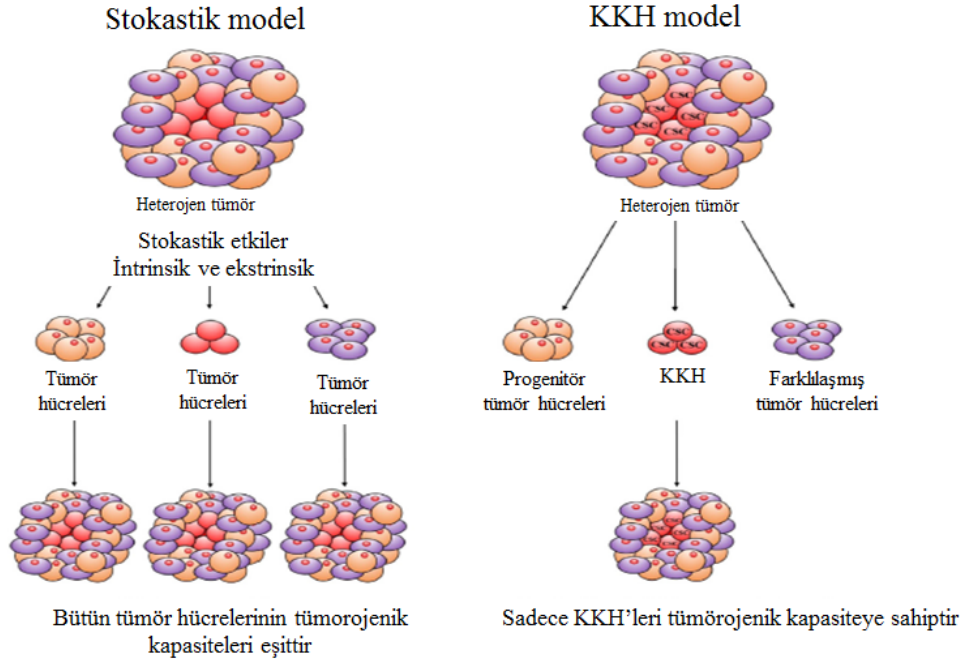
#### 2.3.3.3. Erişkin Kök Hücreler

Gelişmekte olan organizmaların organ ve dokularında gerektiği zaman kendini çoğaltabilen ve farklılaşabilen hücreler yetişkin kök hücre olarak adlandırılmaktadır. Embriyonik kök hücreye kıyasla daha yavaş çoğalma ve farklılaşma kapasitesi vardır. Erişkin kök hücreler buldukları doku ve organlarda hasar meydana geldiğinde yeni hücrelere farklılaşarak hasarı onarırlar. Hematopoetik ve mezankimal kök hücreler erişkin kök hücrelerdir. Erişkin kök hücreler deri, kas, sinir, karaciğer gibi dokularda bulunabilirler (Can 2014).

#### 2.3.3.4. Kanser Kök Hücreler

Tümör progresyonu ve heterojenliğini anlamak için Stokastik (Klonal evrim) ve KKH (hierarchy) modelleri (Şekil 2.3) kullanılmaktadır (Plaks ve ark. 2015). Stokastik modele göre tümörlerin ekstrinsik ve intrinsik (stokastik) faktörlerden

dolayı eşit tümörogenik potansiyele sahip biyolojik olarak eşdeğer hücrelerden oluştuğuna inanılmaktadır (Nguyen ve ark. 2012). KKH teorisine göre ise tümörde sadece subpopülasyon olarak bulunan KKH'leri tümörü başlatma ve sürdürme özelliğine sahiptir (Dick 2009).



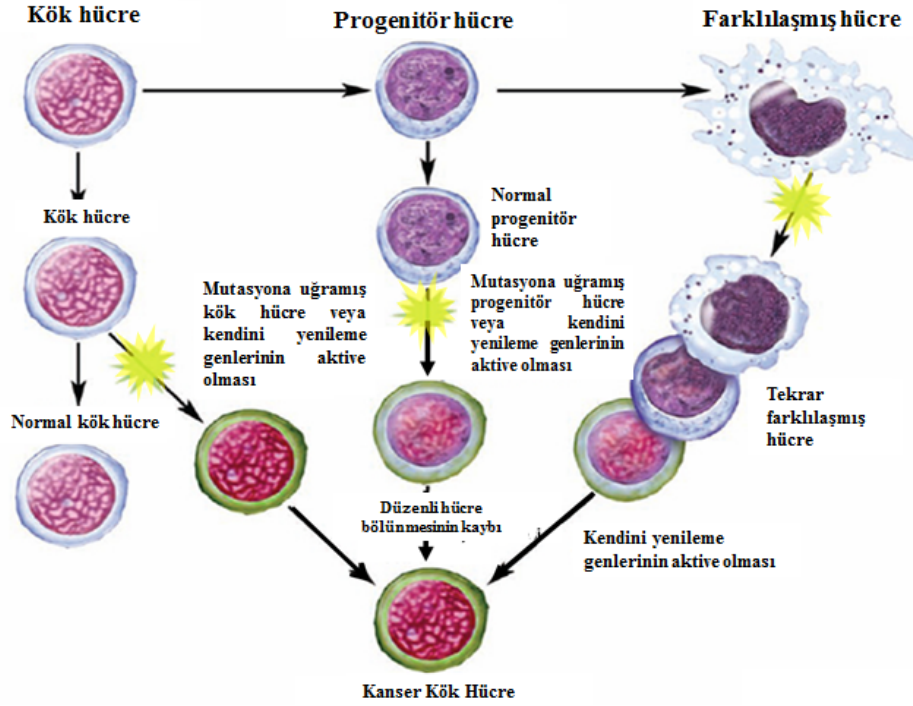
Şekil 2.3. Karsinogenez modelleri (Koren ve Fuchs 2016)

KKH modeline kanıt olarak 1990'larda Bonnet ve Dick, akut miyeloid lösemi (AML) hastalarından alınan örneklerden akım sitometri (FACS) ile izole edilen  $CD34^+/CD38^-$  lösemi KKH'leri immunosüpresif (NOD/SCID) farelere aşılanmış ve farelerde lösemi geliştiği gözlenmiştir. AML tümör hücrelerinden tümör oluşturabilme, kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme yeteneğine sahip kan kök hücrelerine benzeyen sadece belli bir alt gruptan yani KKH'lerden kaynaklandığı gösterilmiştir (Hope ve ark. 2004).

KKH'lerin solid tümörlerde varlığı ise meme kanseri çalışmalarında gösterilmiştir FACS yöntemi ile insan meme kanseri hücrelerinden izole edilen  $CD44^+/CD24^-$  hücrelerinin immunosüpresif farelere enjeksiyonu sonucu tümör oluşumu gözlenmiştir (Al-Haji ve ark. 2003).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda birçok solid tümörde KKH varlığı tespit gösterilmiştir. İnsan beyin tümörlerinde  $CD133^+$  KKH altpopülasyonu tanımlanmıştır (Singh ve ark. 2004). Daha sonra  $CD44^{+/\alpha2\beta1hi}/CD133^+$  fenotipinde prostat kanser kök hücreleri tanımlanmıştır (Collins ve ark. 2005). O'Brien ve ark.. (2007)

kolon kanseri kök hücrelerini tanımlamış ve izole etmişlerdir. Karaciğer, akciğer, deri ve baş boyun kanserlerinde de kanser kök hücreler tanımlanmıştır (Herman ve ark. 2010).



Şekil 2.4. Kanser kök hücreleri hipotezleri (Goldthwaite, 2011)

Tümör hücreleri ve kök hücreler arasındaki benzerlikler göz önüne alındığında KKH'lerin kök hücrelerden, progenitor hücrelerden veya farklılaşmış hücrelerden kaynaklandığına dair üç hipotez ileri sürülmüştür (Şekil 2.4; Goldthwaite, 2011).

#### 1. Hipotez: Kanser kök hücreleri kök hücrelerden kaynaklanır

Kanser kök hücreleri ve normal kök hücrelerin kendini yenileme, farklı hücre tiplerine farklılaşabilme, belli sinyal yollarını kullanabilme, aktif DNA onarım mekanizmasına sahip olma gibi birçok ortak özelliğinin olması kanser kök hücrelerinin normal kök hücrelerden kaynaklandığını desteklemektedir. Normal kök hücrelerin progenitor ve farklılaşmış hücrelere kıyasla uzun yaşam süresine sahip olması tümör oluşumu ve metastaz yapabilmeyi sağladığı düşünülmektedir (Allan ve ark. 2007).

KKH'lerinin hematopoetik kök hücrelerden kaynaklandığını göstermek amacıyla Akut miyeloid lösemi hastalarından elde edilen KKH'ler farelere verilerek lösemi oluşumu gözlenmiştir. Lösemiye neden olan hücrelerin özellikleri KKH'lerinin normal kök hücrelerden kaynaklandığı hipotezini güçlendirmektedir

(Hope ve ark. 2004).

2. *Hipotez: Kanser kök hücreleri progenitor hücrelerden kaynaklanır*

Kök hücreler diğer hücelere farklılaşma sürecinin arasında progenitör hücelere dönüşmektedir. Progenitör hüceler kısmen farklılaşmış fakat kendini yenileme kapasitesine sahiptir. Kök hücelere kıyasla dokularda daha fazla bulunmasından dolayı KKH'lerin kaynağı olabileceği düşünülmektedir (Kucia ve Ratajczak 2006).

3. *Hipotez: Kanser kök hücreleri farklılaşmış hücrelerden kaynaklanır*

Farklılaşmış hücelerde meydana gelen mutasyonlar ile hüceler yeniden programlanarak (dediferansiyasyon) geriye doğru farklılaşma geçirmekte ve kendini yenileme özelliğini kazanmaktadır (Takahashi ve ark. 2007). Böylece dokularda bulunan farklılaşmış hücelerin kanser kök hücre oluşturma potansiyeline sahip olma olasılığı ortaya çıkmaktadır. Hüceleri yeniden programlayacak mekanizmalar henüz açıklanmamıştır (Yu ve ark. 2007).

2.3.3.5. *Kanser Kök Hücrelerinde Tedaviye Direnç*

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılar hücreden toksik kimyasalları dışarı atma yetenekleri sayesinde çoklu ilaç direncinin (MDR)'nin gelişimde önemli rol oynamaktadır (Lobo ve ark. 2007). ABC taşıyıcı proteinleri 49 membran proteini olan bir aileye aittir. Bileşiklerin ve küçük moleküllerin ATP hidrolizi kullanılarak hücre dışı ortama taşınmasını sağlamaktadır. Kanser Kök Hücreler hücre yüzeyinde çok sayıda ABC proteinleri ifade ederler (DeGorter ve ark. 2012). ABCB1 (MDR1 veya P-gp), ABCG2 meme kanseri rezistans proteini (BCRP1), çoklu ilaç direnci ilişkili proteinler (MRP)'ler ABC taşıyıcılarının en önemli üyeleridir. Sağlıklı dokuların yanı sıra birçok kanser dokusunda eksprese olmaktadır ve ilaçları kanser hücrelerinden dışarı atarak kemoterapinin başarısız olmasına yol açmaktadır. ABC taşıyıcı proteinler antikanser ilaçlara karşı direnç oluşturmalarından dolayı klinik açıdan önem arz etmektedir (Chuthapisith ve ark. 2009).

Kanser Kök Hücreler DNA hasarı ve mutasyonlara karşı yüksek aktivitede tamir mekanizmalarına sahiptir. Kemoterapi ve radyoterapiye karşı hızlı bir şekilde hasarı onarabilmektedirler. Güçlü tamir mekanizmalarının yanında KKH'ler apoptoz mekanizmalarına karşı direnç göstermektedir (Raha ve ark. 2014). Tümör mikroçevresinde KKH'lerin tedaviye direnci için katkı sağlamaktadır. Tümör mikroçevrede Wnt sinyal yolağı kanser kök hücelerin hayatta kalmalarını sağlamaktadır (Sun ve ark. 2012).

### 2.3.3.6. Kanser kök hücreleri izole etmede kullanılan günümüz metodları

#### *Aldefluor testi*

ALDEFLUOR testi kök hücre farklılaşması aşamasında retinol'ün retinoik asit'e oksidasyonu sağlayan ve hücre içi aldehytlerin oksidasyonundan sorumlu enziminin (ALDH) aktivitesine dayanmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ALDEFLUOR testi başlangıçta lösemide ALDH1A1 aktivitesini göstermek için tasarlanmış daha sonra çeşitli kanserlerde ALDH izoformlarının aktivitesi tespit edilmiştir. ADEFLUOR testi normal ve KKH'ler için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Zhou ve ark. 2018). Meme tümörlerinden izole edilen ALDEFLUOR<sup>+</sup> hücrelerin kanser ilerlemesinin nedeni olarak kabul edilen KKH'leri içerdiği gösterilmiştir (Ginestier ve ark. 2007).

#### *Yan popülasyon tekniği*

Yan popülasyon (SP) fenotipi ABC transportlarının Hoechst 3342 floresan boyayı, hücre dışına pompalaması ve KKH'nin bu boyayı içine alma kapasitesinin düşüklüğünden kaynaklanmaktadır. Hoechst 3342 boyasını içine alamayan hücreler akım sitometride izole edilmektedir. Yan popülasyon hücreleri kök hücre özellikleri sergilemektedirler (Boesch ve ark. 2016).

#### *Küre (sphere) kültürü*

Farklılaşmış hücrelerin ölmesine, kök hücre ve progenitor hücrelerin FBS'siz epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin (IGF) ve fibroblast büyüme faktörü içeren (FGF) besiyeri ortamında hayatta kalmalarına olanak sağlayan tekniktir. Ortak bir hücreden köken alınarak hücre kolonileri (küre) oluşturulmaktadır (Alison ve ark. 2011). Bu kürelerin spesifik kanser kök hücre yüzey belirteçleri bakımından zengin olduğu gösterilmiştir (Hwang ve ark. 2009).

#### *Kanser kök hücre yüzey belirteçleri kullanılarak ayırıştırma*

Kanser kök hücre yüzey belirteçlerine spesifik antikolar ile işaretlendikten sonra akım sitometri (FACS) tekniği ile ayırıştırma yapılmaktadır (Wu ve ark. 2011). Sitometri hücre veya partiküllerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinin ölçülmesidir. Akım sitometri ise akmakta olan bir akışkanın içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesidir. Flow sitometri veya akım sitometri olarak adlandırılmaktadır (Villas 1998).

Akım sitometri cihazı akış sistemi, ışık kaynağı, filtre ve sinyal dedektörleri, ayırma mekanizması, bilgisayar ve yazılım programından oluşmaktadır. Akım sitometri tekniği ile hücreler sıvının içerisinde akış sisteminin içerisinde tek tek

geçerler ve hücrelerin lazer önünden geçerken verdiği sinyaller analiz ve grafik haline getirilir (Dunphy 2004).

Akım sitometri yöntemi sıklıkla immüfenotipleme, hücre döngüsünün incelenmesi, hücre canlılık analizi ve mikrobiyolojide kullanılmaktadır (Matteucci ve Giampietro 2008). İmmüfenotipleme monoklonal antikörlerin geliştirilmesiyle birlikte yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır. Özgül antikörler ile antijenik yapıların varlığı ya da yokluğu tespit edilmektedir. Tıpta, lenfoma ve lösemi immünotiplemesi, immün yetmezliklerin teşhisi, otoimmün hastalık teşhisi, alerjik hastalıklarda ve hematolojik hastalıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Van Lochem ve ark. 2004). Akım sitometri ile hücrelerin ne kadarının hangi bölünme fazında olduğu saptanabilmektedir ve hücre döngüsü analizi yapılmaktadır (Martiez ve ark. 1990). Akım sitometride hücre canlılık analizi Annexin V ile yapılabilmektedir (Diaz ve ark. 2008). Mikrobiyolojide ise flow sitometri yöntemi ile mikroorganizmaların sayısı, canlılığı veya antibiyotik duyarlılığı saptanabilmektedir (Winson ve Davey 2000).

Akım sitometri yöntemi hızlıdır ve saniyede binlerce hücre test edebilecek potansiyele sahiptir. Akım sitometrinin en önemli avantajı hücrelerin fiziksel olarak birbirinden ayrılabilmesine imkan vermesidir böylece spesifik hücrelerin saf örnekleri ile ileri analizler yapılabilir. Kurulum maliyetleri yüksek olması akım sitometriye dezavantaj olarak kabul edilmektedir.

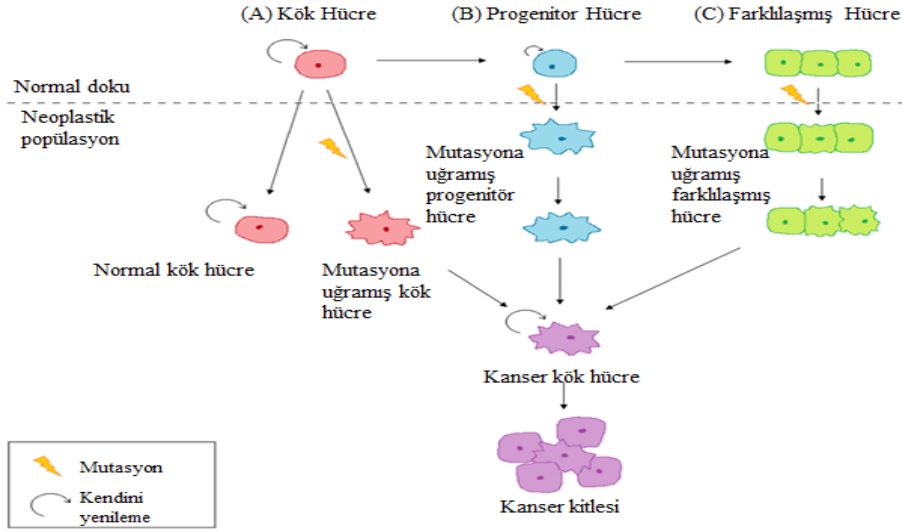
#### 2.3.3.7. Meme kanseri kök hücrelerinin özellikleri

Meme kanseri taramalarında ve tedavi stratejilerinde gelişmeler tümörün eradikasyonuna katkıda bulunmaktadır ve meme kanseri hastaları için sağkalım artmaktadır (Siegel ve ark. 2016). Ancak mevcut müdahalelere rağmen remisyon altındaki hastalarda hala meme kanseri nüks ve metastazı gelişmektedir (Zielske ve ark. 2011).

Farklılaşmamış hücrelerin küçük bir alt popülasyonunun varlığı (BCSC), meme kanseri kök hücreleri olarak adlandırılan, geleneksel tedavide tümör ilerlemesine, yayılmasına ve direncine neden olmaktadır. Meme kanseri tedavisi için uygun stratejiler geliştirilmesi ve hedefe yönelik tedavinin belirlenmesi için BCSC'lerin kökeni ve belirteçleri araştırılmaktadır (Lin ve ark. 2012).

BCSC'lerin kökeni araştırmacılar arasında tartışmalara neden olmuştur. Mevcut deneysel kanıtlar BCSC'lerin kökeninin kök hücreler, progenitor hücreler

veya farklılaşmış hücreler (Şekil 2.5) olabileceği ile ilgili farklı teoriler önermiştir (Bao ve ark. 2015).



Şekil 2.5. Meme Kanseri Kök Hücre (BCSC) model formasyonları (Sin ve Lim 2017)

Model 1: BCSC'ler memeli kök hücrelerden kaynaklanmaktadır. Kök hücrelerin durgun fazında iken birçok etkili mutasyonların meydana gelmesi ile onkojenik transformasyonu başlatması ile kanser kök hücre meydana gelir. Model 2: BCSC'ler memeli progenitor hücreden kaynaklanır. Progenitor hücrede meydana gelen mutasyonların birikimi maligniteyi başlatmaktadır. Model 3: BCSC'ler farklılaşmış memeli hücrelerden kaynaklanmaktadır. Farklılaşmış hücre mutasyon sonucu kök hücre özelliği kazanmaktadır. BCSC'lerin oluşumu ile ilgili farklı teoriler olmasına rağmen henüz somut bir kanıt yoktur (Sin ve Lim 2017).

#### BCSC'ler için biyobelirteçler

Kanser kök hücreleri ayırtmak ve karakterize etmek kansere karşı etkili tedavi sağlamak için önem arz etmektedir. Kanser kök hücreleri ayırtmada biyobelirteçler kullanılmaktadır. BCSC'lerin karakterizasyonu ve izolasyonu BCSC'lerin biyolojisinin anlaşılmasına katkıda bulunur. Biyobelirteçler meme kanserinde yeni terapötik hedeflerin keşfini mümkün kılmaktadır. BCSC'leri tanımlamak için kullanılan en yaygın biyobelirteçler CD44, CD24 ve ALDH1'dir. Daha az bilinen biyobelirteçler CD133, CD49f, ve CD61'dir (de Beça ve ark. 2012).

**CD44:** CD44 Adezyon, hücre içi sinyalizasyon, tumor anjiyogenezi, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon ve invazyonu sağlayan hücre yüzeyinde

bulunan bir transmembran glikoproteindir (Lagadec ve ark. 2013). BCSC'lerde CD44 yüksek oranda ifade edilir. CD44 çoğu kanserde olduğu gibi BCSC'lerde de yüksek ifade edilir. CD44 tümörögenezive multipotensiyi sürdürmede rol almaktadır (Van Phuc ve ark. 2011). CD44 hücre invazivliği ve metastazı kolaylaştırmak için hyaluronic asit ile etkileşebilmektedir (Okuda ve ark. 2012). CD44 meme, mide, kolon, karaciğer, baş-boyun, ovaryum, pankreas ve prostat kanseri kök hücrelerinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Fabian ve ark. 2013). CD44 yüksek ifade olmasından dolayı meme kanseri tedavilerinde potansiyel hedef molekül olarak kabul edilmektedir (Goodarzi ve ark. 2014).

*CD24*: CD24 adezyonu artıran, tümör metaztasını teşvik eden ve çoğalmayı sağlayan hücre yüzey glikoproteinidir (Schabath 2006). BCSC'lerde CD24 düşük seviyede ifade edilmektedir. Buna karşılık CD24'ün yüksek ifade olması durumunda ise meme kanserinin stemness özelliğinin azaldığı gözlenmektedir (Schabath ve ark. 2006).

*ALDH1*: Adehit dehidrogenaz (ALDH) hücre içi aldehitlerin oksidasyonunu katalize eden ve retinolün retinoik asitlere dönüşmesini sağlayan detoksifiye bir enzimdir. Kök hücre farklılaşmasında görev almaktadır. ALDH1'in aşırı ifade edilmesiyle ile kemoterapotik ajanlara direnç sağlanmaktadır. Kanser kök hücreleri ilaç dışlama kapasitlerinin yanında ALDH1 ifadesi ile de kemoterapotik ilaçları inaktif hale getirebilmektedir (Moreb ve ark. 2012).

*CD133* (prominin 1): transmembran glikoproteindir. Üçlü negatif meme kanseri ve BRCA-1 tümörlerinde bulunmaktadır. Kanser hücrelerinde fonksiyonu henüz bilinmemektedir. Fakat kolesterol ile etkileştiği böylece Hedgehog sinyalinde görev alarak hücre farklılaşması ve epitelyal mezankimal geçişi düzenlediği düşünülmektedir (Wright ve ark. 2008).

*CD49f* ve *CD61*: Meme kanserinde tümör başlatma özelliğine sahiptirler (Lo ve ark. 2012).

#### 2.3.3.8. Meme kanseri kök hücre metaztası

Kök Hücrelerin kendini yenileyebilme, çoğalma ve göç gibi özelliklerini devam ettirebilmesi için mikro çevre (niş) önemli bir rol üstlenmektedir. KKH'ler de kök hücre özelliklerini devam ettirebilmesi için mikro çevreden gelen sinyaller önemli rol üstlenmektedir (Sipkins ve ark. 2005).

KKH'ler özel bir niş ortamına gerek duymaksızın diğer kök hücre nişleri

içerisinde kendini yenileyebilir, kemoterapiye direnç gösterebilir ve yaşamını sürdürebilir. KKH'ler niş ortamını kendine göre düzenleyerek değiştirebilir (Lane ve ark. 2009).

Metastaz, tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılmasını uzak bir yere göç etmesini gerektiren kompleks ve çok aşamalı bir süreçtir. Kanıtlar metastazın KKH'leri tarafından başlatıldığını ileri sürmektedir (Oskarsson ve ark. 2014). Periostin, KKH ve metastatik niş arasındaki ilişkiyi düzenleyen bir stroma proteindir. Tümör hücrelerinin uzak dokulara metastazı için periostin ifadesinin artması gerekmektedir. Periostin metastaz için düzenleyici bir proteindir ve periostin sentezinin durdurulması ile metastaz engellenebileceği ileri sürülmektedir (Malanchi ve ark. 2011). CXCL12 kemokini CXCR4 reseptörü ile tümör hareketliğini tetikler ve metastatik yayılımı sağlarlar. CXCR4 ifade eden kanser hücreleri CXCL12 ifadesi fazla olan dokulara metastaz yaparlar (Smith ve ark. 2004).

## 2.4. Sinyal yolları

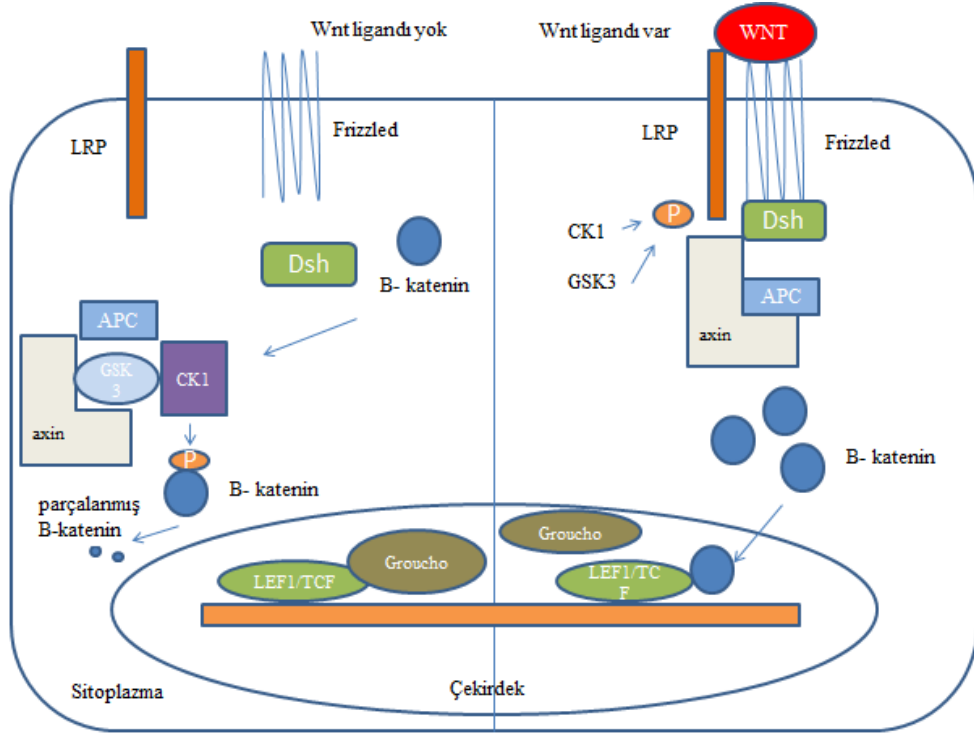
### 2.4.1. Wnt sinyal yolağı

Wnt geni ilk olarak fare meme tümör çalışmalarında 'Int-1' olarak adlandırılan bir protoonkogen olarak keşfedilmiştir (Nusse ve Varmus 1982). Daha sonra *Drosophila*'da bulunan 'wingless' geninin 'Int-1' geni ile homolog olduğu bulunmuş ve iki gen ismi birleştirilerek Wnt olarak literatüre geçmiştir (Nusse ve ark. 1991). İnsanda 19 adet wnt geni bulunmaktadır ve evrimsel açıdan oldukça korunmuştur. Wnt sinyal yolağı hem embriyonik hem de ergin dönemde görev almaktadır. Wnt sinyal yolu hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre düzenlenmesinde önemli rol oynar (Nusse 2005).

Organizmalarda Wnt/ $\beta$ -katenin, Wnt/Planar (PCP), Wnt/ $Ca^{+2}$  olmak üzere üç adet Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır. Wnt/Planar hücre polaritesinin düzenlenmesinde, Wnt/ $Ca^{+2}$  ise hücre içindeki  $Ca^{+2}$  metabolizmasının düzenlenmesinde görev alır. Bu iki yol kanonik olmayan  $\beta$ -kateninden bağımsız sinyal yolları olarak adlandırılır. Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı ise kanonikal yolak olarak adlandırılmaktadır (Van Amerongen ve Nusse 2009).

Kanser ve birçok hastalıkla en çok ilişkilendirilmiş ve mekanizması en fazla aydınlatılan yol Wnt/ $\beta$ -katenin yolağıdır. Şekil 2.6 Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının mekanizmasını göstermektedir. Wnt ligandı yokluğunda sitoplazmik  $\beta$ -katenin yıkım kompleksi tarafından  $\beta$ -katenin çekirdekten uzak tutularak parçalanmaktadır. Yıkım

kompleksi kazein kinaz (CK1), glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), axin ve adenomatöz polipozis coli (APC)'den oluşmaktadır. APC ve axin yıkım kompleksini bir arada tutan yapısal proteinlerdir. CK1 ve GSK3,  $\beta$ -katenini serin ve treonin rezidülerinden fosforilasyonu sağlar ve proteozomlar tarafından parçalanmaya hazırlar (Kimelman ve Xu 2006).  $\beta$ -katenin parçalanması ile çekirdeğe giremez ve Wnt genlerinin transkripsiyonu baskılanmış olur (Miller 2002).



Şekil 2.6. Wnt/B-katenin Sinyal Yolağı (Can 2014)

Wnt ligandının hücre zarında bulunan Frizzled ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) reseptörlerine bağlanması ile sinyalizasyon başlar (Teo ve Kahn 2010). Dsh (Dishevelled) aracılığıyla CK1 ve GSK3 LRP'yi fosforile eder ve bu fosforilasyon parçalama APC, CK1, GSK3 ve axinden oluşan parçalama kompleksini dağıtır. Böylece  $\beta$ -katenin sitoplazmada birikir ve çekirdeğe girmeye başlar. Çekirdeğe giren  $\beta$ -katenin transkripsiyon LEF1/TCF transkripsiyon faktörüne bağlanır, baskılayıcı protein olan Groucho'yu uzaklaştırır ve Wnt hedef genleri transkribe olur (Komiya ve Habas 2008).

#### *Kanser ve kanser kök hücrelerinde wnt sinyal yolağının rolü*

Kök hücreler kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerini sürdürebilmek için birçok sinyal yolağı kullanır. Bu yolaklardan birisi olan Wnt/ $\beta$ -katenin sıkı bir kontrol altındadır. Bu yolağın anormal aktivasyonunda ise kök veya öncü hücreler

çoğalmakta ve karsinogenez başlamaktadır (Batlle ve ark. 2005). KKH'ler de anormal Wnt sinyal aktivasyonu sahiptir. Kanserin elimine edilmesi için KKH'lerde Wnt yolağının hedef alınması gerekmektedir (Barker ve ark. 2009).

Kronik lenfositik lösemide (KLL), salinomisin antibiyotiğinin LRP'nin fosforilasyonunu engelleyerek parçalanmasını sağladığı ve Wnt yolağını inhibe ederek kansere etkili olduğu gözlenmiştir (Lu ve ark. 2011). Kronik miyeloid lösemnin (KML) kök hücrelerinde Wnt yolağının tekrar aktive olması ile hastalarda relapslar meydana gelmiştir (Riether ve ark. 2015). Akut miyeloid lösemi (AML) kök hücrelerinde B-katenin ifadesi ve Wnt sinyalinin çok fazla aktive olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark. 2010).

Yamada ve ark. (2008) kolorektal kanserde ilaca dirençten sorumlu ABCB1/MDR-1 geninin promotor bölgesinde TCF bağlanma bölgeleri içerdiğini göstermişlerdir. Böylece Wnt sinyali KKH'lerin kemoterapiye direnç kazanması ile ilişkilendirilmiştir.

Wnt/B-katenin sinyal yolağı kök hücrelerin ve kanser kök hücrelerin farklılaşma ve self renewal özelliklerini düzenlemesi ile anormal aktivasyonu kanser ile ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla Wnt sinyal yolağını hedef alan ajanlar geliştirilmiştir. Kanserde etkinlik kazanan Wnt/B-katenin yolağını hedef alan non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİ) kullanılmaktadır. NSAİ ilaçlarının hücre çekirdeğindeki  $\beta$ -katenin düzeyini azaltmasıyla Wnt yolağını engellediği gösterilmiştir (Boon ve ark. 2004).

D vitamini ve sentetik analogu EB1089'nin  $\beta$ -katenini engelleyerek tümör kitlesinde küçülme meydana getirdiği gösterilmiştir. Dolayısıyla D vitamininden zengin diyetlerin belli kanser türlerini engellediği öne sürülmüştür (Akhter ve ark. 1997).

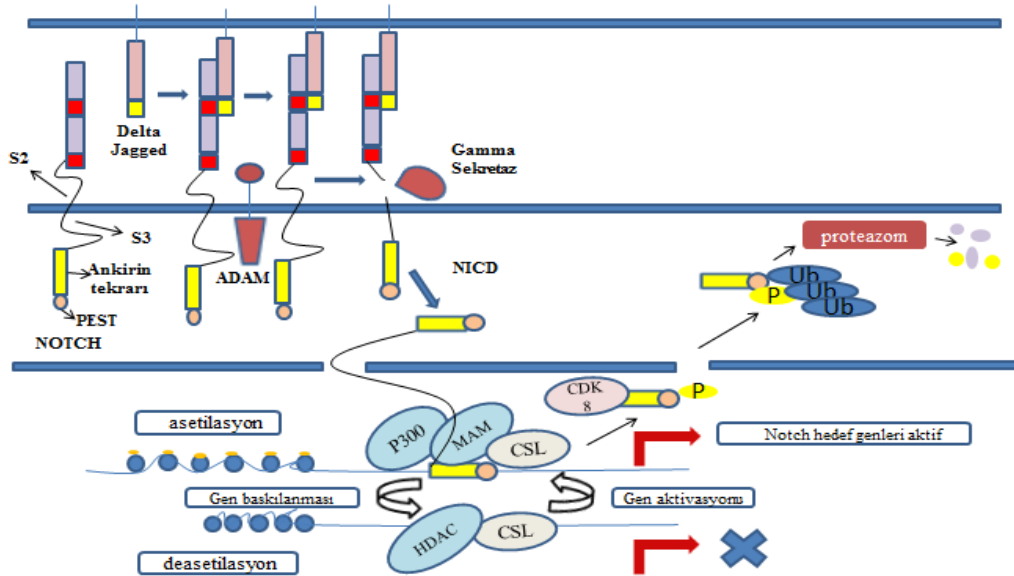
Wnt yolağının aktivasyonu epigenetik düzeyde de düzenlenmektedir. WIF1 (Wnt inhibitory factor-1), Wnt proteinlerini inhibe ederek tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gösterdiği bulunmuştur. Wnt sinyal yolağı inhibitörleri sFRP ve DKK'nin çeşitli kanserlerde hipermetile olduğu gösterilmiştir (Valencia ve ark. 2009).

Endojen Wnt inhibitörü olan sclerostin, Dkk, Wise ve Mesd, LRP'ye bağlanarak Wnt yolağını baskı altında tutar. Bu doğal yolu taklit etmek amacıyla LRP'i hedefleyen antikoları sentezlenmiştir ve bu antikoların kullanımı tedavi edilen tümör büyümesi durmuştur (Ettenberg ve ark. 2010).

#### 2.4.2. Notch sinyal yolağı

Notch transmembran reseptörü hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Hücre dışı kısım 36 EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve 3 LIN12 ardışık tekrarlarından oluşmaktadır. EGF tekrarları sayesinde notch reseptörü ligandlara bağlanmaktadır. Reseptörün hücre içi kısmı NICD (Notch Intraselüler Domain) olarak adlandırılmaktadır. NICD 6 ankirin tekrarı, RAM 23 bölgesi ve glutamat, serin, prolin ve treoninden zengin PEST bölgesinden oluşmaktadır. Ankirin tekrarları ve RAM 23 bölgesi NICD'nin transkripsiyon faktörlerine bağlanmasını sağlamaktadır (Kidd ve ark. 1986).

Notch reseptörünün ligandları Delta ve Serrate benzeri ligandlar olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Bir hücrede Notch reseptörü diğer hücrede Notch ligandının ifade olması ile hücre hücre etkileşimi sağlanmaktadır (Miele ve ark. 2006). Notch reseptörü 3 kez ayrılma işlemi geçirmesiyle aktivasyon kazanmaktadır (Şekil 2.7). Notch hücre yüzey ifadesi için S1 ayrılması gerekmektedir. Notch reseptörü ve ligandı hücre dışında bağlantı kurduğu zaman S2 ayrılması ADAM protezı tarafından gerçekleştirilir. Daha sonra gamma sekretaz enzimi sayesinde S3 ayrılması gerçekleşir ve NICD sitoplazmada serbest halde kalır (Kopan 2002).



Şekil 2.7. Notch Sinyal Yolağı (Bray 2006.)

NICD aktifleştikten sonra nükleusa geçer. CSL, NICD'nin nükleusta bağlandığı transkripsiyon faktörüdür. NICD'nin yokluğunda CSL HDAC'lar ile baskılanır. NICD'nin CSL, MAM (Mastermind) ve HAT (Histon asetilaz) ile

bağlanması sonucunda Notch hedef genleri ifade olmaktadır (Kramer 2000). NICD'nin CDK8 kinazı ile fosforillenmesi sonucu ubikutin ligaz için substrat haline gelir ve ubikinitasyon gerçekleşir. Ubikinitasyon sayesinde NICD yıkıma uğramaktadır ve hücre eski haline dönmektedir (Kopan 2002).

*Notch* geni, mutant *Drosophila*'nın çentik kanatlı fenotipinden dolayı adlandırılmıştır. Bu fenotipten sorumlu genetik lokusun *Drosophila* embriyogenezinde hücre kaderinin belirlenmesinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Mohr 1919). Notch sinyal yolağı türler arasında oldukça korunmaktadır. Proliferasyon, farklılaşma, kök hücre devamlılığı, apoptoz gibi temel hücresel süreçlerde önemli rol oynamaktadır (Artavanis-Tsakonas 1995).

Notch sinyal yolağının anormal ifadesi kanser hücre çoğalmasını desteklemektedir dolayısıyla Notch sinyal yolağı onkojenik potansiye sahiptir. Yüksek seviyedeki notch ifadesi yumurtalık, pankreas ve mide kanseri ile karakterizedir (Brzozowa-Zasada ve ark. 2016; Mullendore ve ark. 2009; Li ve ark. 2013).

Kanserde etkin tedavi için Notch sinyal yolağını hedef alan yöntemler geliştirilmektedir. Notch sinyal yolağının inhibisyonu için ilk olarak Alzheimer tedavisinde de kullanılan gamma sekretaz inhibitörleri (GSI) kullanılmıştır (Takabe ve ark. 2015). GSI'ların kanser kök hücrelerde proliferasyonu baskıladığı, apoptozu indüklediği ve kemoterapötik ilaçların etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Steg ve ark. 2014). Fakat GSI'ların diğer proteazlar üzerinde de etkili olabilmesi ve intestinal sistemde gösterdiği yan etkidenden dolayı Notch reseptörü ve ligandını hedef alan monoklonal antikolar üretilmiştir. Notch sinyal yolağı Delta benzeri ligandı 4 (DLL4)'ü hedef alan yüksek afinitede monoklonal antikor üretilmiş ve kemoterapötiklerle kombine kullanımı ile MKKH'lerde proliferasyon inhibisyonunu sağlanmıştır (Xu ve ark. 2016).

Kanser tedavisine Notch sinyal yolağını hedefleyen doğal ajanlar da mevcuttur. Kanser kök hücrelerinin yok edilmesi sırasında ortaya çıkan toksik etkiyi azaltmak için doğal bileşiklerle çalışmalar yapılmıştır. Vitamin D türevlerinin meme kanseri kök hücrelerinde Notch ligandlarında inhibitör etki göstermiştir (So ve ark. 2015). Kırmızı biberden elde edilmiş kapsaisin'in meme kanseri kök hücrelerinde NICD'nin nükleusa translokasyonunu baskıladığı ve kanser kök hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Shim ve Song 2015). Delphinidin, likopen, withaferin A, curcumin, oridoin gibi doğal bileşiklerin Notch ligand ifadesinin

azalmasını sağlayarak meme kanseri kök hücrelerinde sağ kalımı baskılamıştır (Moselhy ve ark. 2015, Xia ve ark. 2017).

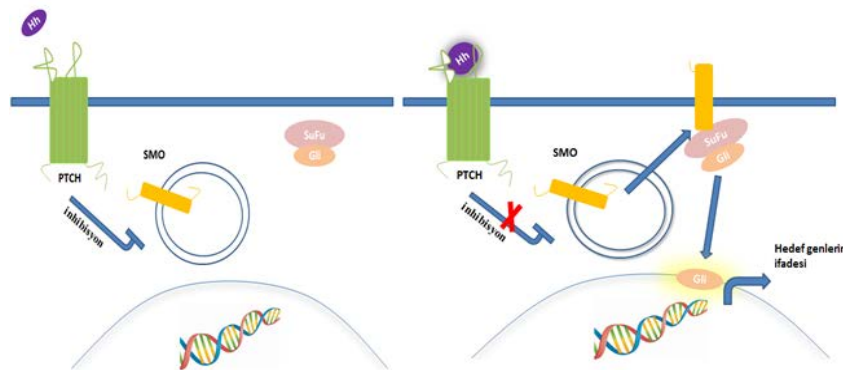
### 2.4.3. Hedgehog sinyal yolağı

Hedgehog (Hh) geni Christiane Nüsslein-Volhard ve Eric F. Weischaus tarafından 1980 yılında *Drosophila*'da embriyonik gelişimde etkili mutasyonları araştırırken keşfedilmiştir. Hedgehog mutant larvalarda kirpilere benzer sivri dikensi çıkıntılar olduğu için kirpi (Hedgehog) sinyal yolu olarak adlandırılmıştır (Heretsch ve ark. 2010).

Omurgalılarda, Sonic hh (*Shh*), Indian hh (*Ihh*) ve Desert hh (*Dhh*) olmak üzere 3 farklı Hedgehog geni bulunmaktadır. *Ihh* iskelet gelişiminde önemli rol almaktadır. *Dhh* testislerde ifade olmaktadır. Erişkin ve embriyo dokularında en çok ifade olan ve en çok çalışılan ise *Shh*'dir (Bitgood ve ark. 1996; Wijgerde ve ark. 2005).

Hedgehog sinyal yolağının ligandları Hh proteinleridir. Hh proteinleri C-terminal ve N-terminal prekürsör halde bulunur. N-terminal sinyal bölgesine palmitoil ve C-terminal bölgesine kolesterol eklenmesi ile HhNp olarak adlandırılan aktif sinyal bölgesi oluşur (Varjosalo ve Taipale 2008).

Patched (Ptch) transmembran proteini Hedgehog sinyal yolağının reseptörüdür. Omurgalı canlılarda Ptch1 ve Ptch2 olmak üzere iki izoforma sahiptir. Ptch Hh ligandına bağlı değilken Smoothened'i (SMO) enzozomik veziküler içerisinde hapsolup hücre zarına gelmesini baskılar. SMO hedefi SuFu-Gli protein kompleksi aktifleştirilemediği için sinyal iletimi gerçekleştirilemez (Heretsch ve ark. 2010).



Şekil 2.8. Hedgehog Sinyal Yolağı (Merchant ve Matsui 2010).

Hh ligandının Ptch reseptörüne bağlanmasıyla SMO üzerindeki baskı kalkar

(Şekil 2.8). SMO hücre membranına bağlanır ve sinyal aktif hale gelir. SuFu (Suppressor of Fused) kompleksinden ayrılarak aktifleşen GLI transkripsiyon faktörleri hücre çekirdeğine girerek hedef genlerin ifadesini sağlamaktadır (Huangfu ve ark. 2003).

Hedgehog sinyal yolağı omurgasız ve omurgalılarda embriyonik gelişimde önemli rol oynamaktadır. Organların gelişimini, uygun büyüklük ve yerde olmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda doku homeostazında rolü bulunmaktadır (Varjosalo ve Taipale 2008). Hedgehog sinyal yolağı doku tamiri için somatik ve pluripotent kök hücre devamlılığını sürdürmektedir (Lowry ve ark. 20008). Karsinogenezin çeşitli aşamalarında Hedgehog sinyalinin aktivasyonu gözlenmiştir. Örneğin pankreas ve özofagus kanserlerinin erken aşamalarında Hedgehog sinyalinin aktivasyonu gözlenmiştir (Bailey ve ark. 2009). Gastrik ve prostat kanserlerinde hedgehog sinyal yolunun aktivasyonu doku invazyonu ve artmış metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Karhadkar ve ark. 2004). Hedgehog sinyal yolağının TGF- $\beta$ , Wnt, Notch yolakları ile ilişki içerisinde olarak anormal aktivasyonunun beyin tümörlerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Kanserle ilişkili olan Hedgehog sinyal yolağının inhibisyonu yeni tedavi stratejilerinin hedefidir (Golestaneh ve Mishra 2005).

Siklopamin alkaloidi içeren *Veratrum californicum* ile otlayan koyunların holoprosensefali doğumlar meydana getirmesiyle siklopaminin Hedgehog sinyal yolağı ile ilişkisi araştırılmış ve Siklopaminin SMO antagonisti olduğu ortaya çıkmıştır. Siklopaminin SMO'ya bağlanarak Hedgehog yolağını inhibe ettiği ve malformasyonlu doğumlara sebep olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark. 2011). Bunun üzerine aktifleşmiş Hedgehog sinyali olan kanserlere karşı sentetik antagonistler geliştirilmiştir. SMO antagonisti GDC-0449'un bazal hücreli karsinomada ve pankreas kanseri kök hücrelerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Von Hoff ve ark. 2009; Singh ve ark. 2011). Kanser kök hücrelerinin kendini yenileme ve hayatiyetini sürdürmesinde Hedgehog sinyali rol almaktadır. Bu yüzden Hedgehog sinyal inhibisyonu umut verici bir tedavi yaklaşımıdır (Beachy ve ark. 2004).

Bu tez çalışmasının amacı, bir HDAC inhibitörü olan Belinostat'ın MCF-7 kanser kök hücreleri üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve kimyasallar

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar

Cihaz/Malzeme	Marka
ELISA okuyucu Bio-Tek	Epoch
-80°C Dondurucu	Symphony
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554
-20°C derin dondurucu	Arçelik
Hassas terazi	KERN-Sohn GmbH
Laminer hava kabini class 2	Scanlaf
Işık mikroskobu	Olympus
Otomatik mikropipetler	VWR
Real time PZR	Bio-Rad
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Yatay elektroforez	Thermo
Nanodrop	Maestro
Vakum pompası	GM-0
CO <sub>2</sub> 'li inkübatör	Syngene
İnverted mikroskop	Olympus
Mikro santrifüj	Olympus
Jel görüntüleme sistemi	Cleaver
Vorteks	Boeco
Akım sitometri	BD FACSAria III

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Tablo 3.2: Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri

Kimyasal/sarf	Marka
Belinostat	MCE MedChem Express
Transcriptor first strand cDNA synthesis kit	BioRad
XTT Reagent-Cell Proliferation Kit	BI (Biological Industries)
SYBR Green qPCR Master Miks	BioRad
Trizol	Sigma
Fötal Sığır Serumumu	Capricorn
Penisilin/Streptomisin	BI (Biological Industries)
PRMI-1640 medyum	Multicell
DNAaz/RNase free su	BioShop
Tripan mavisi boyası	BI (Biological Industries)
PBS	Multicell
Dimetil sülfoksit (DMSO)	ApliChem
96-Kuyucuklu PCR Array Plate	Nest
Tripsin/EDTA	Multicell
Caspase-3 Assay Kit	BioVision
CD44 anti human antikoru	BD Bioscience
CD24 anti human antikoru	BD Bioscience
BD Accuodrop Beads	BD Bioscience
96 kuyucuklu hücre kültür kabı	Nest
Steril kültür kapları (Petri) (100x20mm)	Nest
Cell Scraper	SPL

### 3.2. Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 (ATCC® HTB-22™) ve insan embriyonik böbrek kökenli HEK-293 hücre hattı ATCC'den temin edilmiştir. Hücre hatlarının özellikleri Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'de özetlenmiştir. MCF-7 hücreleri %10 fetal sıgır serumu ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde kendileri için uygun kültür ortamı olan 37°C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan MCF-7 hücre hattının özellikleri

MCF-7 hücre hattı (ATCC® HTB-22™)	
Organizma	<i>Homo sapiens</i> , insan
Doku	Meme bezi
Hastalık	Adenokarsinom
Morfoloji	Epitelyal
Cinsiyet	Kadın
Yaş	69
Büyüme özelliği	Yapışarak çoğalan (adherent)

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan HEK-293 hücre hattının özellikleri

HEK-293 hücre hattı (ATCC® CRL-1573™)	
Organizma	<i>Homo sapiens</i> , insan
Doku	Embriyonik böbrek
Hastalık	Adenokarsinom
Morfoloji	Epitelyal
Yaş	Fetus
Büyüme özelliği	Yapışarak çoğalan (adherent)

#### 3.2.1. Hücre hattının dondurulması

Petri yüzeyine yapışarak çoğalan hücreleri, yapıştıkları yüzeyden kaldırmak için Tripsin-EDTA ile muamele edildikten sonra 3-4 dakika 37°C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılarak petrinin yüzeyinden ayrılmaları sağlandı.

İnkübasyonun ardından inverted mikroskop ile hücrelerin kalktığı gözlemlenerek petri üzerine taze besiyeri eklendi. Hücre-besiyeri içeriği falkon tüpe alınarak 4 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüp içerisine 9:1 oranında DMSO (Dimetil sülfoksit) ve besiyerinden oluşan dondurma çözeltisi eklenerek hücreler kriyotüplere alındı. Kriyotüpler -20°C'de dondurulduktan sonra hızlı bir şekilde -80 °C'de muhafaza edildi.

#### 3.2.2 Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi

%10 DMSO ile dondurulmuş kriyotüp içerisinde bulunan hücreler hızlı bir şekilde çözülmesi için -80°C'den 37°C'ye alındı. İçerisinde 5 ml RPMI-1640

besiyeri bulunan falkon tüpün içerisine 1 ml hücre damla damla eklendi. 15.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Uygun miktarda besiyeri ile pellet homojenize edildi. Hücreler petriye alınarak 37°C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler petri yüzeyinin yaklaşık %80'ini doldurana kadar iki günde bir besiyeri değiştirilerek çoğaltıldı. Petri yüzeyi dolduğunda hücrelerin canlılığını korumak amacı ile pasajlama işlemi yapıldı.

### 3.2.3 Hücre hattının pasajlanması

Petride %80-90 yoğunluğuna ulaşan hücrelerinin pasajlama işlemi için ilk olarak eski besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Petri yüzeyine yapışarak çoğalan hücreleri, yapışıkları yüzeyden kaldırmak amacı ile 1-2 ml Tripsin-EDTA eklenerek 3-4 dakika 37°C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin inverted mikroskopta kalktığı gözlemlendi. Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı besiyeri eklendi ve hücreler pipet ile homojenize edildikten sonra bir falkon tüpe alındı. 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Uygun miktarda besiyeri ile pellet homojenize edildi. Hücrenin yoğunluğuna göre petrilere hücre ekimi yapıldı ve çoğalmaları için 37°C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

### 3.3. Belinostat stok solüsyonun hazırlanması

Çalışmada kullanılan Belinostat (MCE MedChem Express, Katolog No: HY-10225) ticari olarak elde edildi. C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S kimyasal formülüne ve 318.35 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Katı formda bulunan Belinostat +4°C'de muhafaza edildi. Belinostat %0,1 DMSO içerisinde çözdürülerek stok solüsyon olarak hazırlandı. Daha sonra stok solüsyondan seyreltmeler yapılarak çalışma için uygun konsantrasyonlar hazırlandı.

### 3.4. Belinostat'ın sitotoksik etkisinin belirlenmesi

Belinostat'ın MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) testi kullanıldı. XTT sarı renkte, suda eriyebilen tetrazolyum tuzudur. Canlı hücrelerde tetrazolyum tuzu turuncu renkli formazan bileşenlerine indirgenmektedir. Metabolik aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan boya yoğunluğu, belirli bir dalga boyunda bir spektrofotometre ile okunabilir.

Belinostat sırası ile 0-25 µM aralığındaki konsantrasyonlarda RPM-1640

besiyeri ile hazırlandı. Petrilere ekilen ve petri yüzeyini kaplayan hücreler tripsinizasyon ile petri yüzeyinden kaldırıldı ve Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı taze besiyeri eklendi. Homojenize edildikten sonra bir falkon tüpe alındı ve 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant boşaltıldı. Uygun miktarda besiyeri ile pellet homojenize edildi. Bir ependorfta, 100 µl hücre ve 100 µl tripan mavisi karıştırıldı. Ardından bu karışımdan 10 µl alınarak Thoma lamı ile ışık mikroskobu altında hücreler sayıldı. Elde edilen hücre sayılarına göre 96 kuyucuklu plate'in her bir kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 100 µl hücre-besiyeri içeriği platelere ekildi. Hücreler yüzeye yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak kontrol grupları dışındaki kuyucuklara 0.25, 0.5, 0.75, 1, 3, 5, 15 ve 25 µM Belinostat eklendi.

Hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda kuyucuklardaki besiyeri ortamdaki uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 50 µL XTT solüsyonu (49 µL reagent solüsyonu + 1 µL aktivatör solüsyonu) eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. Dört saatin sonunda çalışılan grupların optic absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda 630 nm referans aralığında okundu. XTT deneyi sonucunda CompuSyn Version 1.0 yazılımı ile Belinostat'ın  $IC_{50}$  değeri belirlendi.

### 3.5. FACS ile $CD44^+/CD24^-$ meme kanseri kök hücrelerinin ayrıştırılması

Kontrol ve doz gruplarının antikörle muamele edilmemiş olanları için flasklara ekilen hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. Uygun miktarda hücre alındıktan sonra 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi ve süpernatant boşaltıldı. Hücreler HBSS+ %2 FBS solüsyonu ile resuspende edildi.

Kontrol ve doz gruplarının unstain olmayanları için flasklara ekilen hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. Uygun miktarda hücre alındıktan sonra 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi ve süpernatant boşaltıldı. Hücreler FITCH labeled anti-human CD44, BD Pharmingen anti-human CD24 ve HBSS+ %2 FBS solüsyonu ile resuspende edildi. Cam tüpler buza alındı ve karanlık ortamda 45 dakika inkübasyona bırakıldı.

MCF-7 meme kanseri hücre hattından kanser kök hücrelerinin izolasyonu BD FACSAria III flow sitometri cihazı (Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi-İLTEK) kullanılarak yapıldı. MCF-7 kök hücrelerinin belirlenmesi ve saflaştırılması için flow sitometride FACS Diva version 6.1.3.

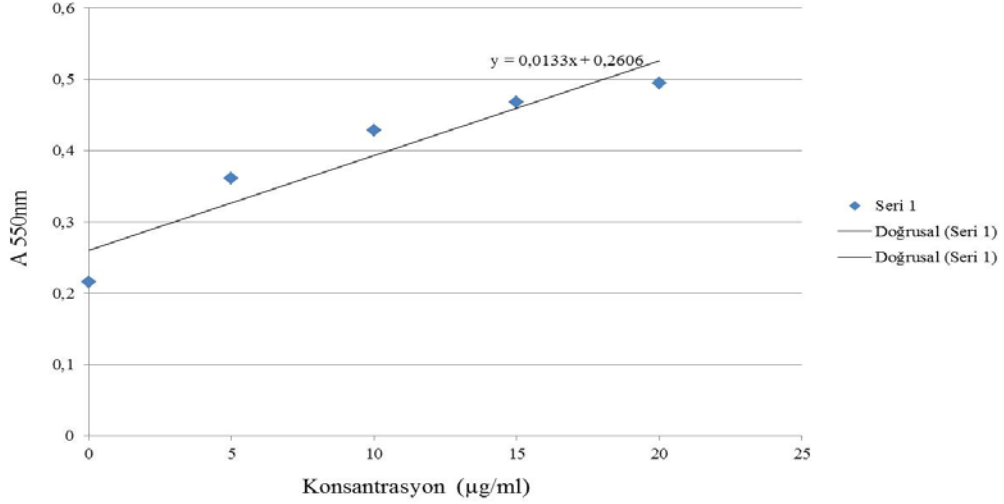
yazılımı kullanıldı. Kök hücrelerin ayrıştırılmasından sonra hücrelerin bir kısmı RNA izolasyonu için ependorf tüplere alındı, bir kısmı ise kaspaz-3 analizi için liziz bufferlı tüplere alındı.

### 3.6. Kaspaz-3 aktivitesi analizi

Belinostat'ın kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri “Caspase-3 Assay Kit” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Örnekler için proteinlerin konsantrasyonları, protein tayininde kullanılan Bradford yöntemi ile ölçüldü. Ölçüm, boyanın (Coomassie Blue) proteine bağlanmasıyla oluşan kompleksin molar absorpsiyonu artırmasına dayanmaktadır. 465-595 nm arasında ölçüm gerçekleştirildi. Rengin koyu mavi olması yüksek konsantrasyona, açık kahverengi olması ise düşük konsantrasyona işaret etmektedir.

Protokole göre deneye başlamadan önce Bradford çözeltisi hafifçe çalkalandı. Uygun aralıklarda BSA standartları hazırlandı (5 µg/30 µl; 10 µg/30 µl; 15 µg/30 µl; 20 µg/30 µl) ve örnekler standart eğrinin uygun alanında olacak şekilde ayarlandı. Her bir ependorfa 30 µl örnek/standart pipetlendi. Her bir ependorfa 90 µl Bradford ayırıcı pipetlenerek eklendi ve hızlıca vortekslendi. Tüm örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip A<sub>595</sub> nm'de okundu. Örneklerin protein düzeyi (Şekil 3.1)'de gösterildiği gibi standart grafik eğrisi kullanılarak hesaplandı.

Kaspaz-3 aktivitesi için her protein 100 µg olacak şekilde ayarlandı. FACS'dan sonra kaspaz-3 analizi için ise liziz bufferlı tüplere alınan hücreler kullanıldı. Her örneğe 10 mM DTT (dithiothreitol) içeren 50 µl 2X reaksiyon buffer eklendi. Son olarak her tüpe 4 mM DEVD-pNA substratın 5 µl'si ilave edilerek 2 saat 37°C'de inkübe edildi. Kaspaz-3 aktivitesi, işaretlenmiş DEVD-pNA substratının aktif kaspaz-3 tarafından parçalanması ile oluşan kromofor p-nitroanilin (p-NA)'in 400 nm dalga boyunda bir mikropate okuyucu ile ölçülmesi sonucunda belirlendi.



Şekil 3.1: Bradford protein standart eğrisi

### 3.7. Gerçek zamanlı kantitatif PZR (qPZR) analizi

Apoptoz, metastaz, Wnt, Notch ve Hedgehog yolaklarında önemli genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif PZR (qPZR) kullanılarak yapıldı. Bunun için hücrelerden RNA izolasyonu sonrası cDNA sentezlendi.

#### 3.7.1. Total RNA izolasyonu

MCF-7 kontrol ve MCF-7 Belinostat uygulanmış (doz grubu) hücreler, HEK-293 kontrol ve HEK-293 Belinostat uygulanmış hücrelerden, FACS'dan sonra elde edilen ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> Kontrol ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> doz grubu hücrelerinden RNA izolasyonu Trizol solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler 1 ml Trizol ile muamele edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek hücrelerin parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin ayrışması sağlandı. Sonrasında ependorflara 200 µl kloroform eklenerek vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 12000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Faz ayrışmasından sonra RNA içeren süpernatant yeni ependorfa alınarak üzerine 250 µl izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve RNA pelleti yeni ependorfa alındı. RNA'yı etanol ile yıkama amacıyla 1 ml %75 etanol eklendi ve 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırmak için RNA pelleti kurumaya bırakıldı. RNA iyice kuruduktan sonra 30 µl nükleaz içermeyen su (NFW) ile RNA pelleti çözdürüldü. Nanodrop cihazına 1 µl RNA örneği konularak 260/280 nm UV'de ng/µl

cinsinden konsantrasyonları ölçüldü. Total RNA örneklerinin kalitesi %1 agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi.

### 3.7.2. cDNA sentezi

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda cDNA Synthesis Kit kullanılarak RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi için İScript cDNA sentez kiti kullanıldı. cDNA sentezi için 1000 ng RNA, 4 µl 5x İScript reaksiyon miksi, 1 µl iScript revers transkriptaz tüp içine eklendi ve toplam hacim NFW ile 20 µl'ye tamamlandı. Daha sonra tüpler 25°C'de 5 dakika, 46°C'de 20 dakika, 95°C'de 1 dakika inkübasyona bırakıldı. Elde edilen cDNA'lar gen ekspresyon çalışmaları yapılmaya kadar cDNA'lar -20°C'de bekletildi.

### 3.7.3. Primer dizaynı

Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan genler ile referans gen olarak belirlenen *CYPA* ve *GAPDH* genlerine yönelik primerler, IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/site>) programı kullanılarak tasarlandı veya literatürden alındı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 3.4'de gösterildi.

### 3.7.4. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR)

Hedef ve referans genlerin ekspresyon analizleri, gerçek zamanlı kantitatif qPZR kullanılarak gerçekleştirildi. qPZR analizlerinde çift iplikli DNA'ya bağlanarak ortama ışık veren SyberGreen boyası kullanıldı. Her bir reaksiyon için, 5 µl iTaq™ universal SYBR Green supermix, 0.5 µl primer mix (12.5 pMol), 3 µl cDNA ve toplam hacim 10 µl olacak şekilde ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. CFX Connect™ Real-Time PCR cihazı kullanıldı. Tam bir denatürasyon (95°C 5 dakika) sonrası, amplifikasyon 40 döngü (95°C 5 saniye, 60°C 30 saniye) basamaklarından oluşan qPZR protokolü uygulandı. 95°C 5 saniye ısıtılıp, 65°C'a düşürülen ısı 95°C'a kadar tekrar kademeli olarak artırılarak melting curve (erime eğrisi) analizi gerçekleştirildi. Gen ifade düzeylerinin değerlendirilmesi Ct (eşik döngüsü) değerleri üzerinden yapıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürünlerin doğruluğu teyit etmek için reaksiyon ürünleri %2'lik agaroz jelde 110 voltta 40 dakika yürütüldü.

Tablo 3.5: Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Primer dizisi (5'→3')	Uzunluk (bp)	Referans
WNT-1 <sup>a</sup>	GCGTCTGATACGCCAAAATC GGATTTCGATGGAACCTTCTG	244	Okoye ve ark. 2008
LRP-6 <sup>a</sup>	AGGCACTTACTTCCCTGCAA GGGCACAGGTTCTGAATCAT	273	Zhang ve ark. 2010
APC <sup>a</sup>	CAAAGACTCTGTATTGTTGGAAAT CATCAGGCTGTGAGTGAATGA	98	*
TCF-7 <sup>a</sup>	GGACAACACTACGGGAAGAAGAAG TCTCCGGGTAAGTACCGAAT	95	*
FZD-8 <sup>a</sup>	TCTTGTCGCTCACATGGTTC TGTAAGACACGGTGAACAGG	375	*
LEF-1 <sup>a</sup>	GAAGCCTCAGCATGAACAGA CAACGACATTGCTCTCATTTC	110	*
NOTCH-1 <sup>b</sup>	CAATGTGGATGCCGCAGTTGTG' CAGCACCTTGGCGGTCTCGTA	125	Park ve ark. 2018
JAG-1 <sup>b</sup>	GTATCTGTCCACCTGGCTATG ACAGACACTGGAATCTGTTGAT	120	*
SHH <sup>c</sup>	CCGAGCGATTAAAGGAACTCA ATCACCGAGATGGCCAAAG	133	*
PTCH <sup>c</sup>	GGGTGGCACAGTCAAGAACAG TACCCCTTGAAGTGCTCGTACA	108	You ve ark. 2010
SMO <sup>c</sup>	ATCGCTACCCTGCTGTTATTC GGGCACCATCCATGAACT	90	*
GLI-1 <sup>c</sup>	GAGCTGGACATGCTGGTT ATTCAGGCTCACGCTTCTC	148	*
MMP-1 <sup>d</sup>	GCCTTCCAACCTCTGGAGTAATG AGGAGAGTTGTCCCGATGAT	111	*
SOX <sup>d</sup>	GCCGAGTGGAACCTTTTGTCG GGCAGCCTGTACTTATCCTTC	150	*
NANOG <sup>e</sup>	TTTGTGGGCCTGAAGAAACT AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG	116	*
OCT4 <sup>e</sup>	CAAGGAGGCAAAGGTCTCGAA CGGCACCTGACACAGAAGA	193	*
CASP3 <sup>f</sup>	GAAATTGTGGAATTGATGCGTGA CTACAACGATCCCCTCTGAAAAA	164	*
CASP9 <sup>f</sup>	CTGTCTACGGCACAGATGGA GGGACTCGTCTTCAGGGA	75	*
APAF-1 <sup>f</sup>	AAGGTGGAGTACCACAGA TCCATGTATGGTGACCCATCC	116	*
p53 <sup>f</sup>	CAGCACATGACGGAGGTTG TCATCCAAATACTCCACACGC	125	*
GAPDH <sup>g</sup>	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT GGCTGTTGTCATACTTCTCAT	197	*
CYPA <sup>g</sup>	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG CTTCTTGCTGCTGGTCTTGCAATTCC	124	*

\*Bu çalışmada design edilmiştir. <sup>a</sup>Wnt, <sup>b</sup>Notch, <sup>c</sup>Hedgehog, <sup>d</sup>metastaz, <sup>e</sup>kök hücre belirteçleri, <sup>f</sup>apoptoz yolu ve <sup>g</sup>referans (housekeeping) genleri

### 3.8. Tümörfaz (sphere) oluşumu

MCF-7 hücrelerinden FACS ile CD44+/CD24- kök hücreler izole edildikten sonra bekletilmeden T-25 flaska serumsuz (%1 PC + RPMI-1640) medyum ile ekim gerçekleştirildi. Kök hücre ekim sonrasında 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatöre aktarıldı.

Belirli zamanlarda medyumunu yenilendi. Mikroskopta x10 büyütmede belirli günlerde incelendi. Tümörfaz oluşumu için 60 gün boyunca kültüre edildi. Tümörfaz oluşumu incelendi ve görüntülendi.

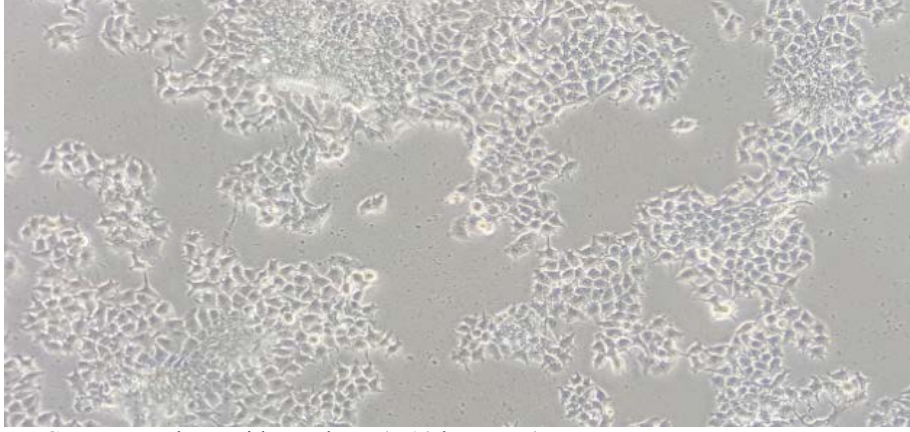
### 3.9. İstatistiksel analizler

Kaspaz-3 aktivitesi verileri Windows GraphPad prizma (v5.0) programının “*Student t-testi*” ile karşılaştırıldı. Kontrol ve doz grupları arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar GAPDH ve CYPA referans genleri kullanılarak normalize edildikten sonra,  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  metodu kullanılarak “RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis” olarak isimli web tabanlı program ile (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) analiz edildi. Gruplar arası gen ifadesinde gözlenen farklılıklar kat artışı olarak hesaplandı. Gruplar arası “*Student t-testi*” analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre kültürleri

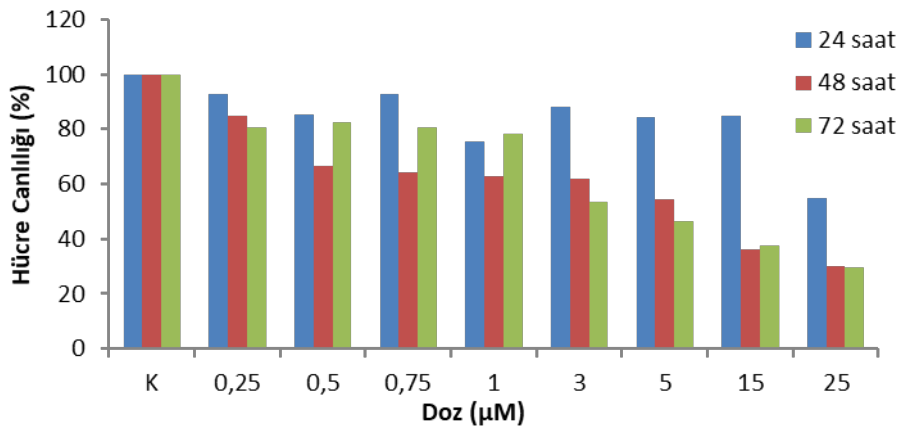
Çalışmada kullanılan MCF-7 insan meme kanseri hücreleri %10 fetal sığır serumu ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde kendileri için uygun kültür ortamı olan 37°C'de %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi (Şekil 4.1.).



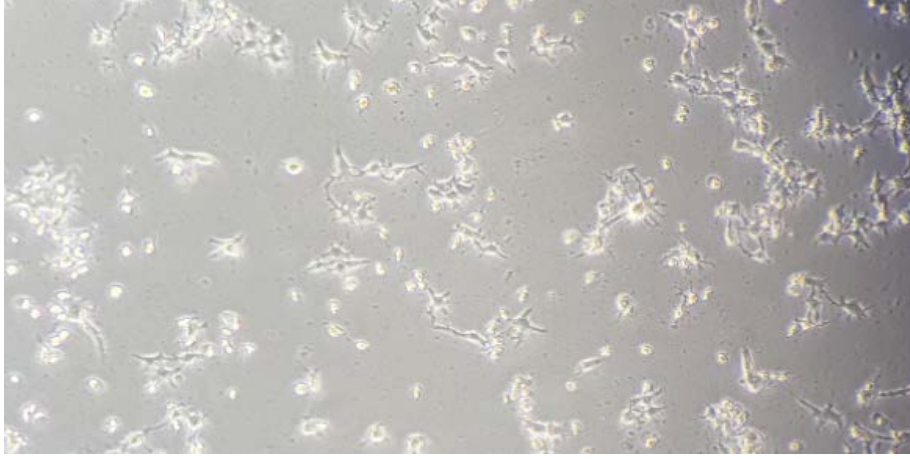
Şekil 4.1. MCF-7 meme kanseri hücre hattı (X10 büyütme)

### 4.2. Belinostat'ın sitotoksik etkisi

MCF-7 hücre hattında Belinostat sırasıyla 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 3, 5 ve 15  $\mu$ M doz aralıklarında 24., 48. ve 72. saat inkübasyon sonrası sitotoksitesi XTT testi ile üçlü tekrarlar şeklinde gerçekleştirildi. Belinostat'ın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını baskıladığı gözlemlendi. MCF-7 hücre hattında 48 saat sonunda Belinostat'ın IC<sub>50</sub> dozu 5  $\mu$ M olarak belirlendi (Şekil 4.2.). 5  $\mu$ M Belinostat uygulama sonrası MCF-7 hücrelerinin 48. saat görüntüsü Şekil 4.3'de verildi.

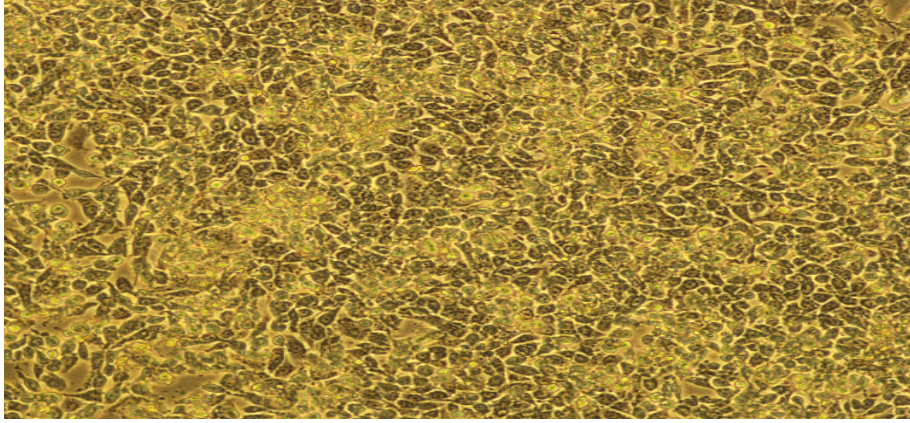


Şekil 4.2. Belinostat'nın MCF-7 hücre canlılığına etkisi

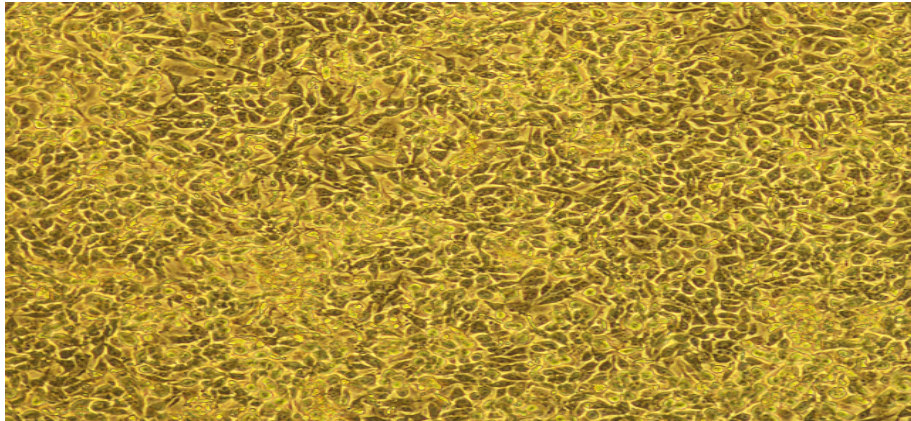


Şekil 4.3. Belinostat uygulanmış MCF-7 meme kanseri hücreleri (X10 büyütme)

Belinostat için belirlenen  $IC_{50}$  değeri HEK293 hücre hattına da uygulandı (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5) ve invert mikroskopta incelendi.



Şekil 4.4. İnsan Embryonik böbrek kökenli HEK293 hücre hattı kontrol (X10 büyütme)

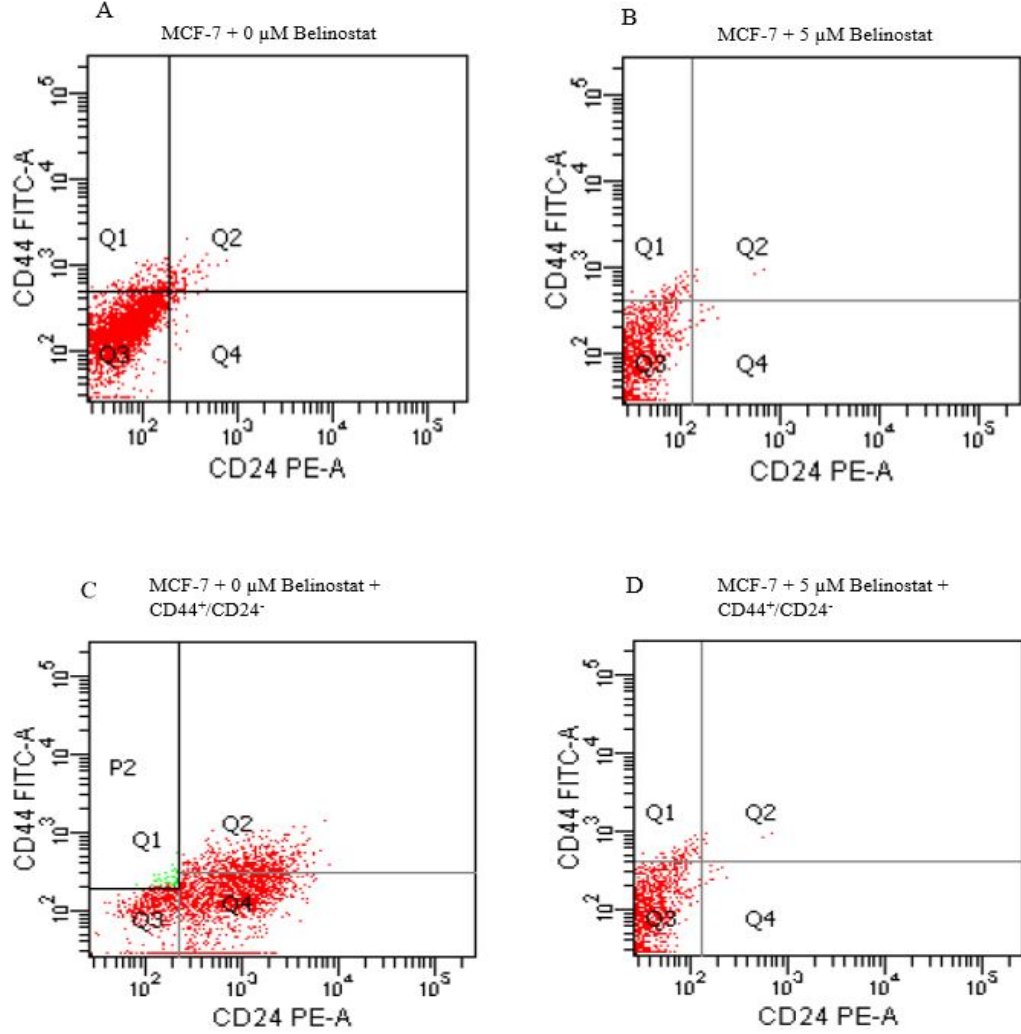


Şekil 4.5 İnsan Embryonik böbrek kökenli HEK293 hücre hattı doz (X10 büyütme)

#### 4.3. Belinostat'ın kanser kök hücre oranı üzerine etkisi

MCF-7 kanser kök hücreleri miktarı  $CD44^+/CD24^-$  yüzey belirteçleri

kullanılarak akım sitometri (FACS) ile belirlendi. FACS sonuçlarına göre MCF-7 total hücre içerisinde MCF-7 kök hücre oranı %2 olarak saptandı. Bu çalışmada, Belinostat'ın 5  $\mu$ M dozunda 48 saat muamelesinden sonra MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla %44, MCF-7 kök hücre miktarında ise %66 azalma gözlemlendi.



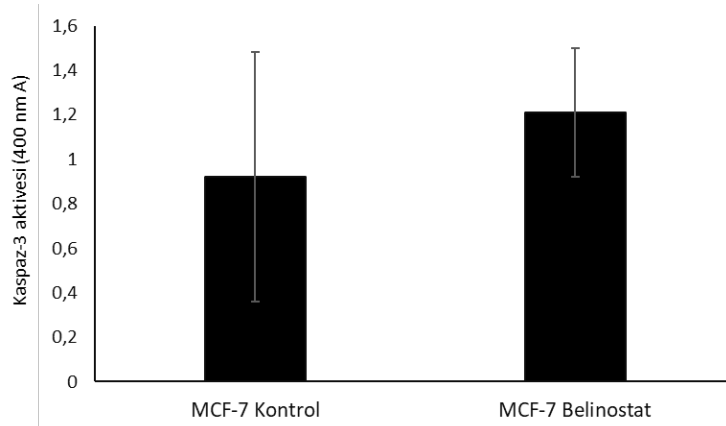
Şekil 4.6. FACS Analizi

(Q1: CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, Q2: CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>, Q3: CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>, Q4: CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>) (A) Belinostat uygulanmayan MCF-7 total hücre miktarı, (B) Belinostat uygulanmış MCF-7 total hücre miktarı (C) Belinostat uygulanmamış CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> antikor uygulanmış MCF-7 kök hücre miktarı (D) Belinostat uygulanmış CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> antikor uygulanmış MCF-7 kök hücre miktarı

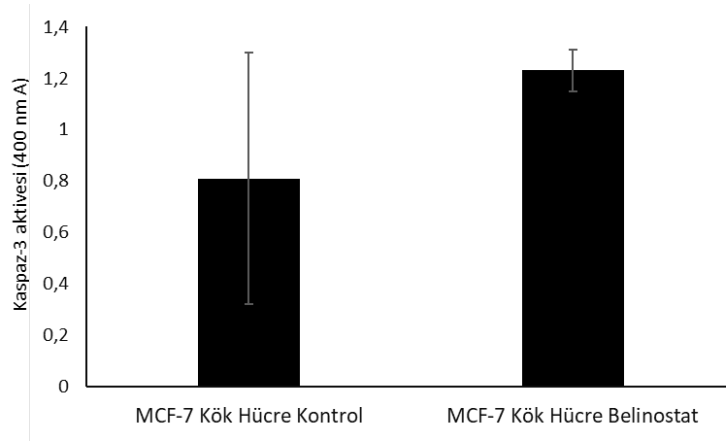
#### 4.4. Belinostat'ın MCF-7 meme kanseri ve MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinde Kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkisi

Belinostat'ın kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri kaspaz-3 aktivite testi ile gerçekleştirildi. Belinostat'ın MCF-7 hücrelerinde (Şekil 4.1) ve MCF-7 kök hücrelerinde (Şekil 4.2) kaspaz-3 aktivitesi artmış olmasına rağmen istatistiksel

olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).



Şekil 4.7. Belinostat'ın MCF-7 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi ( $*p<0,05$ )

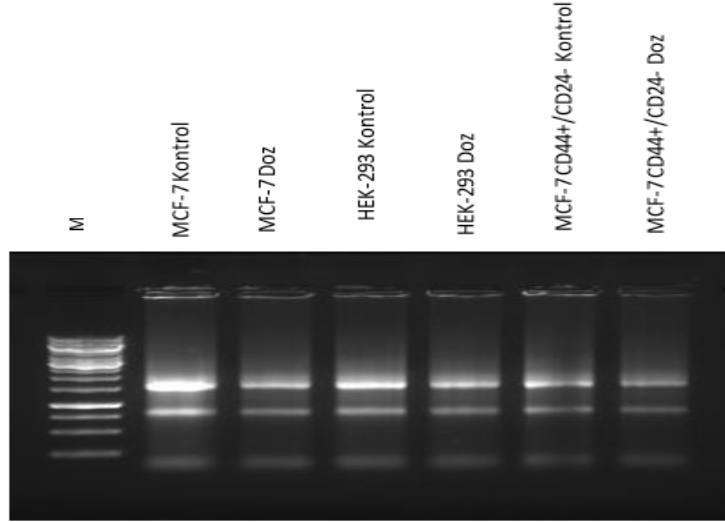


Şekil 4.8. Belinostat'ın MCF-7 kanser kök hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi ( $*p<0,05$ )

#### 4.5. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu bulguları

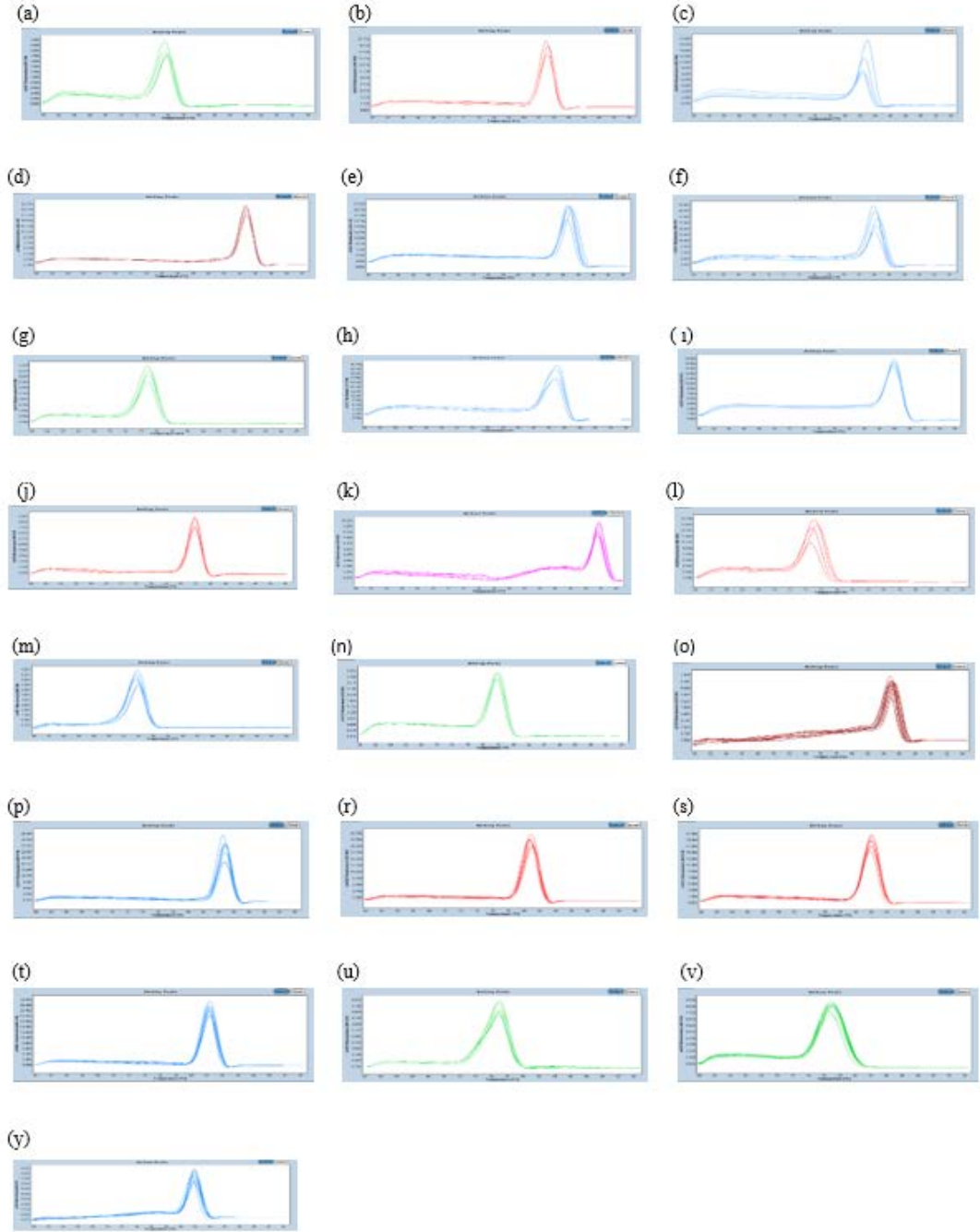
MCF-7- HEK-293 ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kontrol ve Belinostat doz hücre gruplarından izole edilen RNA örneklerin miktar ve kalitesi 260/280 nm UV'de ve agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi (Şekil 4.9). RNA örneklerinin cDNA sentezi ve qPZR analizlerinde kullanılabilir kalitede olduğu tespit edildi.

Wnt (WNT1, LRP6, APC, TCF-7, FZD8 ve LEF), Hedgehog (SMO, SHH, PTCH ve GLI), Notch (NOTCH ve JAG), metastaz (MMP1) ve apoptoz (CASP3, CASP9, p53 ve APAF1) yolları, kök hücre belirteçleri (SOX, NANOG ve OCT4) ile referans (GAPDH ve CYPA) genlerinin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak mRNA düzeyinde tespit edildi.

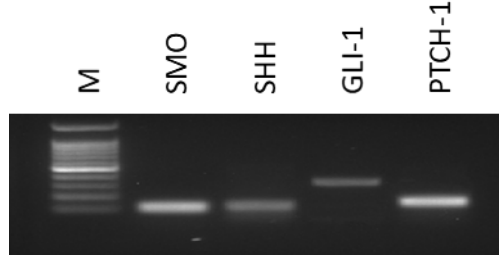


Şekil 4.9. RNA örnekleri agaroz jel görüntüsü

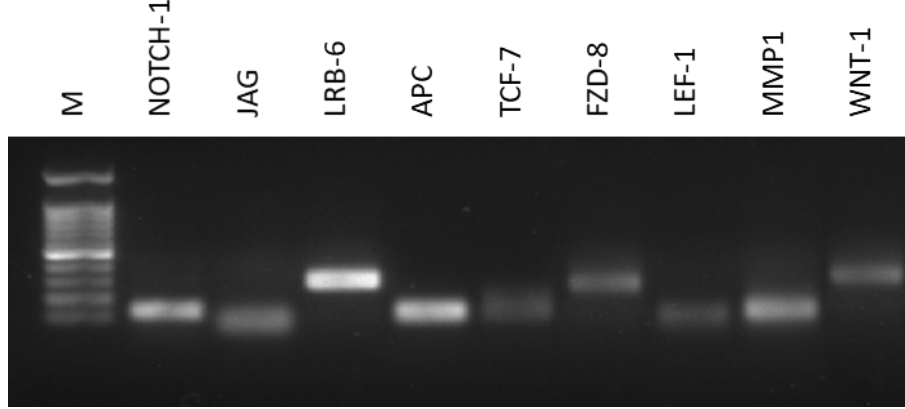
Bu çalışmada kullanılan tüm genlerin melting curve görüntüleri Şekil 4.10'de gösterildi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezde kontrol edildi (Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14). Melting curve ve agaroz jel elektroforez sonuçları çalışmada kullanılan primerlerin spesifik olarak hedef gen bölgesini çoğalttığını göstermektedir.



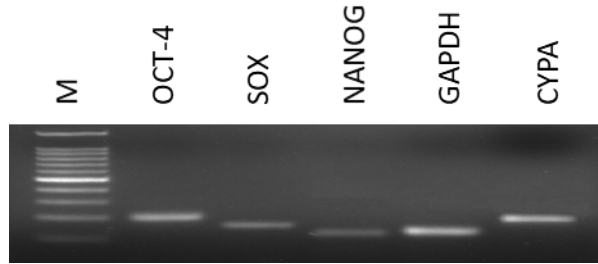
Şekil 4.10. Çalışmada kullanılan genlerinin melt analiz eğrileri. SMO (a), SHH (b), PTCH-1 (c), GLI-1 (d), NOTCH-1 (e), JAG (f), WNT-1 (g), LRP-6 (h), APC (i), TCF-7 (j), FZD-8 (k), LEF-1 (l), MMP-1 (m), OCT-4 (n), SOX (o), NANOG (p), CASP3 (r), CASP9 (s), APAF-1 (t), p53(u), GAPDH (v) ve CYPA (y).



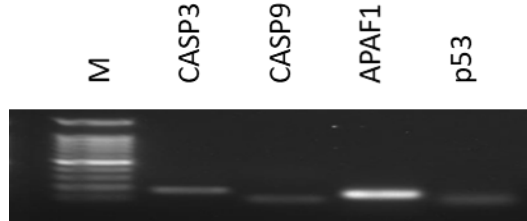
Şekil 4.11. Hedgehog yolağında önemli genlerin agoroz jel görüntüsü (M: 100 bp DNA marker)



Şekil 4.12. Metastaz, Wnt ve Notch yolağında önemli genlerin agoroz jel görüntüsü (M: 100 bp DNA marker)



Şekil 4.13. Kök hücre belirteçleri ve referans genlerin agoroz jel görüntüsü (M: 100 bp DNA marker)

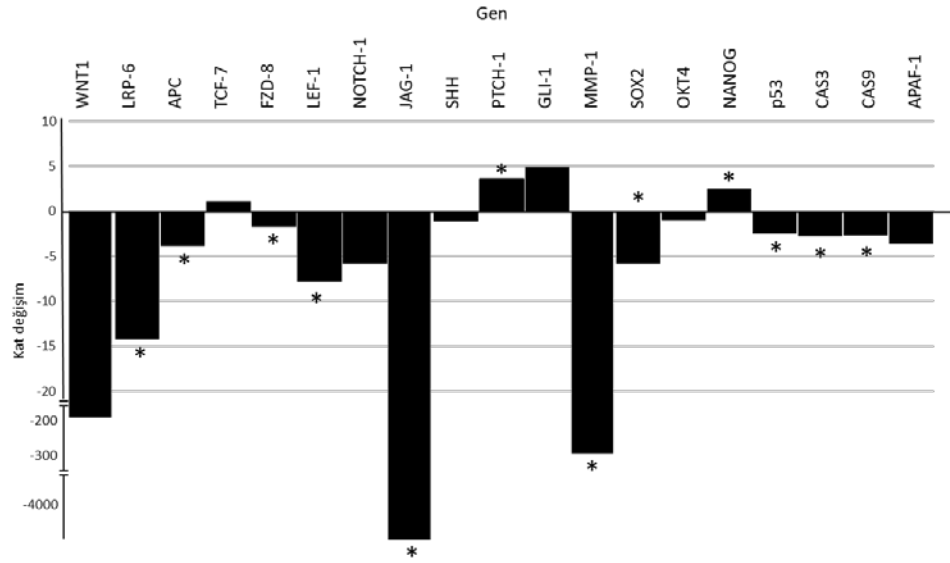


Şekil 4.14. Apoptoz yolağında önemli genlerin agoroz jel görüntüsü (M: 100 bp DNA marker)

qPZR sonuçlarına göre, MCF-7 kontrol ile Belinostat uygulanmış HEK-293 ve MCF-7 CD44+/CD24- kök hücrelerinde SMO ifadesi saptanmadığı için ilgili tablolarda gösterilmedi (Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17 )

MCF-7 hücre hattında Belinostat'ın apoptoz ile ilişkili CASP3, CASP9 ve p53 genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 2,80, 2,70 ve

2,52 kat azaltığı saptandı. Wnt yolağı genlerinden LRP-6, APC, FZD-8, LEF-1 genlerinde sırasıyla 14,27, 3,84, 1,76 ve 7,81 kat azalış saptandı. Notch yolağı genlerinden NOTCH-1 ve JAG-1 genlerinin sırasıyla 5,84 ve 4705,07 kat azalış saptandı. Hedgehog yolağı genlerinden PTCH-1'in 3,59 kat arttığı saptanmıştır. MMP1 geninde 300,25 kat azalış saptandı. Kök hücre markerlarından SOX2'de 5,84 kat azalış NANOG geninde ise 2,51 kat artış gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Diğer genlerin ifadesinde anlamlı bir değişiklik bulunamadı (Şekil 4.15).

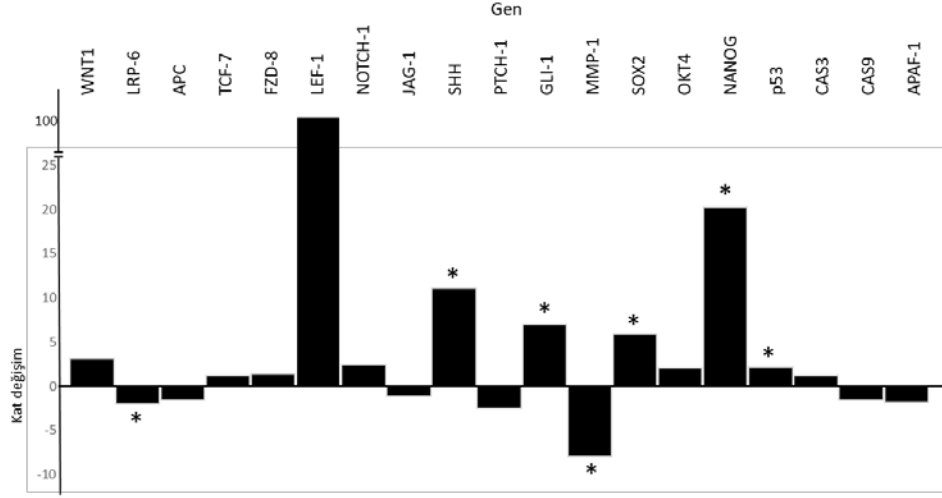


Şekil 4.15. Belinostat'ın MCF-7 hücreleri gen ifadeleri üzerine etkisi (\* $p < 0.05$ )

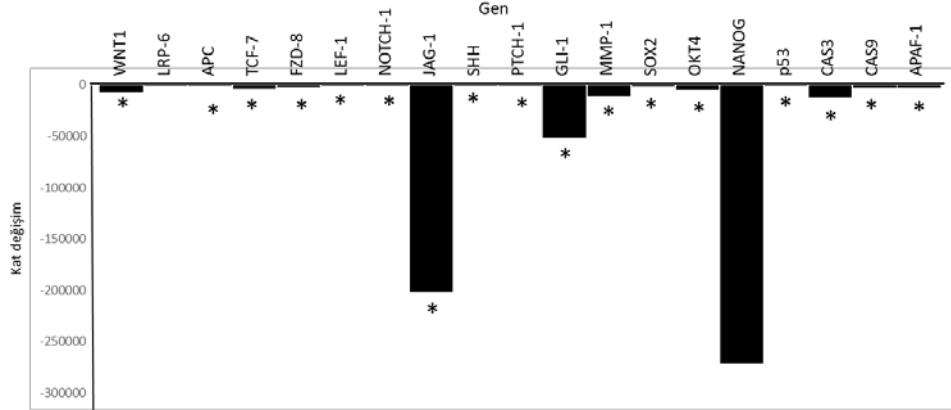
qPZR sonuçlarına göre, HEK-293 hücre hattında Wnt yolağı genlerinden LRP-6 1.96 kat azalış, Notch yolağı genlerinden NOTCH-1 2.39 kat artış, Hedgehog yolağı genlerinden ve GLI-1'de 6.98 ve SHH'de 11.06 kat artış saptandı (Şekil 4.16).

MCF-7 kök hücre hattında Belinostat'ın apoptoz ile ilişkili CASP3, CASP9, p53 ve APAF-1 genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 12568,28, 3109,57, 11,37 ve 3088,09 kat azaltığı saptandı. Wnt yolağı genlerinden WNT-1, APC, TCF-7, FZD-8, LEF-1 genlerinin ifadesinde sırasıyla 7070,03, 80,31, 3697,92, 2101,93 ve 362,67 kat azalış saptandı. Notch yolağı genlerinden NOTCH-1 ve JAG-1 genlerinin ifadesi sırasıyla 27,43 ve 201790,68 kat baskılanmış olduğu tespit edildi. Hedgehog yolağı genlerinden SHH, PTCH-1, GLI-1'in sırasıyla 468,91, 19,33, ve 51865,95 kat azaldığı gözlemlenmiştir. MMP1 geninde 11327,17 kat azalış saptandı. Kök hücre markırlarından SOX2'de 1604,05 kat azalış OCT-4 geninde ve

4862,56 kat azalış gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Diğer genlerin ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Belinostat'ın HEK-293 hücreleri gen ifadeleri üzerine etkisi (\* $p < 0,05$ )

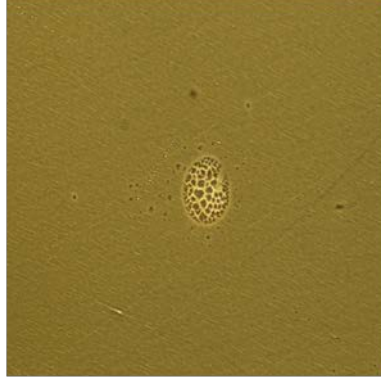


Şekil 4.17. Belinostat'ın MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök gen ifadeleri üzerine etkisi (\* $p < 0,05$ )

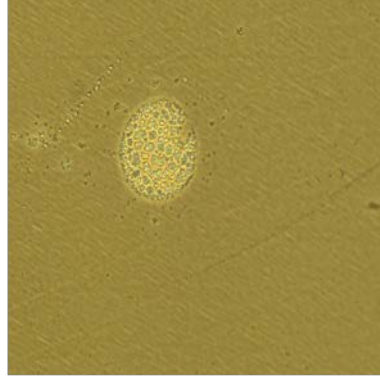
#### 4.6. Tümörfaz (sphere) oluşumu

MCF-7 hücrelerinden CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> yüzey belirteçleri kullanılarak akış sitometri ile KKH'leri izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen kanser kök hücreleri serumsuz medyunda kültüre edildi ve 13. günden itibaren tümörfaz oluşumu gözlemlendi. İzole edilen KKH'lerin varlığı tümörfaz tekniği ile doğrulandı. MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> KKH'lerin 13., 21. ve 34. günlerde mikroskop görünümü Şekil 4.18'de gösterildi. Tümörfaz oluşumu 60. güne kadar takip edildi, ancak gözlenen dağılımlardan dolayı 35. gün sonrası resimler eklenmedi.

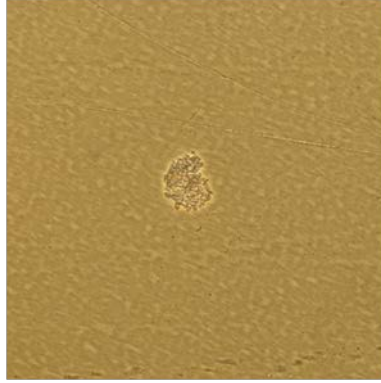
13. Gün (10X)



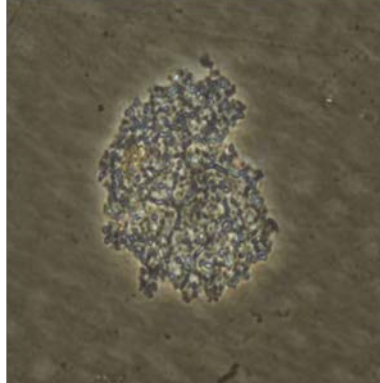
21. Gün (10X)



34. Gün (10X)



34. Gün (40X)



Şekil 4.18. MCF-7 kök hücrelerde tümörfaz oluşumu

## 5. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin anormal farklılaşması ve kontrolsüz olarak çoğalması ile karakterize bir hastalıktır. Dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) tarafından Dünya genelinde kanser görülme sıklığının 2018 yılında, son 6 yılda 4 milyon daha artarak 18 milyon olduğu ve bu yıl içerisinde 9.6 milyon insanın kanserden öldüğü rapor edilmiştir. Dünya genelinde artan kanser insidansı kansere etkin tedavide yeni yaklaşımlar oluşturulması gereğini doğurmuştur. Meme kanseri dünya genelinde olduğu gibi Türkiye’de de kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olmaya devam etmektedir (Siegel ve ark. 2016).

Kanser oluşumunu tümör baskılayıcı genler veya onkogenlerdeki fonksiyonel değişikliklerle beraber epigenetik mekanizmaların varlığı da etkilemektedir. DNA metilasyonları, histon modifikasyonları, nükleozomların yeniden düzenlenmesi ile değişen kromatin yapıları kansere giden süreci etkilemektedir (You ve Jones 2012). Günümüzde kansere yeni tanı ve tedavi yöntemleri geliştirmek için epigenetik değişimleri hedef alan çalışmalar devam etmektedir. DNA metilasyonunu ve histon modifikasyonunu değiştirebilen ajanlar keşfedilmiş ve klinik olarak test edilmektedir (Egger ve ark. 2004).

DNMTi (DNA metiltransferazlar inhibitör), HATi (Histon asetiltransferaz inhibitör), HDACi (Histon deasetilaz inhibitör) ve HDMi (Histon demetilaz inhibitör) antikanser tedavilerde kullanılan epigenetik ilaçlardır. Histon asetilasyonu, HAT ve HDAC enzimleriyle dinamik bir denge ile sağlanmaktadır. Bu enzimler önemli hücresel olayları etkilediği için potansiyel ilaçların hedefi olmaktadır ve bu enzimleri baskılayan farklı bileşikler tanımlanmıştır. HDACi, HDAC enzim aktif bölgesine bağlanarak histonların asetile formda kalmasını sağlamakta ve gen ifadesini değiştirmektedir (Berger 2007).

*In vitro*, *in vivo* ve klinik faz çalışmaları sonucunda farklı HDACi’lerinin antikanserojenik etkileri farklı kanser türlerinde tespit edilmiştir. Hatta HDACi’lerinin kemoterepaik ajanlar ve/veya radyoterapi ile beraber uygulanmasının sinerjik ve toplamalı etkileri gözlenmiştir (Eckschlager ve ark. 2017 tarafından derlenmiştir). Belinostat, periferal T hücreli lenfoma tedavisi için FDA tarafından 2014’te onaylanan bir histon deasetilaz inhibitörüdür. Belinostat ve diğer histon

deasetilaz inhibitörlerinin etkinliği kanser ve maling olmayan hastalıklarda klinik çalışmaları halen devam etmektedir (Campell ve Thomas 2017). Belinostat'ın 5-fluorouracil (5-FU) ile kolon kanserinde combine kullanılması *in vitro* ve *in vivo* ortamda antikanser etkinliğini sinerjik olarak artırdığı tespit edilmiştir (Tumber ve ark. 2007).

Bu tez çalışmasında, Belinostat'ın meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve MCF-7 den elde edilen CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>lü kanser kök hücreler üzerindeki etkinliği araştırıldı. Belinostat'ın MCF-7 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için XTT analizi yapıldı. MCF-7 hücre hattında 48. saat sonunda Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değeri 5 µM olarak belirlendi. Literatürde Belinostat'ın farklı hücre hatlarında farklı farklı sitotoksik doz kullanımı ve etkileri hakkında veri bulunmaktadır (Dejligbjerg ve ark. 2008). Dejligbjerg ve ark. (2008), 18 farklı hücre hattında 48. saat sonunda Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değerini 0,23 µM (RPM8226 Multiple myeloma) ve 5,92 µM (BT-549 Meme kanseri) arasında değiştirdiğini bildirmektedir. Bu çalışmada, 48. saat sonunda Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değeri MCF-7 hücre hattında 0,54 µM olarak tespit edilmiştir (Dejligbjerg ve ark. 2008). Diğer bir çalışmada ise Belinostatın MCF-7 hücre hattında 48. saat sonunda IC<sub>50</sub> değeri MTT analizi ile 0,4 µM olarak tespit edilmiştir (Androustopoulos ve Spandidos 2017). Ancak, bu farklılıkların kullanılan sitotoksite analiz yönteminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. PLC/PRF/5, HEP3B ve HepG2 hepatocellüler hücre hattında Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 2.49 µM, 2.78 µM ve 1.55 µM olarak bulunmuştur (Ma ve ark. 2010). Buckley ve ark. (2007) yaptığı çalışmada mesane karsinomu 5637 hücre hattında Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değeri 48. saatte 5 µM olarak bulunmuş ve hücre büyümesini baskılamıştır. Bu bulgular, mevcut tez çalışması ile uyumluluk göstermektedir. HCT116 kolon kanser hücre hattında Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değeri 48. saatte 0.28 µM olarak bulunmuştur ve hücre proliferasyonunu baskılanmıştır (Tumber ve ark. 2006). SK-MEL-28 Melanoma kanseri hücre hatlarında Belinostat'ın IC<sub>50</sub> değeri 48. saatte 4.42 µM olarak bulunmuştur (Dejligbjerg ve ark. 2008). Glioblastoma LN-229 ve LN-18 hücre hatlarında hücre canlılığına Belinostat'ın etkisi MTT testi ile araştırılmış ve IC<sub>50</sub> değeri 48 saat için sırasıyla 0.5 µM ve 2 µM olarak bulunmuştur. Belinostat'ın hücre döngüsü kontrol noktaları ve anti-proliferatve etkisi flow sitometri ile belirlenmiştir. LN-229 ve LN-18 hücre hatlarında 48 saat 2 µM doz uygulandığında kontrol grubuna kıyasla S fazında önemli bir azalış saptanmıştır. Dolayısıyla hücre proliferasyonunu S fazında durdurduğu

belirlenmiştir ve p21gen ifadesinin artışı ile doğrulanmıştır (Kusaczuk ve ark. 2016). Benzer bir çalışmada; Pankreas kanseri T3M4, AsPC-1 ve Panc-1 hücre hatlarında Belinostat'ın etkinliği araştırılmış ve MTT testi ile IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 48 saat için 1 µM, 2 µM ve 3 µM olarak bulunmuştur. Belinostat'ın pankreas kanser hücrelerinde hücre büyümesinin engellenmesini p21 ifade artışı ile olduğunu göstermiştir (Dovzhanskiy ve ark. 2012). Bu çalışmasında da MCF-7 için IC<sub>50</sub> dozu MCF-7 hücrelerinde Belinostat uygulanmayan grup ile uygulanan grup kıyaslandığında zaman ve doza bağlı olarak canlılıkta azalma tespit edildi. Mevcut literatür bilgiler farklı HDACi'lerin ve Belinostatın genel olarak düşük µM dozlarda sitotoksik etkisini göstermektedir. Bu bulgular, Belinostat örneğinde HDCAi'lerin farklı hücre hatlarında farklı sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

MCF-7 hücreleri için belirlenen IC<sub>50</sub> değeri aynı zamanda HEK-293 hücrelerine de uygulandı ve invert mikroskopta incelendi. Belirlenen IC<sub>50</sub> dozunun HEK-293 hücrelerinin morfolojisinde MCF-7 de olduğu gibi etkili olmadığı gözlemlendi. Belinostat uygulaması sonrası MCF-7 ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> KKH'de kendini yenileme yollarında önemli genlerin gen ifadesi HEK-293 sağlıklı hücrelerine göre daha fazla baskılanmıştır. Belinostat'ın kanser hücreleri üzerinde etkili fakat sağlıklı hücrelerde aynı etkiyi göstermemesi Belinostat'ın uygun bir antikanser ajan aday olduğunu kanserde terapötik olarak kullanılmasının doğru bir yaklaşım fikrini olduğunu desteklemektedir.

Tümörlerde bulunan kanser kök hücrelerin oranı kanser tipine göre %0.1-30 arasında değiştiği bildirilmiştir (Vinogradov ve Wei 2012). Dolayısıyla Belinostat'ın kök hücre üzerindeki etkisini araştırmadan önce kültüre edilen ve Belinostat uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücre oranı tespit edildi. Akım sitometri analizi sonucunda MCF-7'den izole edilen MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücre miktarı %2 olarak belirlendi. Bu bulguların Fillmore ve Kuperwasser (2008) çalışmasından elde edilen bulgular ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

HDACi'lerin (örneğin Abexinostat, Vorinostat ve Valporic acid) meme kanseri kök hücre miktarını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Salvador ve ark. 2013). Bir HDCAi olan Panobinostat'ın HCC1937 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattından izole edilen meme kanseri kök hücrelerinde proliferasyonu baskıladığı bulunmuştur (Takabe ve ark. 2011). Benzer bir çalışmada da, Valporik asit ve Vorinostat'ın meme kanseri kök hücrelerinde SUM159 ve MDA-MB-231 hücre popülasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Sharma ve ark. 2010; Dvorakova ve

ark. 2013). Mevcut tez çalışmasında ise Belinostat uygulamasından sonra MCF-7'den izole edilen CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kanser kök hücre miktarında %66 oranında azalma tespit edilmiştir. HDACi'lerin meme kanseri kök hücrelerinde etkileri ile yapılan çalışmalarla bu tez çalışmasının bulguları benzerlik göstermektedir.

FACS analizi sonucunda elde edilen kök hücrelerin varlığı tümörfaz tekniği ile doğrulandı. Kök hücrelerin serumsuz süspaniyon koşullarında tümörfaz oluşturarak hayatta kaldıkları bildirilmiştir (Wolman ve ark. 1997). Mevcut tez çalışmasında, MCF-7 hücrelerinden izole edilen CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kanser kök hücrelerinin serumsuz ortamda tümörfaz oluşturduğu gözlemlendi. Dolayısıyla izole edilen hücrelerin kök hücre olduğu doğrulandı. Engelmann ve ark. (2008) ile Hwang-Verslues ve ark. (2009) yaptıkları çalışmalarda da CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücrelerinin tümörfaz oluşturdukları bildirilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışmadan elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu bulundu. Li ve ark. (2018), SUM159 ve MCF-7 hücrelerinden elde edilen meme kanseri kök hücrelerinin tümörfaz oluşturma kabiliyetinde olduğunu göstermişlerdir. Benzer bir çalışmada da MCF-7 hücrelerinden elde edilen meme kanser kök hücrelerinin serumsuz ortamda tümörfaz oluşturduğu gözlenmiştir (Aztopal ve ark. 2018).

Histone deasetilaz inhibitörlerinden SAHA, Belinostat ve CG006'ın HCT116 (kolon kanseri) ve K562 (lösemi) hücre hatlarında kaspaz-3 aktivitesini artırarak apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Hwang ve ark. 2009). Belinostat'ın tiroid kanser hücre hattı BHP7-13, WRO82-1, 8505C hücre hatlarında kaspaz-3 aktivitesi test edilmiş ve BHP7-13 ve 8505C hücre hatlarında WRO82-1 hücre hattına göre artmış kaspaz-3 aktivitesi saptanmıştır (Lin ve ark. 2013). Eckschlager ve ark. (2017) Belinostat ve diğer histon deasetilaz inhibitörlerinin kanser hücrelerinde sitotoksik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle Belinostat'ın MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkisinin nedeninin araştırılması için kaspaz-3 testi yapıldı ve apoptozun içsel yolağında önemli genlerin analizi qPZR ile yapıldı. Kaspaz-3 aktivitesinde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. Apoptozun içsel yolağında görev alan genlerde ise anlamlı bir azalma gözlemlendi. Mevcut bulgular MCF-7 hücrelerinde Belinostat'ın sitotoksik etkinin apoptozun içsel yolağından kaynaklanmadığı gösterdi. Belinostat'ın MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etkisinin hücre döngüsü kontrol noktalarında ve apoptozun dışsal yolağında genlerin görev alan genler üzerine etkilerinin araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

HDCA inhibitörlerinin antikanser etki mekanizmaları aynı değildir. Etki

mekanizmaları kanser türüne ve HDCAi dozu ile uygulama süresine ve bunun yanında diğer çok farklı etkene göre değişiklik gösterebilir (Kretsovali ve ark. 2012). Çoğu kanser türünde HDAC'ler tarafından histon 3 ve histon 4'de lizinden asetilasyonu uzaklaştırdığı gösterilmiştir (Legube ve Trouche 2003). Farklı kanser ve KKH'de HDCA'lerin aşırı ifadesi gözlenmiştir (Witt ve ark. 2008). Bundan dolayı son araştırmalar, HDACi ile çeşitli kanser ve KKH'nin hedefe yönelik tedavisinde kullanılmaya odaklanmıştır (Bolden ve ark. 2006). Belinostat'ın kanser hücreleri üzerinde etkinliği farklı çalışmalarda araştırılmıştır, ancak literatürde kanser kök hücreler üzerinde nasıl bir etki gösterdiğine dair yeterli bilgi henüz bulunmamaktadır. Buckley ve ark. (2007), *in vivo* Belinostat uygulaması sonrası fare mesane tümör dokularını kullanarak mikroarray teknolojisi ile global gen ekspresyon düzeylerini araştırmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, Belinostat uygulaması hücre sinyalizasyonunda görev alan toplam 34 genin ifadesini etkilemiştir. Bu genlerden 19 tanesi anlamlı olarak baskılanmıştır. Ancak bu tez çalışmasına konu olan genlerin ifadesinde anlamlı bir değişiklik Buckley ve ark. (2007) tarafından bulunmamıştır.

Kanser kök hücrelerinin kendini yenileme özelliği Wnt/B-catenin, Notch, Hedgehog korunmuş yollar tarafından düzenlenmektedir (Duchartre ve ark. 2016). Kanser kök hücre gelişimde ve devamlılığında bu yollar görev almaktadır ve bu yolların anormal aktivasyonu çeşitli tümör tipleri ile ilişkilendirilmiştir. Bundan dolayı bu yollarını baskılayan tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (Takabe ve ark. 2011). Mevcut tez çalışmasında, Wnt, Notch ve Hedgehog yollarının MCF-7 hücre hattında ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> hücrelerinde etkinliği araştırıldı. Belinostat uygulamasından sonra MCF-7 hücre hattında Wnt yolağı genlerinin ifadesinde azalma tespit edildi. Bu çalışma, Wnt sinyal yolağı inhibisyonunun kanser gelişimini engellediğini bildiren çalışmaları (Xiao ve ark. 2003; De ve ark. 2015; Jansen ve ark. 2015) ile uyumluluk göstermektedir. Wnt sinyal yolağını hedef alan ajanların geliştirilmesi bu yolağın anormal aktivitesi ile karakterize hastalıklar için umut taşımaktadır. Hsieh ve ark. (2017), HDAC3 inhibisyonunun  $\beta$ -catenin degradasyonuna sebep olarak TNBC hücrelerinde kanser kök hücre proliferasyonunu azalttığı bildirilmiş olup, bu bulgularda tez çalışmasının sonuçlarına uyumluluk göstermektedir.

Belinostat uygulanmasından sonra MCF-7 hücrelerinde ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücrelerinde kendini yenileme yollarından Notch yolağı genleri

ifadesinin azaldığı tespit edildi. Benzer bir çalışmada AR-42 ve SAHA HDACi'lerinin TNBC hücre hattında kanser kök hücre popülasyonunun azalmasını Notch1 gen ifade azalması ile ilişkilendirilmiştir (Chao ve ark. 2016).

Hedgehog sinyal yolağının meme kanseri devamlılığında rolü olduğu ve bu yolda görev alan genlerden GLI-1'in ifadesinin meme kanseri hücrelerinde arttığı bildirilmiştir (Kubo ve ark. 2004). Bundan dolayı bu yolağı inhibe ederek kanser devamlılığının engellenmesi amaçlanmıştır. Mevcut tez çalışmasında Belinostat uygulamasından sonra MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücrelerinde Hedgehog yolağından PTCH-1, SHH, GLI-1 ifadesinde anlamlı bir azalış tespit edildi. Benzer bir çalışmada 4SC-202 HDACi'nin bazal hücre karsinomada Hedgehog sinyal yolağını baskıladığı bildirilmiştir (Gruber ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, Belinostat MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücre miktarında azalmaya sebep oldu. Kök hücre miktarındaki azalma da etkili olabilecek mekanizmalar arasında kendini yenileme (Wnt, Notch ve Hedgehog) yollarının ve kök hücre belirteçlerinin baskılanıp farklılaşma kapasitesinin değiştirilmesi olabilir. Nitekim bu tez çalışmasında, Belinostat'ın MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> KKH'de kök hücre belirteçleri olarak kabul edilen SOX-2 ve Oct-4 genlerin ifadesinde anlamlı bir azalışa neden olduğu gösterildi. Belinostat kendini yenileme faktörlerini baskılayarak kök hücrenin farklılaşmasını desteklediği ve kanser kök hücre miktarında azalışa neden olduğu düşünülmektedir. Ancak, KKH miktarındaki azalmanın nedeni olabilecek diğer biyolojik yolların da araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

HDAC inhibitörleri kanserde bloke veya suprese edilmiş apoptotik yolların tekrar kazanmasını sağlayabilir (Liu ve ark. 2003). Fakat bu çalışmada Belinostat uygulaması sonrasında apoptoz genleri ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada hücre proliferasyonunun baskılanmasında apoptoz mekanizmasının rolü olmayabilir. Çünkü Belinostat apoptoz genlerinin (p53, Apaf-1, CASP3, CASP9) promotör bölgesindeki H3 ve H4 histonlarının asetilasyonu gerçekleşmemiş olabileceği düşünülmektedir. Hücre döngüsünü çeşitli noktalarda durduran ve siklin bağımlı kinazların (p21 vs) Belinostat ile ilişkisinin araştırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

MMP1 (Matrix metalloproteinase-1), matriks metalloproteinaz ailesinin bir üyesidir ve anormal ifadesi tümör metastası ile ilişkilendirilmiştir. Wang ve ark. (2017)'de yaptıkları bir çalışmada, immünohistokimya analizi ile MMP1

ifadesinin meme kanseri dokularında anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, Belinostat MCF-7 ve MCF-7 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kök hücre metastaz MMP1 ifadesinde azalmaya neden olmuştur. Dolayısıyla MMP1 ekspresyon durumu, meme kanseri için önemli bir prognostik gösterge haline gelmiştir ve potansiyel bir ilaç hedefidir.

Bu çalışmada Belinostat uygulamasının özellikle CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> kanser kök hücrelerinde çalışmaya konu olan genlerin ifadesini dramatik olarak baskıladığı tespit edilmiştir. HDACi'lerin antikanser aktivitesinin doz ve hücre hattı, HDACi sınıfına ve henüz tanımlanmış diğer faktörlere göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir (Eckschlanger ve ark 2017). HDACi'ler etkilerini farklı hücre sinyalizasyonu, apoptoz, hücre döngüsü, hücre farklılaşması, anjiyogenez ve metastaz vb. yollarını eş zamanlı etkileyerek pleiotropik etkiler sergilemektedir (Androustopoulos ve Spandidos 2017). Yukarıda da tartışıldığı gibi, Belinostat örneği dahil farklı HDAC inhibitörleri sitotoksik etkilerini düşük dozlarda göstermektedir. Qian ve ark. (2008), PC-3 prostat kanseri hücrelerinde kısa süreli (<12 saat) Belinostat uygulamasının hücre çoğalmasını baskıladığını, 24 saat ve daha uzun süreli uygulamaların ise hücre çoğalmasını tamamen baskıladığını bildirmektedir. Aynı çalışmada, 48 saat düşük doz (1 µM) Belinostat uygulaması sonrası PC-3 hücreleri çoğalabilme yetenekleri tekrar kazanabilirken daha yüksek (4 µM) doz uygulamalarında hücrelerin çoğalmadıkları gözlenmiştir. Bu çalışmada tespit edilen ve analizlerde kullanılan nispeten daha yüksek IC<sub>50</sub> Belinostat dozu ve uygulama süresinin MCF-7 ve KKH'de şiddetli genotoksik etkiye ve doğası gereği pleiotropik etkilerin bir sonucunda çalışmaya konu olan yollarda görev alan genlerin ifadesinin baskılanmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Epigenetik ve fizyopatolojisinin moleküler düzeyde tanınması yeni nesil ilaçlar ve alternatif tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Kelly ve ark. 2010). DNMT ve HDAC inhibitörlerinin kombine kullanımının sinerjik etkisi gözlenmiştir (Kristensen ve ark. 2009). Dolayısıyla, meme kanseri üzerinde DNMTi ve HDACi'lerin kombine etkisini içeren ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında bir histon deasetilaz inhibitörü olan Belinostat'ın MCF-7 ve MCF7 CD44+/CD24- kanser kök hücrelerde etkinliği araştırıldı. Çalışmanın sonuçlarına göre;

- Belinostat'ın MCF-7 hücrelerinde XTT analizi sonucu IC<sub>50</sub> değeri 48. saat için 5 µM olarak belirlendi.
- Kaspaz-3 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bir artış tespit edildi.
- FACS analizi sonucunda MCF-7'den izole edilen MCF-7 CD44+/CD24- kök hücre oranı %2 olarak belirlendi.
- Tümör sphere testi ile tümörfaz oluşumu gözlemlendi ve KKH'lerin varlığı doğrulandı.
- Belinostat'ın 5 µM dozunda 48 saat muamelesinden sonra MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla %44, MCF-7 CD44+/CD24- KKH oranında ise %66 azalma gözlemlendi.
- Kendini yenileme yollarında önemli genlerin ifadesinde azalma gözlemlendi.
- Metastaz yolağında rol alan bazı genlerin ifadesinde azalma gözlemlendi.

Bu sonuçlar değerlendirildiği zaman; HDCAi'ler anti-kanser ve anti-KKH ajan olarak kullanılabilirliği için daha sofistike *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- Akhter J, Chen X, Bowrey P, Bolton EJ, Morris DL. Vitamin D3 analog, EB1089, inhibits growth of subcutaneous xenografts of the human colon cancer cell line, LoVo, in a nude mouse model. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(3):317-321.
- Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol*. 2011;223(2):147-161.
- Allan AL, Vantyghem SA, Tuck AB, Chambers AF. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis*. 2006-2007; 26:87-98.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(7):3983-3988.
- Allred DC. Ductal carcinoma in situ: terminology, classification, and natural history. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2010;2010(41):134-138.
- Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, MeyerL, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-99.
- Androutsopoulos VP, Spandidos DA. Antiproliferative effects of TSA, PXD-101 and MS-275 in A2780 and MCF7 cells: Acetylated histone H4 and acetylated tubulin as markers for HDACi potency and selectivity. *Oncol Rep*. 2017;38(6):3412-3418.
- Apuri S, Sokol L. An overview of investigational histone deacetylase inhibitors (HDACis) for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016;25(6):687-696.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284(5415):770-776.
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*. 1995;268(5208):225-232.
- Avcılar H, Saraymen B, Özturan O, Köker M. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler. *Asthma Allergy Immunol*. 2018;16:1-10.
- Aztopal N, Erkisa M, Erturk E, Ulukaya E, Tokullugil AH, Ari F. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chem Biol Interact*. 2018;280:51-58.
- Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*. 2009;28(40):3513-3525.
- Bakker MF, Peeters PH, Klaasen VM, Bueno-de-Mesquita HB, Jansen EH, Ros MM, Travier N, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Rinaldi S, Romieu I, Brennan P, Boutron-Ruault MC, Perquier F, Cadeau C, Boeing H, Aleksandrova K, Kaaks R, Kühn T, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Vineis P, Krogh V, Panico S, Masala G, Tumino R, Weiderpass E, Skeie G, Lund E, Quirós JR, Ardanaz E, Navarro C, Amiano P, Sánchez MJ, Buckland G, Ericson U, Sonestedt E, Johansson M, Sund M, Travis RC, Key TJ, Khaw KT, Wareham N, Riboli E, van Gils CH. Plasma carotenoids, vitamin C, tocopherols, and retinol and the risk of breast cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(2):454-464.
- Bamodu OA, Kuo KT, Yuan LP, Cheng WH, Lee WH, Ho YS, Chao TY, Yeh CT. HDAC inhibitor suppresses proliferation and tumorigenicity of drug-resistant chronic myeloid leukemia stem cells through regulation of hsa-miR-196a targeting BCR/ABL1. *Exp Cell Res*. 2018;370(2):519-530.
- Bao L, Cardiff RD, Steinbach P. Multipotent luminal mammary cancer stem cells model tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):137.
- Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009;457(7229):608-611.

- Bassuk SS, Manson JE. Oral contraceptives and menopausal hormone therapy: relative and attributable risks of cardiovascular disease, cancer, and other health outcomes. *Ann Epidemiol.* 2015;25(3):193-200.
- Battle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature.* 2005;435(7045):1126-1130.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature.* 2004;432(7015):324-231.
- Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83000 women with breast cancer from 16 countries. *Lancet.* 2004;363(9414):1007-1016.
- Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 2007;447(7143):407-412.
- Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;(11):674-690.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22(4):625-634.
- Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol.* 1996;6(3):298-304.
- Boesch M, Zeimet AG, Fiegl H, Wolf B, Huber J, Klocker H, Gastl G, Sopper S, Wolf D. High prevalence of side population in human cancer cell lines. *Oncoscience.* 2016;3(3-4):85-87.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):769-84.
- Boon EM, Keller JJ, Wormhoudt TA, Giardiello FM, Offerhaus GJ, van der Neut R, Pals ST. Sulindac targets nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signalling in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis and in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2004;90(1):224-229.
- Bray SJ. Notch signaling: a simple pathway becomes a complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):678-689.
- Brzozowa-Zasada M, Piecuch A, Dittfeld A, Mielańczyk Ł, Michalski M, Wyrobiec G, Harabin-Słowińska M, Kurek J, Wojnicz R. Notch signalling pathway as an oncogenic factor involved in cancer development. *Contemp Oncol (Pozn).* 2016;20(4):267-272.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005;122(6):947-956.
- Buckley MT, Yoon J, Yee H, Chiriboga L, Liebes L, Ara G, Qian X, Bajorin DF, Sun TT, Wu XR, Osman I. The histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) suppresses bladder cancer cell growth in vitro and in vivo. *J Transl Med.* 2007;12(5):49.
- Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Rowden D, Solky AJ, Stearns V, Winer EP, Griggs JJ. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol.* 2014;32(21):2255-2269.
- Campbell P, Thomas CM. Belinostat for the treatment of relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *J Oncol Pharm Pract.* 2017;23(2):143-147.
- Can A. Kök Hücre, Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2014. s.327-426. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer.* 2006;42(9):1257-1272.
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2329-2334.

- Chao MW, Chu PC, Chuang HC, Shen FH, Chou CC, Hsu EC, Himmel LE, Huang HL, Tu HJ, Kulp SK, Teng CM, Chen CS. Non-epigenetic function of HDAC8 in regulating breast cancer stem cells by maintaining Notch1 protein stability. *Oncotarget*. 2016;7(2):1796-1807.
- Cheang MC, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, Chia S, Shepherd L, Ruiz-Borrego M, Calvo L, Alba E, Carrasco E, Caballero R, Tu D, Pritchard KI, Levine MN, Bramwell VH, Parker J, Bernard PS, Ellis MJ, Perou CM, Di Leo A, Carey LA. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. *Oncologist*. 2015;20(5):474-482.
- Chen Y, Jiang L, Gao B, Cheng ZY, Jin J, Yang KH. Survival and disease-free benefits with mastectomy versus breast conservation therapy for early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;157:517-525.
- Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, Lane DS, Johnson KC, Wactawski-Wende J, Chen C, Qi L, Yasmeen S, Newcomb PA, Prentice RL. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(8):526-635.
- Chuthapisith S, Eremin J, El-Sheemey M, Eremin O. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol*. 2010;19(1):27-32.
- Colvin H, Mori M. Getting to the heart of the matter in cancer: Novel approaches to targeting cancer stem cells. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017;93(3):146-154.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2012;13(11):1141-1151.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10946-10951.
- Çetin A, Oral A. The biology and plasticity of stem cells: progress and promise. *Erciyes Medical Journal*. 2010;(4):275-282.
- Dandawate PR, Subramaniam D, Jensen RA, Anant S. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2016;40(41):192-208.
- De Monte C, Carradori S, Gentili A, Mollica A, Trisciuglio D, Supuran CT. Dual Cyclooxygenase and Carbonic Anhydrase Inhibition by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for the Treatment of Cancer. *Curr Med Chem*. 2015;22(24):2812-8.
- De Beça FF, Caetano P, Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J, Schmitt F. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol* 2013;(66):187-191.
- DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52:249-73.
- Dejligbjerg M, Grauslund M, Christensen IJ, Tjørnelund J, Buhl Jensen P, Sehested M. Identification of predictive biomarkers for the histone deacetylase inhibitor belinostat in a panel of human cancer cell lines. *Cancer Biomark*. 2008;4(2):101-109.
- Diaz D, Prieto A, Reyes E, Barcenilla H, Monserrat J, Alvarez-Mon M. Flow cytometry enumeration of apoptotic cancer cells by apoptotic rate. *Methods Mol Biol*. 2015;1219:11-20.
- Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research, *Nat Biotechnol*. 2009;27:44-46.
- Dvorakova M, Nencka R, Dejmek M, Zbornikova E, Brezinova A, Pribylova M, Pohl R, Migaud ME, Vanek T. Synthesis of alkylcarbonate analogs of O-acetyl-ADP-ribose. *Org Biomol Chem*. 2013 14;11(34):5702-5713.
- Dovzhanskiy DI, Arnold SM, Hackert T, Oehme I, Witt O, Felix K, Giese N, Werner J. Experimental in vivo and in vitro treatment with a new histone deacetylase inhibitor belinostat inhibits the growth of pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2012;8(12): 226.
- Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;99:141-149.

- Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128(9):1004-1022.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011 27;378(9793):771-784.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* 2011;378(9804):1707-1716.
- Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).E1414.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429(6990):457-463.
- Engelmann K, Shen H, Finn OJ. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res.* 2008;68(7):2419-2426.
- Ettenberg SA, Charlat O, Daley MP, Liu S, Vincent KJ, Stuart DD, Schuller AG, Yuan J, Ospina B, Green J, Yu Q, Walsh R, Li S, Schmitz R, Heine H, Bilic S, Ostrom L, Mosher R, Hartlepp KF, Zhu Z, Fawell S, Yao YM, Stover D, Finan PM, Porter JA, Sellers WR, Klagge IM, Cong F. Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockage of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(35):15473-15478.
- Fábián Á, Vereb G, Szöllösi J. The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy. *Cytometry A.* 2013;83(1):62-71.
- Farvid MS, Chen WY, Michels KB, Cho E, Willett WC, Eliassen AH. Fruit and vegetable consumption in adolescence and early adulthood and risk of breast cancer: population based cohort study. *BMJ.* 2016;11;353:23-43.
- Faupel-Badger JM, Arcaro KF, Balkam JJ, Eliassen AH, Hassiotou F, Lebrilla CB, Michels KB, Palmer JR, Schedin P, Stuebe AM, Watson CJ, Sherman ME. Postpartum remodeling, lactation, and breast cancer risk: summary of a National Cancer Institute-sponsored workshop. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(3):166-174.
- Feizi H, Tajreh RV, Manesh NR. The effect of training problem-based learning on the quality-of-life symptom scales in patients suffering from breast cancer. *J Family Med Prim Care.* 2018;7(6):1203-1208.
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2): R25.
- Gabai-Kapara E, Lahad A, Kaufman B, Friedman E, Segev S, Renbaum P, Beeri R, Gal M, Grinshpun-Cohen J, Djemal K, Mandell JB, Lee MK, Beller U, Catane R, King MC, Levy-Lahad E. Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(39):14205-14210.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555-567.
- Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ, Hortobagyi GN. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(4):290-303.
- Goldthwaite, C. Are stem cells involved in cancer?. The Institutes of Health (NIH), 2011;ch.9: 89-90p.

- Golestaneh N, Mishra B. TGF-beta, neuronal stem cells and glioblastoma. *Oncogene*. 2005;24(37):5722-5730.
- Goodarzi N, Ghahremani MH, Amini M, Atyabi F, Ostad SN, Shabani Ravari N, Nateghian N, Dinarvand R. CD44-targeted docetaxel conjugate for cancer cells and cancer stem-like cells: a novel hyaluronic acid-based drug delivery system. *Chem Biol Drug Des*. 2014;83(6):741-752.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:48-58.
- Gruber W, Peer E, Elmer DP, Sternberg C, Tesanovic S, Del Burgo P, Coni S, Canettieri G, Neureiter D, Bartz R, Kohlhof H, Vitt D, Aberger F. Targeting class I histone deacetylases by the novel small molecule inhibitor 4SC-202 blocks oncogenic hedgehog-GLI signaling and overcomes smoothed inhibitor resistance. *Int J Cancer*. 2018;142(5):968-975.
- Haas JS, Hill DA, Wellman RD, Hubbard RA, Lee CI, Wernli KJ, Stout NK, Tosteson AN, Henderson LM, Alford-Teaster JA, Onega TL. Disparities in the use of screening magnetic resonance imaging of the breast in community practice by race, ethnicity, and socioeconomic status. *Cancer*. 2016;122:611-617.
- Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G, Shi J, Avila C, Polikoff J, Bernstein L, Enger SM, Press MF. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(10):1848-55.
- Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(2):77-84.
- Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(18):6613-6624.
- Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*. 2004;5(7):738-843.
- Hsieh HY, Chuang HC, Shen FH, Detroja K, Hsin LW, Chen CS. Targeting breast cancer stem cells by novel HDAC3-selective inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2017;140:42-51.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intra flagellar transport proteins. *Nature*. 2003;426(6962):83-87.
- Hwang ES, Lichtensztajn DY, Gomez SL, Fowble B, Clarke CA. Survival after lumpectomy and mastectomy for early stage invasive breast cancer: the effect of age and hormone receptor status. *Cancer*. 2013;119:1402-1411.
- Hwang JJ, Kim YS, Kim MJ, Jang S, Lee JH, Choi J, Ro S, Hyun YL, Lee JS, Kim CS. A novel histone deacetylase inhibitor, CG0006, induces cell death through both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Anticancer Drugs*. 2009;20(9):815-821.
- Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, Jeng YM, Shew JY, Kung JT, Chen CH, Lee EY, Chang KJ, Lee WH. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One*. 2009;4(12):83-77.
- Jansen SR, Holman R, Hedemann I, Frankes E, Elzinga CR, Timens W, Gosens R, de Bont ES, Schmidt M. Prostaglandin E2 promotes MYCN non-amplified neuroblastoma cell survival via beta-catenin stabilization. *J. Cell Mol. Med*. 2015;19:210-226.
- Karaşahin T. Embriyonik Kök Hücreler. *Erciyes Üniv Vet Fak Dergi*. 2012; 9(1) 65-71.
- Karagöz E. Kordon kanı kök hücreleri ve kordon kanı bankacılığı tarihçesi. *Güneş Tıp Kitabevi*; 2007; 20:325-346.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004;431(7009):707-712.
- Kejřk Z, Jakubek M, Kapláneř R, Králová J, Mikula I, Martásek P, Král V. Epigenetic agents in combined anticancer therapy. *Future Med Chem*. 2018;10(9):1113-1130.

- Keller G, Snodgrass HR. Human embryonic stem cells: the future is now. *Nat Med.* 1999;5(2):151-152.
- Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1069-1078.
- Kidd S, Kelley MR, Young MW. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol Cell Biol.* 1986;6(9):3094-3108.
- Kimelman D, Xu W. Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene.* 2006 4;25(57):7482-7491.
- Kirschstein RL. Stem cells: scientific progress and future research directions. National Institutes of Health, Washington: Department of Health and Human Services; 2001.
- Kretsovali A, Hadjimichael C, Charmpilas N. Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Stem Cells Int.* 2012;2012:184-154.
- Krämer H. RIPPING notch apart: a new role for endocytosis in signal transduction? *Sci STKE.* 2000 25;2000(29):pe1.
- Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol.* 2009 25;625(1-3):131-142.
- Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10.
- Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008;4(2):68-75.
- Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci.* 2002;115(6):1095-1097.
- Koren E, Fuchs Y. The bad seed: Cancer stem cells in tumor development and resistance. *Drug Resist Updat.* 2016;28:1-12.
- Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cells as a two edged sword-from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol* 2006;57:5-16.
- Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64(17):6071-4.
- Kusaczuk M, Krętowski R, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor - belinostat - in glioblastoma cell lines: a preliminary report. *Invest New Drugs.* 2016;34(5):552-564.
- La Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *Oncologist.* 2011;16(6):726-729.
- Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Dekmezian C, Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells.* 2012;30:833-844.
- Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood.* 2009;114(6):1150-1157.
- Lambertini M, Santoro L, Del Mastro L, Nguyen B, Livraghi L, Ugolini D, Peccatori FA, Azim HA Jr. Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Treat Rev.* 2016;49:65-76.
- Legube G, Trouche D. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep.* 2003;4(10):944-947.
- Li Y, Atkinson K, Zhang T. Combination of chemotherapy and cancer stem cell targeting agents: preclinical and clinical studies. *Cancer Lett.* 2017;3835(17):30-172.
- Li GG, Li L, Li C, Ye LY, Li XW, Liu DR, Bao Q, Zheng YX, Xiang DP, Chen L, Chen J. Influence of up-regulation of Notch ligand DLL4 on biological behaviors of human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2013;19(28):4486-4494.
- Li X, Wang X, Xie C, Zhu J, Meng Y, Chen Y, Li Y, Jiang Y, Yang X, Wang S, Chen J, Zhang Q,

- Geng S, Wu J, Zhong C, Zhao Y. Sonic hedgehog and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways mediate curcumin inhibition of breast cancer stem cells. *Anticancer Drugs*. 2018;29(3):208-215.
- Lin Y, Zhong Y, Guan H, Zhang X, Sun Q. CD44+/CD24- phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012; 31:59.
- Lin SF, Lin JD, Chou TC, Huang YY, Wong RJ. Utility of a histone deacetylase inhibitor (PXD101) for thyroid cancer treatment. *PLoS One*. 2013;8(10):77684.
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7336):68-73.
- Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21 (WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*. 2003;6(4):183-195.
- Liu S, Liu H, Pan Y, Tang S, Xiong J, Hui N, Wang S, Qi Z, Li L. Human embryonic germ cells isolation from early stages of post-implantation embryos. *Cell Tissue Res*. 2004;318(3):525-531.
- Liu H, Gu D, Xie J. Clinical implications of hedgehog signaling pathway inhibitors. *Chin J Cancer*. 2011;30(1):13-26.
- Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Womens Health (Lond)*. 2015;11(1):65-77.
- Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23:675-99.
- Lo PK, Kanojia D, Liu X, Singh UP, Berger FG, Wang Q, Chen H. CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin-TGF $\beta$  signaling. *Oncogene* 2012;31:2614-2626.
- Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchiew J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(8):2883-8288.
- Lu D, Choi MY, Yu J, Castro JE, Kipps TJ, Carson DA. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 9;108(32):13253-13257.
- Ma BB, Sung F, Tao Q, Poon FF, Lui VW, Yeo W, Chan SL, Chan AT. The preclinical activity of the histone deacetylase inhibitor PXD101 (Belinostat) in hepatocellular carcinoma cell lines. *Invest New Drugs*. 2010;28(2):107-114.
- Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2011;481(7379):85-89.
- Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955-960.
- Manal M, Chandrasekar MJ, Gomathi Priya J, Nanjan MJ. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorg Chem*. 2016; 67:18-42.
- Marks H, Kalkan T, Menafrá R, Denissov S, Jones K, Hofemeister H, Nichols J, Kranz A, Stewart A, F, Smith A, Stunnenberg HG. The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell*. 2012;149:590-604.
- Martinez JE, Beck JR, Allsbrook WC Jr, Pantazis CG. Flow cytometric DNA analysis. *Clin Lab Sci*. 1990;3(3):180-183.
- Matteucci E, Giampietro O. Flow cytometry study of leukocyte function: analytical comparison of methods and their applicability to clinical research. *Curr Med Chem*. 2008;15(6):596-603.
- McLaughlin F, La Thangue NB. Histone deacetylase inhibitors open new doors in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(6):1139-1144.

- Melnikow J, Fenton JJ, Whitlock EP, Miglioretti DL, Weyrich MS, Thompson JH, Shah K. Supplemental Screening for Breast Cancer in Women with Dense Breasts: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force 2016, *Ann Intern Med.* 2016;164: 268-278.
- Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog-a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res.* 2010;16(12):3130-3140.
- Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer. *Curr Mol Med.* 2006;6(8):905-918.
- Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2002;3(1):REVIEWS3001.
- Mirkin S. Evidence on the use of progesterone in menopausal hormone therapy. *Climacteric.* 2018;9:1-9.
- Mohr OL. Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in *Drosophila*. *Genetics.* 1919;4(3):275-282.
- Moselhy J, Srinivasan S, Ankem MK, Damodaran C. Natural products that target cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2015;35(11):5773-5788.
- Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, Chang LJ. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact.* 2012;195:52-60.
- Mullendore ME, Koorstra JB, Li YM, Offerhaus GJ, Fan X, Henderson CM, Matsui W, Eberhart CG, Maitra A, Feldmann G. Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(7):2291-2301.
- Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(2):133-143.
- Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 1982;31(1):99-109.
- 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;64(2):231.
- Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 2005;(1):28-32
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007;445(7123):106-110.
- Okuda H, Kobayashi A, Xia B, Watabe M, Pai SK, Hirota S, Xing F, Liu W, Pandey PR, Fukuda K, Modur V, Ghosh A, Wilber A, Watabe K. Hyaluronan Synthase HAS2 promotes tumor progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer stem-like cells with macrophages and stromal cells. *Cancer Res.* 2012;72:537-547.
- Okoye UC, Malbon CC, Wang HY. Wnt and Frizzled RNA expression in human mesenchymal and embryonic (H7) stem cells. *J Mol Signal.* 2008;3:16.
- Ong PS, Wang L, Chia DM, Seah JY, Kong LR, Thuya WL, Chinnathambi A, Lau JY, Wong AL, Yong WP, Yang D, Ho PC, Sethi G, Goh BC. A novel combinatorial strategy using Seliciclib (®) and Belinostat (®) for eradication of non-small cell lung cancer via apoptosis induction and BID activation. *Cancer Lett.* 2016;10;381(1):49-57.
- Oskarsson T, Battle E, Massagué J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell.* 2014 6;14(3):306-21.
- Park MA, Kumar A, Jung HS, Uenishi G, Moskvina OV, Thomson JA, Slukvin II. Activation of the arterial program drives development of definitive hemogenic endothelium with lymphoid potential. *Cell Rep.* 2018 22;23(8):2467-2481.
- Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell.* 2015;16(3):225-238.
- Pizot C, Boniol M, Mullie P, Koechlin A, Boniol M, Boyle P, Autier P. Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer.* 2016;52:138-154.

- Preston DL, Mattsson A, Holmberg E, Shore R, Hildreth NG, Boice JD Jr. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res.* 2002;158(2):220-35.
- Raha D, Wilson TR, Peng J, Peterson D, Yue P, Evangelista M, Wilson C, Merchant M, Settleman J. The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res.* 2014 1;74(13):3579-3590.
- Riether C, Schürch CM, Flury C, Hinterbrandner M, Drück L, Huguenin AL, Baerlocher GM, Radpour R, Ochsenbein AF. Tyrosine kinase inhibitor-induced CD70 expression mediates drug resistance in leukemia stem cells by activating Wnt signaling. *Sci Transl Med.* 2015 29;7(298):298-319.
- Rietze RL, Reynolds BA. Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol.* 2006; 419:3-23.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1673-1684.
- Salvador MA, Wicinski J, Cabaud O, Toiron Y, Finetti P, Josselin E, Lelièvre H, Kraus-Berthier L, Souza FH, Wendland EM, Rosa MI, Polanczyk CA. Is full-field digital mammography more accurate than screen-film mammography in overall population screening? A systematic review and meta-analysis. *Breast.* 2013;22(3):217-224.
- Schabath H. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci.* 2006;119:314-325.
- Schabath H, Runz S, Joumaa S, Altevogt P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 2):314-325.
- Sharkis SJ. Canadian stem cell scientists take the prize. *Cell.* 2005;122(6):817-819.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(1):27-36.
- Shim Y, Song JM. Quantum dot nanoprobe-based high-content monitoring of notch pathway inhibition of breast cancer stem cell by capsaicin. *Mol Cell Probes.* 2015;29(6):376-381.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66:7-30.
- Siegel R, Miller K, Jemal A. *Cancer Statistics, 2018.*
- Sin WC, Lim CL. Breast cancer stem cells—from origins to targeted therapy. *Stem Cell Investig.* 2017;4:96.
- Singh BN, Fu J, Srivastava RK, Shankar S. Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: molecular mechanisms. *PLoS One.* 2011;6(11): 27306.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401.
- Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Côté D, Means TK, Luster AD, Scadden DT, Lin CP. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature.* 2005;435(7044):969-973.
- Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, Luker GD. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2004;64(23):8604-8612.
- Smith A. Pluripotent stem cells: private obsession and public expectation. *EMBO Mol Med.* 2010;2(4):113-116.
- So JY, Wahler J, Das Gupta S, Salerno DM, Maehr H, Uskokovic M, Suh N. HES1-mediated inhibition of Notch1 signaling by a Gemini vitamin D analog leads to decreased CD44(+)/CD24(-/low) tumor-initiating subpopulation in basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;148:111-121.

- Souza FH, Wendland EM, Rosa MI, Polanczyk CA. Is full-field digital mammography more accurate than screen-film mammography in overall population screening? A systematic review and meta-analysis. *Breast*. 2013;22(3):217-224.
- Spillane B, Henderson MA. Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg*. 2007;77(6):464-468.
- Starzl TE. Acquired immunologic tolerance: with particular reference to transplantation. *Immunol Res*. 2007;38(1-3):6-41.
- Steg AD, Burke MR, Amm HM, Katre AA, Dobbin ZC, Jeong DH, Landen CN. Proteasome inhibition reverses hedgehog inhibitor and taxane resistance in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5(16):7065-7080.
- Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer*. 2006 ;42(9):1257-1272.
- Sun X, Fan C, Hu LJ, Du N, Xu CW, Ren H. Role of let-7 in maintaining characteristics of breast cancer stem cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2012;28(8):789-792.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872.
- Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(2):97-106.
- Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, Yang SX, Ivy SP. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(8):445-464.
- Teo JL, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(12):1149-1155.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.
- Tumber A, Collins LS, Petersen KD, Thougard A, Christiansen SJ, Dejligbjerg M, Jensen PB, Sehested M, Ritchie JW. The histone deacetylase inhibitor PXD101 synergises with 5-fluorouracil to inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;60(2):275-283.
- Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, Hartman AR, Winer EP, Garber JE. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(13):1460-1468.
- Valencia A, Román-Gómez J, Cervera J, Such E, Barragán E, Bolufer P, Moscardó F, Sanz GF, Sanz MA. Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(9):1658-1666.
- Van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdaal NA, van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004;60(1):1-13.
- Van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 2009;136(19):3205-3214.
- Van Phuc P, Nhan PL, Nhung TH, Tam NT, Hoang NM, Tue VG, Thuy DT, Ngoc PK. Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> breast cancer cells. *Onco Targets Ther*. 2011;4:71-78.
- Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*. 2008;22(18):2454-72.
- Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge JW, Grootegoed JA. Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in

- developing the CA cells. *Endocrinology*. 2005;146(8):3558-3566.
- Villas BH. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis*. 1998;5(1):56-61.
- Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2012;7(4):597-615.
- Vitfell-Rasmussen J, Judson I, Safwat A, Jones RL, Rossen PB, Lind-Hansen M, Knoblauch P, Krarup-Hansen A. A Phase I/II clinical trial of Belinostat (PXD101) in combination with doxorubicin in patients with soft tissue sarcomas. *Sarcoma*. 2016;2016: 2090271.
- Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters JC Jr, deSavauge FJ, Low JA. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1164-1172.
- Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, North TE, Goessling W, Feng Z, Zon LI, Armstrong SA. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*. 2010;327(5973):1650-1653.
- Wang J, Ye C, Lu D, Chen Y, Jia Y, Ying X, Xiong H, Zhao W, Zhou J, Wang L. Matrix metalloproteinase-1 expression in breast carcinoma: a marker for unfavorable prognosis. *Oncotarget*. 2017 24;8(53):91379-91390.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells*. 2007;9(1):3-7.
- Winston MK, Davey HM. Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods*. 2000;21(3):231-240.
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*. 2009 8;277(1):8-21.
- Wu CP, Zhou L, Xie M, Tao L, Zhang M, Tian J. Isolation and in vitro characterization of CD133(+) side population cells from laryngeal cancer cell line. 2011;46(9):752-757.
- Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*. 2008;10: R10.
- Wolman SR, Heppner GH, Wolman E. New directions in breast cancer research. *FASEB J*. 1997;11(7):535-543.
- Xu Z, Wang Z, Jia X, Wang L, Chen Z, Wang S, Wang M, Zhang J, Wu M. MMGZ01, an anti-DLL4 monoclonal antibody, promotes nonfunctional vessels and inhibits breast tumor growth. *Cancer Lett*. 2016;372(1):118-127.
- Xia S, Zhang X, Li C, Guan H. Oridonin inhibits breast cancer growth and metastasis through blocking the Notch signaling. *Saudi Pharm J*. 2017;25(4):638-643.
- Xiao JH, Ghosn C, Hinchman C, Forbes C, Wang J, Snider N, Cordrey A, Zhao Y, Chandraratna RA. Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:29954-29996.
- Yamanaka S. Shinya Yamanaka: purveyor of pluripotency. Interview by Ruth Williams. *Circ Res*. 2013;112(2):233-235.
- Yamada T, Takaoka AS, Naishiro Y, Hayashi R, Maruyama K, Maesawa C, Ochiai A, Hirohashi S. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*. 2000 1;60(17):4761-4766.
- Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, Ding S. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(18):6907-6912.
- Yoon S, Eom GH. HDAC and HDAC Inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases. *Chonnam Med J*. 2016 ;52(1):1-11.

- You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*. 2012; 10;22(1):9-20.
- You S, Zhou J, Chen S, Zhou P, Lv J, Han X, Sun Y. PTCH1, a receptor of Hedgehog signaling pathway, is correlated with metastatic potential of colorectal cancer. *Ups J Med Sci*. 2010;115(3):169-175.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318:1917-1920.
- Zielske SP, Spalding AC, Wicha MS, Lawrence TS. Ablation of breast cancer stem cells with radiation. *Transl Oncol*. 2011;4:227-233.
- Zhou L, Sheng D, Wang D, Ma W, Deng Q, Deng L, Liu S. Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay. *Cell Biol Toxicol*. 2019;35(2):161-177.
- Zhang B, Zhou KK, Ma JX. Inhibition of connective tissue growth factor overexpression in diabetic retinopathy by SERPINA3K via blocking the WNT/beta-catenin pathway. *Diabetes*. 2010;59(7):1809-1816.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılı Konya Ereğli'de doğdum. Ortaöğretimimi Meram Mehmet Akif İnan Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra 2013 yılında Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2015 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. 2015 yılından bu yana KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

## 9. EK

### EK A. Etik Krul Kararı

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:52	Toplantı Tarihi: 16.06.2017
--------------------	-----------------------------

Karar Sayısı:2017/962:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ercan KURAR' ın "Belinostat'ın (PXD101) MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinde etkinliğinin araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 09.06.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Zeliha TUNCER' in yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ercan KURAR' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Ercan KURAR

Yardımcı araştırmacı: Zeliha TUNCER

ASELİ GİBİDİR

16.06.2017

Prof. Dr. Sami AÇIKGÖZOĞLU  
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı