DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLON KANSERİ FARKLILAŞMASINDA KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşenur BODUR

Mart, 2023

İZMİR

KOLON KANSERİ FARKLILAŞMASINDA KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı

Ayşenur BODUR

Mart, 2023

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

AYŞENUR BODUR, tarafından **DR.ÖĞR. ÜYESİ ASLI SADE MEMİŞOĞLU** yönetiminde hazırlanan **"KOLON KANSERİ FARKLILAŞMASINDA KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ARAŞTIRILMASI"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Dr. Öğr. Üyesi Aslı SADE MEMİŞOĞLU

Yönetici

.....	.....
Doç. Dr. Kerem CANLI	Doç. Dr. Kemal Uğur TÜFEKÇİ
Jüri Üyesi	Jüri Üyesi

Prof. Dr. Okan FISTIKOĞLU

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Lisans dönemimde moleküler biyoloji ve genetik derslerini sevdirmesiyle birlikte kendisiyle çalışma fırsatını da bana verdiği için, olumlu tavrıyla beni cesaretlendiren, her an yanımda olan, değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı SADE MEMİŞOĞLU'na çok teşekkür ederim. Diğer teşekkürüm ise bütün bilgilerini benimle paylaşıp tüm sorunlara çözüm olan Dr. Zehra TAVŞAN'adır.

Hayatımın her anında yanımda olan, bütün öğrenim sürecimde maddi ve manevi bütün desteklerini esirgemeyen babam Ahmet UYSAL, annem Nevruz UYSAL ve motivasyon konuşmaları ile beni güçlendiren kardeşim Enes UYSAL'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte hayatıma girip Ayşenur UYSAL olarak başladığım yüksek lisansımı Ayşenur BODUR olarak tamamlatan, deneylerimde benimle birlikte bekleyip tez yazma sürecimde bana sonsuz yardımcı olan çok sevdiğim güzel eşim Turhan BODUR'a çok teşekkür ederim.

Her zaman yardımcı olmak için elinden geleni yapan, sabırla benimle ilgilenen İzmir Biyotip ve Genom Merkezi Akış Sitometri ve Hücre Ayrımlama birim sorumlusu Zeynep KARAKAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2210-A 'Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı' ile 2020 Eylül ayında başlayıp, 2022 Ekim ayına kadar sağladıkları destek için teşekkür ederim.

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü tarafından 2021.KB.FEN.042 nolu 'Kolon kanseri farklılaşmasında kanser kök hücrelerinin araştırılması' isimli BAP projesi ile desteklenmiştir.

Ayşenur BODUR

KOLON KANSERİ FARKLILAŞMASINDA KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZ

Kolorektal kanser, dünyadaki en yaygın malign tümörlerden biri olup genellikle tedavi edilebilen bir kanser türüdür ancak kanser metastazları hastalığın ilerlemesini olumsuz etkiler. Karsinomada, farklılaşma-geri farklılaşma plastisitesi ile fenotipik plastisitenin sağlandığı ve bu özelliğe sahip hücrelerde kanser kök hücreleri (CSC) ve kanser kök hücresi olmayan durumlar arasında ileri geri geçiş yapıldığı gösterilmektedir. Daha az farklılaşmış olan kanser kök hücreleri, tümör popülasyonu içindeki orta ve iyi düzeyde farklılaşmış olan hücrelerden geri çevrilebilen bir farklılaşma ile oluşmaktadırlar. Bu süreci aydınlatmak metastazın ve ilaç direncinin aydınlatılması için önemli bir adımdır. Çalışmanın amacı, hücresel açıdan heterojen olan bir hücre hattında farklılaşmış ya da farklılaşmamış hücre popülasyonlarındaki dönüşüm mekanizması ile kanser kök hücreleri arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Bu amaçla, kültür koşullarında farklılaşma-geri farklılaşma yapabilen bir hücre hattı modeli kullanılmış ve farklılaşma süreci adımlarından elde edilen kanser kök hücre popülasyonlarının miktarı, hücre çoğalması, ilaç direnci, in vitro metastaz kapasitesi ve tümör oluşturma kapasitesi karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre, kullanılan hücre modelinde iki farklı kök hücre alt popülasyonu bulunmakta çeşitli karakteristik özellikler açısından farklılık göstermektedirler. CD44+ kök hücre popülasyonları içinde CD133+ olan alt popülasyon daha fazla hücre çoğalması ve metastaz özelliği gösterirken, CD133- olan popülasyon daha yüksek ilaç direnci ve tümör oluşturma kapasitesi sergilemiştir. Genel olarak, burada sunulan veriler, aynı hücre hattından köken alsa dahi, CD44 ve CD133 için geniş bir ifade aralığına sahip olduğunu göstermiştir. Dolayısı ile CSC'lerin tüm kolon kanseri hücreleri için tek belirteç veya aynı işaret seti ile karakterize edilmesi olası değildir.

Anahtar Kelimeler: İlaç direnci, kanser kök hücre, kolon kanseri, metastaz

INVESTIGATION OF CANCER STEM CELLS IN COLON CANCER DIFFERENTIATION

ABSTRACT

Colorectal cancer, one of the most common malignant tumors worldwide, is generally curable, but metastasis of cancer negatively affects the course of the disease. Plasticity of differentiation and reverse differentiation as well as phenotypic plasticity has been shown to be achieved in carcinomas, and cells with this property switch between cancer stem cells (CSC) and non-CSC. Less differentiated CSCs arise by reversible differentiation from moderately to well differentiated cells of the tumor population. Clarification of this process is an important step in elucidating metastasis. The aim of this study is to determine the relationship between CSCs and the mechanism of transformation in differentiated or undifferentiated cancer populations in a heterogeneous tumor. For this purpose, a cell line model capable of differentiation-redifferentiation under culture conditions was used, and the quantity, cell proliferation, drug resistance, and tumorigenicity of the CSC populations obtained from the differentiation process steps were compared. According to the results, there are two different subpopulations of stem cells in the cell model used and they differ in various characteristics. Among CD44+ stem cell populations, the CD133+ subpopulation showed greater cell proliferation and metastasis, while the CD133- population showed higher drug resistance and tumorigenicity. Overall, the data presented here showed that it has a wide expression range for CD44 and CD133, even if they originate from the same cell line. Thus, it is unlikely that CSCs can be characterized by a single marker or the same set of markers for all colon cancer cells.

Keywords: Drug resistance, colon cancer, cancer stem cells, metastasis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ..... **ii**

TEŞEKKÜR ..... **iii**

ÖZ ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **viii**

TABLOLAR LİSTESİ ..... **x**

BÖLÜM BİR - GİRİŞ 1

1.1 Kolonun Anatomisi 1

1.2 Kolorektal Kanser 3

1.3 Epitel-Mezenkimal Dönüşüm (EMT) 5

1.4 Kök Hücre ve Kanserde Kök Hücreler 7

1.4.1 Kanser Kök Hücre Belirteçleri *9*

1.4.1.1 CD133 9

1.4.1.2 CD44 10

1.5 Kanser Kök Hücrelerini Hedeflemenin Önemi 12

1.6 Kanser Kök Hücrelerinin Hedeflenmesi 15

BÖLÜM İKİ - MATERYAL ve YÖNTEM 18

2.1 Hücre Kültürü 18

2.2 Hücre Ayrımlama ile CSC'lerin tespiti ve ayrıştırılması 19

2.3 Hücre Çoğalması 19

2.4 Tümör Oluşturma Kapasitesi 19

2.5 Metastaz Kapasitesi 20
2.6 İlaç Direnci/Hassasiyeti 20
2.7 Akış Sitometri ile Epitel Belirteç olan CDX-2 İncelenmesi 20
2.8 İstatistiksel Analizler 21

BÖLÜM ÜÇ - BULGULAR 22

3.1 Farklılaşma Dönemlerinde HT-29 Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri 22
3.2 HT-29 Hücrelerinde Hücre Ayrımlama Sonrası CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ Oranları 23
3.3 CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ HT-29 Hücrelerinde Çoğalma 24
3.4 CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ HT-29 Hücrelerinde İlaç Direnci 26
3.5 CD133+/CD44+ ve CD133- /CD44+ HT-29 Hücrelerinde *in vitro* Tümör Oluşturma Kapasitesi 29
3.6 CD133+/ CD44+ ve CD133-/ CD44+ HT-29 Hücrelerinde *in vitro* Metastaz Kapasitesi 33
3.7 CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ HT-29 Hücrelerinde Epitel Belirteç olan CDX-2 İncelenmesi 35

BÖLÜM DÖRT - TARTIŞMA ve SONUÇ 37

KAYNAKLAR 43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Kolon epitelinin hücresel organizasyonu 2
Şekil 1.2 Her iki cinsiyet ve her yaşta Türkiye'de 2020 yılında gerçekleşen yeni vaka sayıları 3
Şekil 1.4 Epitelyal-mezenkimal geçişin şematik gösterimi 6
Şekil 1.5 Hücre tiplerinin farklı yerlerde konumlanmasını gösteren şema 7
Şekil 1.6 CD133 molekülünün şematik gösterimi 9
Şekil 1.7 Sıralı proteolitik işlemenin CD44 şematik gösterimi 11
Şekil 1.8 HT-29 MET-EMT modelinde farklılaşmış (a) ve geri farklılaşmış (b) belirteçler için Western blot. 17
Şekil 3.1 HT-29 hücreleri toplanmadan önce alınmış görüntüler 22
Şekil 3.2 HT-29 hücreleri için hücre ayrımlama sonrası iki kök hücre alt popülayonları. (a) aHT-29, fHT-29 ve gHT-29 hücrelerde CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ oranları; (b) aHT-29 hücrelerinde P6 kapısı CD133+/CD44+ ve P5 kapısı CD133-/CD44+; (c) fHT-29 hücrelerinde P9 kapısı CD133+/CD44+ ve P10 kapısı CD133- CD44+; (d) gHT-29 hücrelerinde P6 kapısı CD133+/CD44+ ve P7 kapısı CD133-/CD44+..... 24
Şekil 3.3 HT-29 hücrelerinde kök hücre alt popülasyonlarının bölünme süreleri 25
Şekil 3.4 HT-29 hücre popülasyonlarının çoğalması. (a) aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun 0., 24.ve 48. saate göre çoğalma hızları; (b) aHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun; (c) fHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun; (d) gHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun; 0., 24.ve 48. saate göre çoğalma hızları 26
Şekil 3.5 aHT-29 ve fHT-29 hücreleri alt popülasyonları için artan OP derişimlerinde hücre canlılığı 27
Şekil 3.6 aHT-29 ve fHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 5-FU ilacına gösterdikleri direnç 27
Şekil 3.7 HT-29 hücrelerinde oxaliplatin ve 5-florourasil için IC50 ilaç derişimleri 28

Şekil 3.8 aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinin günlere göre oluşturdukları sferoid sayısı. 29
Şekil 3.9 aHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 3.gün ve 7.gün 4X - 40X sferoid görüntüleri 30
Şekil 3.10 aHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücre alt popülasyonları için çap uzunlukları 31
Şekil 3.11 fHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 3.gün ve 7.gün 40X sferoid görüntüleri 31
Şekil 3.12 gHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 3.gün ve 7.gün 4X - 40X sferoid görüntüleri 32
Şekil 3.13 gHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücre alt popülasyonları için çap uzunlukları 33
Şekil 3.14 aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinin kök hücre popülasyonlarında göç eden hücrelerin sayısı 34
Şekil 3.15 HT-29 hücrelerinde göç yapabilen hücrelerin 40X görüntüleri..... 35
Şekil 3.16 aHT-29 hücrelerinden elde edilen iki kök hücre alt popülasyonu için (a) CDX-2 protein oranları, (b) CD133+/CD44+ hücrelerinde Q2 kapısı %7,8 CDX-2 + hücreler, (c) CD133-/CD44+ hücrelerinde Q2 kapısı %39,9 CDX-2 + hücreler 36

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 HT-29 hücrelerinde oxaliplatin ve 5-FU için IC50 ilaç derişimleri ……. 21

BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Kolonun Anatomisi

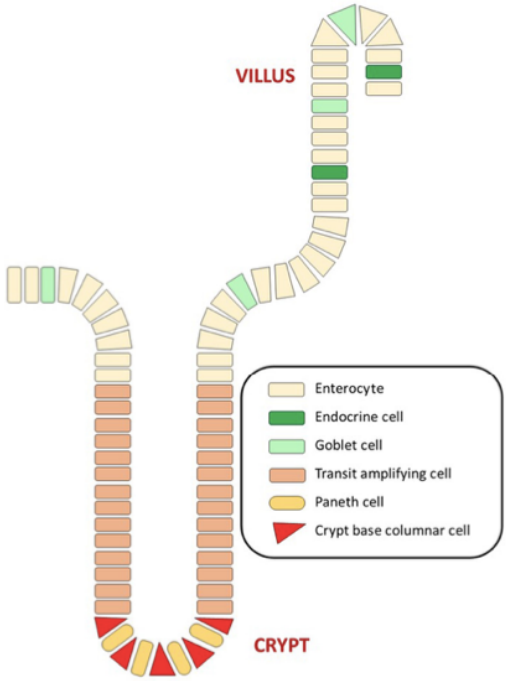
Kolon, maksimum çapı 6,5 cm ve uzunluğu 1,5 m olan bir tüptür. Kolon, periton ve retroperitoneal bölgede dalak, karaciğer, mide, ince bağırsak, duodenum, böbrekler, üreterler ve mesane gibi birçok organla komşudur.

Kalın bağırsak çekum, transvers kolon, çıkan kolon, sigmoid kolon, inen kolon ve rektum olarak ayrılır. Birinci kısma çekum denir. İleoçekal valv, ileum ve çekum arasında bulunur. Çekumdan karaciğerin sağ alt lobunun alt yüzeyine kadar uzanan çıkan kolon burada hepatik fleksurayı oluşturur. Yan ve ön yüzeyleri yaklaşık 15-20 cm uzunluğunda ve peritonla kaplıdır (Wıdmaıer, 2014). Hepatik fleksura ve splenik fleksura arasında uzanan transvers kolondur ve 50 santimetre uzunluğundadır. Splenik fleksuradan sol iliak fossaya kadar uzanan inen kolon ortalama 25 santimetre uzunluğundadır ve kolonun en kalın kas tabakasına sahiptir (Buğra, 2004). İnen kolonun terminal kısmı, anüste sonlanan kalın bağırsağa boşalan sigmoid kolonu oluşturan S şeklindedir. Sigmoid kolon, ortalama 40 cm uzunluğu ve 2,5 cm çapı ile kolonun en dar kısmıdır.

Kolonun işlevleri depolama, fermantasyon, emilim, salgılama ve hareketliliği içerir. Bağırsak hareketliliği sirkadiyen saate uyan bir ritme sahiptir (Erdoğan ve Lee, 2019). Tübüler bağırsak bezleri kolon mukozasının uzunluğu boyunca bulunur. Bağırsak bezleri ve lümeni enteroendokrin hücreler, su ve elektrolit absorbe eden hücreler ve kayganlaştırıcı goblet hücreleri ile kaplıdır. Emici hücreler düzensiz mikrovilluslara sahiptir ve absorbe edicinin hücreler arası alanı emilimi kolaylaştırmak için genişler (Mescher, 2013).

Kolonun lümen yüzeyi, parmak benzeri kıvrımlar ve çıkıntılar oluşturmak üzere katlanmış tek bir epitel hücre tabakasından oluşur. Bu kıvrımlar arasındaki boşluklar, bağırsağın işlevsel birimi olan Lieberkühn'ün kriptleri olarak bilinir. Yetişkin kolonu santimetre kare başına yaklaşık 14.000 kript içerir (Ricci-Vitiani vd., 2009). Bağırsak

kriptlerinin dibinde, bağırsak hücre tiplerini yeniden üretebilen pluripotent kök hücreler bulunur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Kolon epitelinin hücresel organizasyonu

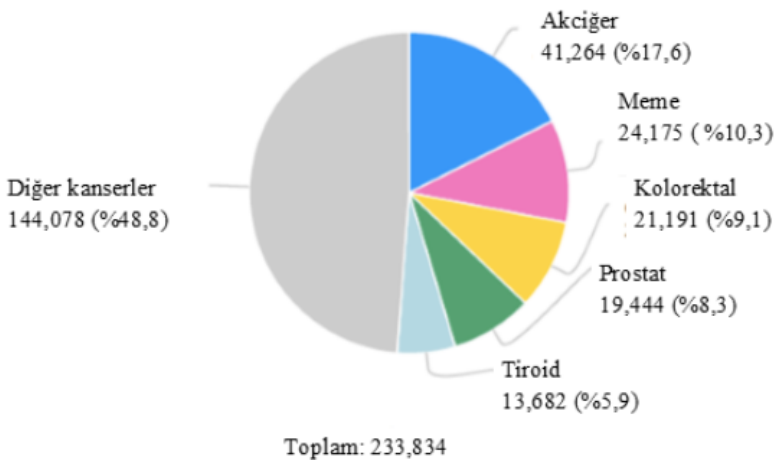
Kolon epiteli; entorositler, goblet hücreleri, endokrin hücreler ve Paneth hücreleri, kök hücrelerden gelişir. Enterositler, goblet hücreleri ve endokrin hücreler, luminal epitel yüzeyini ve kriptlerin üst yarısını kaplayarak kök hücrelerden farklılaşır. Paneth hücreleri farklılaşır ve kript tabanına doğru göç eder (Humphries ve Wright, 2008). Paneth hücrelerinin görevi, bazal kök hücre soyunun devamlılığını sağlamak için mukozal savunma bariyerini oluşturmak, sindirim sisteminin mikrobiyal florasını düzenlemek, büyüme faktörlerini ve diğer düzenleyici molekülleri sentezlemektir. Epitel hücrelerin farklılaşma yoluyla üretilmesi ve yüzeye yerleşmesi her beş günde bir gerçekleşir (Medema ve Vermeulen, 2011). Hücreler kriptlerden villuslara göç ederken bağırsak kriptlerinin tabanında bulunan kök hücreler farklılaştığında ve çoğaldığında bağırsak farklılaşması gerçekleşmiş olur (Barbareschi vd., 2003).

Tümör oluşumunun erken aşamalarında kript tabanındaki hücreler normal görünmektedir. Zamanla farklılaşarak yüzeye doğru hareket eden displastik hücreler,

değişken *APC* gen ifadelerine sahiptir ve diğer genlerinin ifadesi ise tümörün çeşidine bağlı olarak farklılık gösterir (Shih ve Kurman, 2001).

1.2 Kolorektal Kanser

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve hayatta kalması ile karakterize bir hastalıktır. Son 20 yılda kanser, gelişmiş ülkelerde ikinci önde gelen ölüm nedeni konumuna yükseldi ve dünya çapında bir sağlık sorunu haline geldi (Siegel vd., 2020). Yeni tahminlere göre, dünya çapında yeni teşhis konulan kanser hastası sayısı ve kanserden ölüm sayısı önceki tahminlere göre arttı. Kanser büyümesi bu hızda devam ederse, artan ve yaşlanan dünya nüfusu nedeniyle 2025 yılında 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı bildiriliyor (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017).

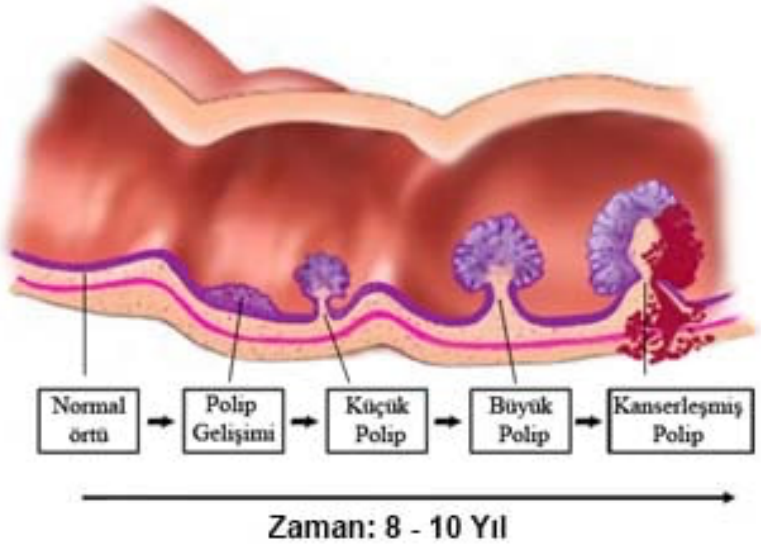


Şekil 1.2 Her iki cinsiyet ve her yaşta Türkiye'de 2020 yılında gerçekleşen yeni vaka sayıları

Dünya'da en çok tanı konulan - GLOBOCAN (Global Burden of Cancer Study) - kanser verilerine bakıldığında akciğer, meme ve kolon; kanserin neden olduğu ölümlerin ise en çok mide, karaciğer, akciğer ve kolorektal kanserden gerçekleştiği belirtilmiştir. 2020 yılında Türkiye'de gerçekleşmiş vaka ve ölümlere Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) verilerine göre inceleme yapıldığında 233.834 yeni kanser vakası ve 126.335 kansere bağlı ölüm kaydedildi. Yukarıdaki verilere göre, kolorektal kanser, Türk erkekleri ve kadınları arasında en sık görülen üçüncü kanserdir (Şekil 1.2).

Kolorektal kanser vakalarının %90'ı kolon ve rektum epitelinden gelişen adenokarsinomalardır (Fleming vd., 2012). Kalın bağırsak kanserlerinin yaklaşık %70'i inen kolonun orta noktasının altında meydana gelmektedir (inen %10, sigmoid %10, rektum %50). Geri kalanlar; sağ, orta ve üst inen kolonda meydana gelmektedir (%30) (Ulusal Kanser Enstitüsü 2020). Kolon kanseri en çok 50 yaşından sonra gözlense de her yaşta görülebilmektedir. Kolorektal kanserin Türkiye'de ortalama görülme yaşı 63'tür (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Dairesi Başkanlığı).

Hücrelerin anormal büyümesi kolon veya rektumda meydana geldiğinde, kolorektal kanser (KRK) olarak adlandırılmaktadır. Kalın bağırsakta görülen tüm tümörler KRK tanımı kapsamına girmektedir. Kolorektal kanserin kötü huylu tümörü, kanserli olmayan bir polipten (kolonun içini kaplayan glandüler hücreler) kaynaklanır (Armaghany vd., 2012). Polip, kolon veya rektumda gelişen ve adenokarsinomların neden olduğu kolorektal kanser vakalarının çoğunda adenomatöz polipler veya adenomlar olarak adlandırılır.



Şekil 1.3 Polipten kanser gelişimi (https://www.kolonrektum.com)

Kolorektal kanser, kolonun mukozasını kaplayan epitel hücrelerinden köken alır. Bu epitel hücreler bakteriler ve aynı zamanda bakterilerin ürettiği kimyasallar, besinlerle alınan kimyasallar gibi toksik ve kanserojen maddelere maruz kalırlar. Bu faktörlerle birlikte bazı genetik faktörlerin etkisi altında epitel hücrelerinin yenilenme

hızları da artmaktadır. Hücreler hızla çoğaldığında olgunlaşma yetersizlikleri ve neoplastik ve displastik hücrelere dönüşümü gerçekleşebilmektedir (Kuzu, 2010).

Sağlıklı hücreler ile kanser hücreleri arasındaki ilk temel fark, sağlıklı hücrelerin doku ve organizmanın hayatta kalması için dikkatli bir şekilde programlanması, kanser hücrelerinin ise bu kontrolü kaybederek sadece kendini yenilemesi ve çoğalmaya amaçlı programlanmış olarak tanımlanabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

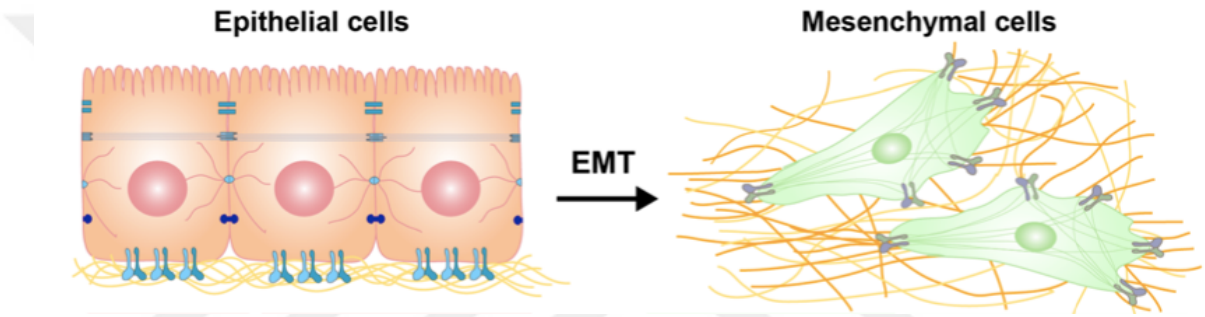
1.3 Epitel-Mezenkimal Dönüşüm (EMT)

EMT'nin embriyonik gelişim sırasındaki temel rolü ilk olarak 1980'lerin başında tanımlandı (Mjaatvedt ve Markwald, 1989) ve ardından yaralanmaya karşı fizyolojik tepkiler üzerindeki etkisi ortaya çıkarıldı (Zhou vd., 2013). Kanser hücrelerinin büyümesi, invazyonu ve metastazı ile EMT arasındaki ilişkinin keşfinden sonra 1990'ların başında kanser araştırmacılarının dikkatini çekti (Thompson vd., 1994).

Memeliler, morfoloji ve fonksiyon bakımından farklılık gösteren, esas olarak epitel ve mezenkimal olmak üzere iki hücre tipinden oluşur ve bu hücre tipleri her zaman kalıcı değildir (Acloque, 2009). Daha yakın zamanda keşfedildiği gibi, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ve ters mezenkimal-epitel geçiş (MET) olarak (Şekil 1.4) adlandırılan süreçler aracılığıyla, epitel ve mezenkimal fenotipler arasında hücrelerin ileri geri hareket etmesinin mümkün olduğu anlaşıldı (Ferrer-Vaquer vd., 2010; Kalluri ve Weinberg, 2009). Bu süreçlerin her ikisi de hücrelerin morfolojisi, hücre iskeleti ağları, adezyon ve migrasyon kapasitesindeki değişiklikleri yöneten biyolojik mekanizmaları içerir (Lee vd., 2006). EMT, oldukça farklılaşmış, polarize ve iyi organize edilmiş epitel hücrelerinin, mobil ve hücre dışı matriks salgılayan mezenkimal hücrelere dönüşmesine izin verir (Yang ve Weinberg, 2008). Mezenkimal hücrelerin apikal ve bazolateral alanlara polarize olduğu ve yapışık bağlantılarla ilişkili çoklu protein komplekslerini ifade ettiği MET işlemi ise, EMT'nin tersidir (Rodriguez-Boulan ve Macara, 2014).

Epitel hücreleri, sıkı bağlantılar, dezmozomlar, yapışık bağlantılar ve boşluk bağlantıları gibi özelleşmiş zar yapılarıyla sıkı bir şekilde bağlanır (Giepmans ve Van ıjzendoorn, 2009). Epitel hücrelerinin sitoplazması ve plazma zarı, moleküler

bileşimde önemli ölçüde farklılık gösteren bir apikal ve bazal eksen boyunca polarize edilmiştir (Müller ve Bossinger, 2003). Normal koşullar altında, epitel hücrelerinin altta yatan hücre dışı matrikse invazyonu bazal membran tarafından önlenir ve böylece epitel tabakasının bütünlüğü korunur (Roignot vd., 2013). Fibroblast benzeri iğ şeklindeki mezenkimal hücreler ise tam tersine ön-arka polaritesi gösterirler. Komşu hücrelerle nadiren doğrudan temas kuran mezenkimal hücreler, fokal adezyonlar yoluyla çevredeki hücre dışı matrikse gevşek bir şekilde bağlanır ve bazal membran ile ilişkili değildir. Bu da hücre göçünü ve uzak mesafeye tutunmayı artırmak için daha fazla hareketliliğe neden olur (Tsai ve Yang, 2013).



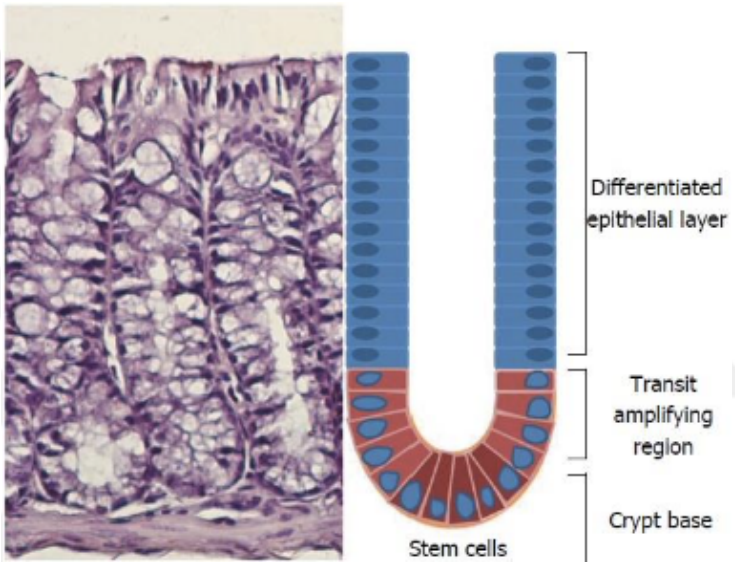
Şekil 1.4 Epitelyal-mezenkimal geçişin şematik gösterimi (O'Connor & Gomez, 2014)

Kolon kanserinin, farklılaşmış (epitel) hücrelerden geri farklılaşmış (mezenkimal) hücrelere geçiş mekanizmalarını detaylı olarak açıklamak için doğru bir kanser modeli olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. EMT, kolon kanserinde diğer kanser türlerinde olduğu gibi geri dönüşümlü bir program görevi görür (Bates ve Mercurio, 2005).

EMT, embriyogenez ve kanser metastazında önemli olan bir gelişimsel süreçtir. EMT geçiren tümör hücreleri, uzak bölgelere yayılım ve metastazını kolaylaştıran, hareket ve invazyon kabiliyetinde artış gösterir. Buna ek olarak apoptoz ve antitümör ilaçlara direnç kazanırlar, immün baskılamaya yardım eder ve kanser kök hücreleri (CSC) gibi davranırlar (Polyak ve Weinberg, 2009; Thiery vd., 2009). Örneğin meme kanserinde, EMT ve metastaz gelişimi ile ilgili iki transkripsiyon faktörü olan Twist ve Snail'in ektopik ekspresyonu, kök hücre belirteçlerinin ve tümörigenezin artmasına yol açarak EMT aktivasyonu ve CSC fenotipi arasında sıkı bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Mani vd., 2008).

1.4 Kök Hücre ve Kanserde Kök Hücreler

Kök hücreler kendilerini yenileme, uzun süre hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir ve tüm farklılaşmış hücreleri üretebilir (multipotent). Kolon epitelinin terminal olarak farklılaşmış tüm hücreleri, multipotent kök hücrelerden türetilir (Barker vd., 2008). Kolon epitelinin parmak benzeri girintileri olan kriptlerin alt kısmında kök hücreler bulunur (Şekil 1.5). Kök hücreler simetrik olmayan bir bölünme yoluyla kendilerini yenilerler ve transit çoğalan hücreler üretilir (Fanali vd., 2014). Kolonda terminal olarak farklılaşmış dört epitel hücresi vardır ve bunlar goblet hücreleri, kolonositler, Paneth hücreleri ve enteroendokrin hücreleridir (Şekil 1.1) (Sancho vd., 2003).



Şekil 1.5 Hücre tiplerinin farklı yerlerde konumlanmasını gösteren şema (Fanali vd., 2014)

Kök hücre nişlerinin, spesifik bir mikro ortam oluşturan hücresel bileşenler ve genellikle hücre dışı matriks tarafından oluşturulduğu kabul edilir. Bu spesifik mikroçevre, kök hücre nişinin, kök hücre özelliklerinin, farklılaşma ve apoptotik uyaranlardan korunmasında önemli olup, çeşitli sitokin büyüme faktörlerinin etkileşimi ve salgılanması yoluyla çoğalma ve farklılaşma arasındaki dengeyi doğrudan düzenlemede görev alır (Moore ve Lemischka, 2006). Kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması, bağırsak boşluğundaki bakterilerden veya epitel hücrelerinden kaynaklanan bileşenlerin yanı sıra bağırsağın subepitelyal miyofibroblastları tarafından salgılanan morfogenetik faktörlerden etkilenir (Medema ve Vermeulen, 2011).

Kanser hücrelerinin kök hücrelerle benzer özelliklere sahip olduğu fikri ilk olarak on dokuzuncu yüzyılda önerilmiştir (Huntly vd., 2005; Bignold vd., 2006). İlk kez 1840 yılında doku kesitlerini büyütüp inceleyen Alman patolog Johannes Müller tarafından tümör araştırmalarında rastlanmıştır. 1847'de Rudolf Virchow, tümör hücrelerinin normal hücrelerden dönüştüğünü fark etmiştir. 1874'te Durante, tümörlerin küçük bir kök hücre popülasyonundan oluştuğunu varsaymıştır (Oliveira, 2011). Kanser hücreleri ile kök hücreler arasındaki benzerlikler daha detaylı araştırmalarla ortaya konduğunda, kanser kök hücrelerinin normal kök/progenitör hücrelerden türediği anlaşılmıştır. Kanserin temelinin, gelişmekte olan embriyo hücrelerine benzer şekilde çoğalma, yenilenme ve farklılaşma yeteneğini sürdüren bir hücre olduğu sonucuna varılmıştır (Sell, 2004). Tümörlerin, tümör oluşturma yeteneğine sahip hücreleri içerdiği bulgusunun rapor edildiği çalışmada hastalardan tekrarlayan kanser hücreleri toplanmış ve hücreler farklı bölgelere ototransplante edilmiştir (Southam ve Brunschwig, 1961). Daha sonraki çalışmalar, *in vitro* koloni oluşumunu başlatabilen hücre grupları için benzer sonuçlar göstermiştir (Hamburger ve Salmon, 1977).

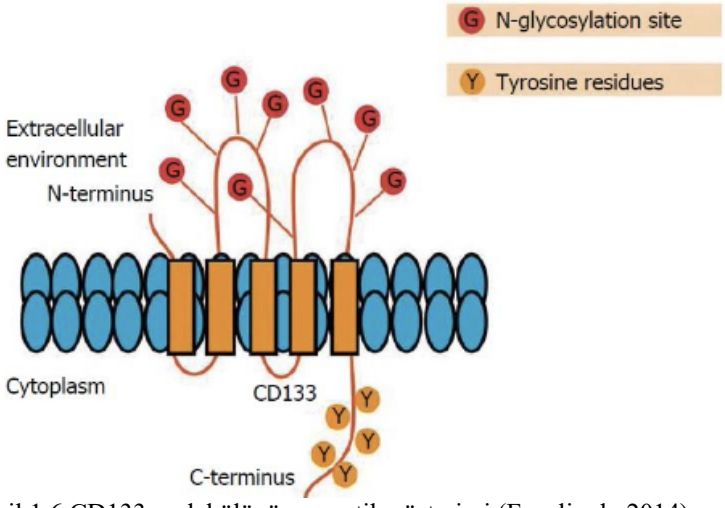
CSC'ler ayrıca tümör kök hücreleri (TSC'ler) veya tümör başlatan hücreler (TIC'ler) olarak da adlandırılır. Bunlar kök hücre özelliklerini içeren nadir tümör hücrelerinin bir popülasyonudur ve bu nadir hücreler, tümör dokularının başlatılmasından ve sürdürülmesinden sorumludur. CSC'ler, sıvı ve katı malignitelerde kanserin ilerlemesine ve terapötik direncine katılan hücreler olarak bilinir (Clarke vd., 2006). Birçok çalışma, kemoterapi ve radyoterapiye direncin, kolon dahil olmak üzere çeşitli katı tümörlerde bulunan kanser kök hücre alt popülasyonları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Todaro vd., 2007). CSC'ler normal kök hücrelere benzer özelliklere sahiptir ve CSC farklılaşma sürecini düzenleyen moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmadığından, CSC özelliklerini kök hücrelerden ayırt etmek zordur (Sengupta ve Cancelas, 2010). Bu nedenle, CSC'lerin izolasyonu ve karakterizasyonu, önemli terapötik etkileri olan kanser araştırmalarına yardımcı olmaktadır.

1.4.1 Kanser Kök Hücre Belirteçleri

Hücre yüzey belirteçleri, kök hücrelerin tanımlanması ve izolasyonu için kullanılır. Şimdiye kadar kullanılan belirteçlerin çoğu doku gelişimine dayalıdır ve hematopoietik veya embriyonik kök hücrelerden türetilmiştir. Diğer tümörlerin yanı sıra kolorektal kanser kök hücreleri üzerindeki araştırmalar, bu hücrelerin izolasyonu, *in vitro* amplifikasyonu ve karakterizasyonu için yararlı hücre zarı belirteçlerinin tanımlanması ve *in vivo* analizlerin geliştirilmesi ile karakterize edilmiştir. Kolorektal kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında en yararlı olan iki zar belirteci birleştirilmiştir: CD133 (Prominin-1) ve CD44 (Marzesco vd., 2005;Screaton vd., 1992). EpCAM, CD44, Lgr5, CD166, CD24 ve CD29 dahil olmak üzere son zamanlarda, diğer potansiyel CRC kök hücre belirteçleri tanımlanmıştır. CRC-SC'ler için daha kapsamlı biyobelirteçlerin tanımlanması, tümör büyümesinin ve ilerlemesinin temel mekanizması anlayışını geliştirecektir (Corbeil vd., 2000). CD133 ve CD44 hücre yüzey belirteçleri, CSC'leri tanımlamak için kullanılan en yaygın iki yüzey işaretleyicidir.

1.4.1.1 CD133

CD133, kök hücre belirteçlerinden biridir. CD133, kolon CSC'leri (O'Brien vd., 2007), medulloblastomlar ve glioblastomalar, yumurtalık, pankreas kanseri, hepatoselüler karsinom (HCC), insan deri melanomu, fare melanomu ve mide kanseri gibi katı primer tümörlerde CSC'lerin bir yüzey belirteci olarak önerilmiştir (Kusumbe vd., 2009).



Şekil 1.6 CD133 molekülünün şematik gösterimi (Fanali vd., 2014)

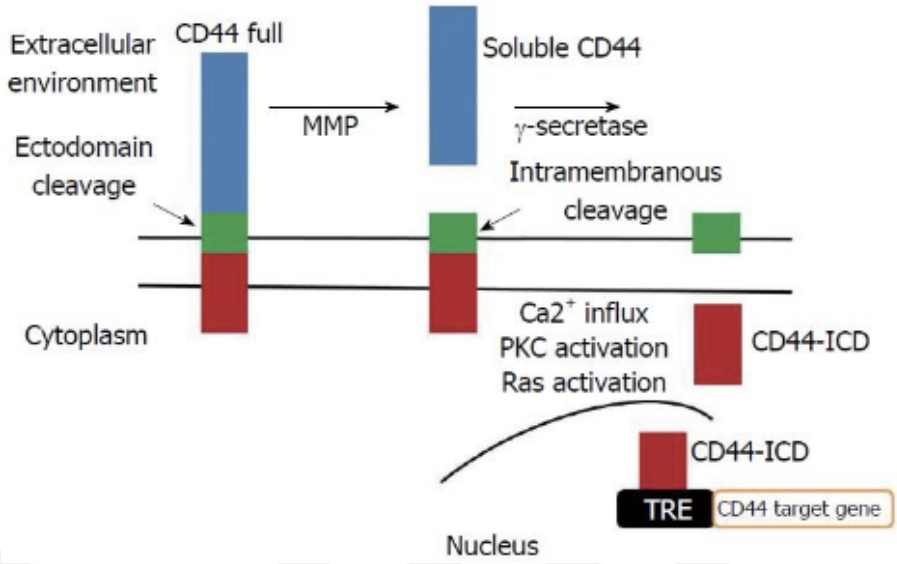
Prominin-1 (CD133) ilk kez sıçan nöroepitelyal kök hücrelerinde tanımlanmıştır (Weigmann vd., 1997). Daha sonra fetal karaciğer, kemik iliği ve kordon kanından izole edilen CD34+ kök hücrelere bir monoklonal antikor (AC133) üretilmiştir (Yin vd., 1997). İnsan CD133'ü, Prominin ailesine ait transmembran glikoproteindir (Şekil 1.6). CD133'ün plazma zarı topolojisinin bir "düzenleyicisi" olarak hareket etmektedir. Prominin-1'in hücrelerdeki işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte kolon dahil olmak üzere birçok CSC için bir belirteç olduğu bulunmuştur (O'Brien vd., 2007).

Kolorekral kanser CSC'lerini karakterize etmeye yönelik ilk çalışmalar, CD133+ hücrelerinin izole edilmesiyle başlamıştır (Li, 2013). Birincil kolon kanseri örneklerinden izole edildiğinde, bu hücreler farelerde tümör oluşturma yeteneğine sahiptir ve serumsuz ortamda kültürlendiklerinde farklılaşmamış kalır ve nesiller boyunca daha agresif hale gelir. CD133+ hücrelerinin interlökin-4 (IL-4) ürettiği ve bunu apoptozdan kaçmak için kullandığı gösterilmiştir. Bu özellik CD133+ hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara direncini ve bunların antitümör etkinliğini büyük ölçüde artırmaktadır (Todaro vd., 2007).

İki farklı araştırmacı grubu, CD133'ü bir belirteç olarak kullanarak insan kolon kanserini başlatan hücreleri tanımlamıştır (Ricci-Vitiani vd., 2007). Bu çalışmalar, CD133+ kolon kanseri hücrelerinin nude farelere enjekte edildiğinde aynı histotipte tümörler oluşturabildiğini ve bu hücrelerin *in vitro* olarak korunabilen ve koloni oluşturabilen tümör küreleri oluşturduğunu göstermiştir.

1.4.1.2 CD44

Kolon kanseri kök hücrelerini tanımlamak için kullanılan bir başka zar belirteci CD44, kolorektal kanser (CD44+/CD24+) (Yeung vd., 2010) ve kolon karsinomu (EpCAMhi / CD44+) (Dalerba vd., 2007), dahil olmak üzere birçok katı tümörün CSC'lerinde bir hücre yüzey belirteci olarak tespit edilmiştir.



Şekil 1.7 Sıralı proteolitik işlemenin CD44 şematik gösterimi (Fanali vd., 2014)

CD44, hem alternatif ekleme hem de translasyon sonrası modifikasyonlarla sonuçlanan tek bir gende en az 20 varyant içeren transmembran protein ailesinin bir üyesidir (Screaton vd., 1992). İnsan CD44 geni 20 ekzondan bir mRNA oluşturur; ekzonlar 6-15, CD44'ün (CD44v) 1000'den fazla varyant izoformunu oluşturabilen alternatif ekleme ile sonuçlanır (Sneath ve Mangham, 1998). İnsan CD44 proteininin standart izoformu 363 amino asit ve üç bölge içerir: C-terminal sitoplazmik (72 amino asit), transmembran (21 amino asit) ve hücre dışı (270 amino asit) alanlar (Şekil 1.7) CD44, ana ligandı olan hyaluronik aside bağlanarak hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerine izin veren bir hücre adezyon molekülüdür. CD44, dış bölgede ve intramembranöz bölgede sıralı proteolitik kesilmelere tabi tutulur, CD44'e bağlı hücre-matriks etkileşimi ve sinyal yolağı ile ilgili ana olaylar gerçekleşir. CD44 dış bölgesinin kesilmesi, hücre dışı Ca^{2+} akışı, protein kinaz C veya Ras aktivasyonu gibi çok sayıda uyaran tarafından düzenlenir ve zarla ilişkili matriks metalloproteinazlar tarafından aracılık edilir. Çözünür dış bölgenin (çözünür CD44) salınması, hücre bağlanmasını ve göçünü düzenler ve CD44'ün hücre içi alanını (CD44-ICD) serbest bırakan presenilin (PS) bağımlı g-sekretazın aracılık ettiği intramembranöz alan bölünmesini tetikler. CD44-ICD, bağlanma yoluyla CD44'ün kendisi de dahil olmak üzere gen transkripsiyonunu aktive ettiği çekirdeğe geçiş yapar.

CD44, büyümeyi, hayatta kalmayı, farklılaşmayı ve göçü düzenleyen ve bu nedenle tümör ilerlemesinde ve metastazında rol oynayan bir moleküldür (Orian-Rousseau, 2010). Çok işlevli bir protein olan CD44'ün hücre proliferasyonu, migrasyonu, yara iyileşmesi, kanser hücresi büyümesi ve metastaz ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Ponta vd., 2003; Afify vd., 2009). CD44'ün transkripsiyonu, en azından kısmen, β-katenin Wnt sinyali ile aktive edilir ve aşırı ekspresyonu, kolorektal adenomun karsinomaya dönüşümünde erken bir olaydır. Kolon mukozasında olgunlaşmamış farklılaşmanın bir belirteci olarak kullanılır (Wielenga vd., 1999). CD44'ün yıkılması, tümör oluşumunu ve klonal oluşumu önler.

Kanser kök hücreleri, hücre içi enzim/taşıyıcı molekül aktivitesi, hücre yüzeyi reseptörleri, transkripsiyon faktörleri gibi birçok fonksiyon sayesinde tümör kitlelerinden alınan veya hücre kültüründe yetiştirilen hücrelerden tespit edilip ayırt edilebilmektedir. Bununla birlikte, CSC'leri tanımlayan hücre yüzeyi belirteçlerinin, tümör oluşumunu yönlendiren ve kanserin diğer organlara yayılmasıyla sonuçlanan tümör ortamı içindeki moleküler olaylarda fonksiyonel bir rol oynayıp oynamadığını, bugüne kadar tanımlanan çoğu CSC popülasyonu için kesin olarak belirlemek zor olmuştur. Bu, alan için önemli bir hedeftir, çünkü CSC'nin hücre yüzeyi fenotipinin metastatik süreçle mekanik olarak bağlantılı olup olmadığını anlamak, CSC'leri hedefleyen etkili terapötik ajanların geliştirilmesine yardımcı olabilir.

1.5 Kanser Kök Hücrelerini Hedeflemenin Önemi

Normal hücreler (kök hücreler hariç) genellikle konumlarını korurlar. Kanser hücreleri belli bir büyüklüğe ulaştıklarında değişime uğrarlar. Metastaz adı verilen diğer doku ve organları istila etme ve hareket etme yeteneğine sahiptirler. Çoğu insan kanserinin gelişimi sırasında er ya da geç, birincil tümör kütlesi uzak bölgelere göç edebilen, bitişik dokuları istila edebilen ve yeni koloniler oluşturabilen hareketli progenitör hücreler üretir (Hanahan ve Weinberg 2000).

CSC'ler, tümör hücresi çoğalmasında, tümör nüksetmesinde ve kemoterapötik ilaçlara karşı tümör hücresi direncinin gelişmesinde rol oynar. CSC'ler ayrıca, tümör hücrelerinin birincil tümör odaklarından uzak alanlara bağlanmasında rol oynayarak yeni odaklar oluşturur (Miki ve Rhim, 2008). Son araştırmalar, bu hücrelerin baş ve

boyun kanseri, beyin kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, kolon kanseri ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde bulunduğunu göstermiştir (Suer vd, 2014).

Katı kanser hücrelerinde genel heterojenite modellerinin her ikisinde de devam eden mutagenez ve çevresel değişkenler etkilidir. İlk model, tümör kütlesindeki hücreleri heterojen olarak tanımlar, ancak hepsinin aşırı büyüme ve tümör oluşturma potansiyeli vardır, ikinci model ise, tümör hücrelerinin yalnızca bir kısmının proliferasyondan sorumlu olduğunu vurgular (Reya vd., 2001). Çalışmalar, bazı tümör hücrelerinin hematolojik malignitelerin ve katı tümörlerin tümörijenezinden, yani tümör hücrelerinin bir alt kümesinin varlığından sorumlu olduğunu göstermiştir (Bonnet ve Dick, 1997). Bu modeller, kansere neden olan bir kök hücre grubu olan bir progenitör merkezin varlığını düşündürmektedir. Kanser hücreleri, yeni bir konakçıya aktarıldıklarında normal hücreler oluşturabilirler. Bu, kanserin yalnızca bir malign hücre alt kümesine sahip olduğunu ve kök hücreler gibi davrandığını gösterir (Houghton vd., 2007).

Kanser kök hücre modelinde, tümörün progresif olarak organize olduğu düşünülmektedir. CSC popülasyonu, tümör oluşumundan ve kalıcılığından sorumludur. Bu bağlamda, heterojenite, farklı olgunlaşma aşamalarındaki hücrelerin varlığını ifade eder (Marusyk vd., 2012). Tümör kitlesinde hem çoğalan hücreler hem de mitoz bölünmeyi tamamlamış farklılaşmış hücreler bulunur. Bu hücreler tümör büyümesine etki etmez, kendini yenilemez ve tümör kitlelerinin uzun sürelerde fark edilmemesine neden olur. Kanser kök hücreleri ise normal kök hücreler gibi kendini yenileme yeteneğine sahip, bu yeteneğini yaşam boyu sürdürebilen, iyonize radyasyona ve kimyasal uyaranlara karşı dirençli, vücudun diğer dokularında da kendini yenileyebilen hücrelerdir (Can, 2014).

Hiyerarşik model olarak da bilinen CSC modeli, sürekli çoğalma ve farklılaşma yeteneğine sahip bir grup hücreyi tümör oluşturan kitlenin tepesine yerleştirir. Çoklu mutasyonlardan sonra kök hücre benzeri özellikler kazanmış bir hücre kümesinde (CSC'ler) bulunan mutasyonlar, zamanla bölünmeye devam eden az sayıda hücre ve çok sayıda farklılaşmış hücre içeren kendi alt popülasyonlarını oluşturur. CSC'leri

tanımlayan üç temel özellik; artmış proliferasyon kapasitesi, uzun vadeli kendini yenileyebilme kabiliyeti ve farklılaşarak CSC karakterinden uzaklaşmış tümör kitlesini oluşturabilme kabiliyetidir (Schatton ve Frank, 2009). CSC her bölünmenin ardından kendi kimliğini koruduğu iki hücreye veya farklılaşarak bildiğimiz anlamdaki tümör kitlesini oluşturan iki hücreye dönüşebileceği gibi (simetrik bölünme), biri kendini yenileyen, biri farklılaşmış iki farklı hücreye de (asimetrik bölünme) dönüşebilir. Dahası, farklılaşmış hücreler de tek yönlü değildir, bu hücreler de zaman içerisinde değişim göstererek yeniden CSC'ye dönüşebilir (Wang vd., 2014).

Kök hücrelerin kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma süreçleri birçok sinyal proteini ve enzim tarafından kontrol edilir. Bu hücreler uzun ömür, kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerinden dolayı patolojik ve normal durumlarda önemli bir rol oynarlar (Hombach-Klonisch vd., 2008). Pek çok kanser tipinde farklı CSC alt popülasyonlarının günümüzde tanımlanmış olması, CSC kavramının yaygın olarak uygulanabilirliğini göstermektedir (Kreso ve Dick, 2014). Geleneksel antikanser tedavilerinin sınırlı etkinliğinin ana nedenlerinden biri, bu tedavilerin tümörün büyük kısmını oluşturan ve az sayıdaki CSC'leri öldürmede başarısız olan diğer kök olmayan hücreleri hedeflemesidir (Clarke vd., 2006; Eyler ve Rich, 2008). Gittikçe artan sayıda çalışma, CSC'lerin geleneksel tedavilere diğer tümör hücrelerine göre daha dirençli olduğunu göstermektedir. Ek olarak, terapi ile öldürülemeyen CSC'ler, yeni tümör kitleleri oluşturma ve tekrarlamaya neden olma konusundaki yeni tümörijenik yetenekleri nedeniyle seçilir.

Mevcut araştırmaların önemli bir odak noktası, karsinom hücrelerini CSC durumunda tutan sinyal yollarını belirlemek ve hedeflemektir. Ne yazık ki, kök hücre benzeri özelliklere sahip karsinom hücrelerini seçici olarak hedefleme çabaları, katkıda bulunan faktörlerin anlaşılmaması nedeniyle belirsizliğini koruyor. CSC'lerde hangi sinyal yollarının tercihen aktive edildiği bilinmediğinden, terapötik olarak hedeflemek için belirli bir yolun seçimi yalnızca tesadüfi olabilir. Sınırlı sayıda kanserde epigenetik tedavilerin belirgin klinik etkinliğine rağmen (Munster vd., 2001; Uchida vd., 2007), bu ilaçların normal hücre fizyolojisi ve doku fonksiyonu üzerindeki uzun vadeli etkileri hala tartışma konusudur.

Bu gözlemler, diğer tümör hücrelerinden CSC'lerin kritik önemini vurgulamaktadır. Bu işlevleri anlamak, CSC'leri yok etmek için tasarlanmış yeni tedavi stratejilerine yol açacak ve muhtemelen daha uzun ve hatta sürekli tümör gerilemesine neden olacaktır (Shibue ve Weinberg, 2017).

1.6 Kanser Kök Hücrelerinin Hedeflenmesi

Geleneksel antikanser tedavilerinin etkinliklerinin sınırlı olmasının ana nedenlerinden biri, bu tedavilerin tümör olmayan kök hücreleri hedeflemesi ve az sayıdaki CSC'leri yok edememesidir. (Clarke vd., 2006; Eyler ve Rich, 2008). İlerlemiş kanserlerin yok edilmesi gerekiyorsa, CSC'yi hedef alan yeni seçici tedavilerin geliştirilmesi gerektiği ortaya çıkıyor. Bu tez çalışmasında iki kök hücre alt popülasyonu kullanılarak sadece kök hücreler üzerinde durulmuştur. CSC'ye özgü hedefleme kullanmanın bir avantajı, çoğu ilacın reseptör aracılı endositoz yoluyla tümör hücrelerine girişinden fayda sağlamasıdır. CSC'lerin ve CSC olmayanların farklı biyolojik özellikleri ve terapötik hassasiyetleri, terapötik etkinliğin değerlendirilmesinde temel hususlardır, çünkü CSC'ler genellikle çoğu kemoterapi ilacına karşı oldukça dirençlidir ve bu nedenle tümörijenezden sorumludur. 1960'larda James Till ve Ernest McCulloch (Bruce ve Van Der Gaag, 1963) tarafından geliştirilen splenik koloni oluşumu testi, ilk olarak in vivo kolonizasyon yapabilen lenfoma hücrelerinin oranını doğru bir şekilde saymak için kullanılmış ve CSC hedefleme çalışmalarının geliştirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. CSC'lerde artan aktiviteye sahip bir dizi hedef tanımlanmış ve terapötik olarak araştırılmıştır. Kanserlerin yeni yönlendirilmiş tedavilerinden kaçacak mekanizmalar geliştirememesi için, klonal evrimin daha iyi anlaşılması kritiktir. Bununla birlikte, hastalar için nüks riskini azaltmak ve uzun vadeli yan etkileri en aza indirmek, her zaman CSC'yi anlamanın nihai hedefi olarak kalmalıdır (Bomken vd., 2010).

Kök hücreler, malign transformasyondan sorumlu hedef hücreler olabilir ve tümör oluşumu, kök hücrenin kendini yenileme yolundaki bir kusur olabilir. CSC teorisi, geleneksel antikanser tedavilerinin yanı sıra tümör oluşumu, gelişimi, metastazı ve nüksünün etkisizliğini açıklar. Çoğu kanser hücresinin tedavisi dramatik yanıtlar üretebilir, ancak nadir CSC'ler hedeflenmedikçe uzun vadeli remisyonlara yol açması

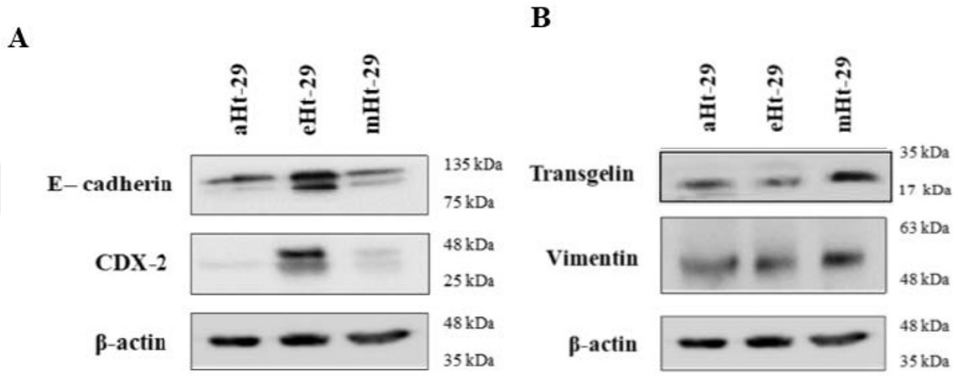
pek olası değildir. Bu nedenle, CSC'leri hedeflemek, çekici ve yeni bir terapötik yaklaşımdır.

Kanser hücrelerinin değişken doğası da terapötik yanıtı sınırlar. Günümüzde karsinomlar için en yaygın tedaviler kemoterapi, radyasyon tedavisi, cerrahi veya bunların bir kombinasyonudur. Bu tedaviler birincil tümör için çok etkilidir. Bununla birlikte, bu kanserlerden ölümlerin çoğu metastazlardan kaynaklanmaktadır. Tedaviden sonra yok edilemeyen CSC'ler buna neden olur ve tedaviye dirençlidir (Tam ve Weinberg, 2013). EMT'nin tümör hücrelerine malignant özellikler kazandırdığı göz önüne alındığında, bu sürecin kanser tedavisinde ilaç keşfi için iyi bir hedef oluşturduğu görülmektedir.

CSC'ler ve CSC olmayanlar (non-CSC) arasındaki fark esas olarak EMT'den kaynaklanmaktadır. Birçok karsinomda, yalnızca CSC alt popülasyonunda bulunan neoplastik hücreler aktif bir EMT programı gösterir (Chen vd., 2009; Mani vd., 2008). Belirli deneysel karsinom modellerinde, epitel tümör hücrelerinde EMT programının dışarıdan aktifleştirilmesi, bu hücrelerin tümör başlatma kapasitelerini kayda değer miktarda artırmıştır (Chen vd., 2009; Mani vd., 2008). Ayrıca EMT programının aktifleştirilmesi, bu tümör hücrelerinin pek çok ilaca direnç göstermelerine sebep olmuştur (Singh ve Settleman, 2010). EMT transkripsiyon faktörleri (EMT-TF) tarafından düzenlenen EMT programı, tümör hücrelerinin malignant dönüşümü için gerekli olan çeşitli özelliklerin ortaya çıkmasını sağlayabilmektedir (Singh ve Settleman, 2010; Mani vd., 2008; Morel vd., 2008). Mezenkimal karsinom hücrelerinin kök hücre benzeri özellikleri, EMT programının bir CSC modeli olarak da kullanılabileceğini gösterir ve bu, kanser hücresi biyolojisini anlamak için bu sürecin iyi bir karakterizasyonunun önemini vurgular.

Farklılaşmamış CSC ve farklılaşmış tümör hücreleri arasındaki geçiş mekanizmaları henüz aydınlatılabilmiş değildir. Çalışmalarda genellikle yüksek çeşitlilik gözlenen hasta örnekleri veya kimyasallarla tetiklenen farklılaşma modelleri kullanılmaktadır. Bir kimyasal ile tetiklenme olmadan kendiliğinden EMT ve bunun geri döndürülebilir modellerine rastlanmamaktadır. Ön çalışmalarımızda kolon kanseri hücre hattı HT-29 ile oluşturulan MET-EMT modelinde (Şekil 1.8) hücrelerin

epitel ve mezenkimal özellikleri karakterize edilmiştir (Şahin, 2022). HT-29, yüksek bir glukoz tüketicisidir ve normal hücre kültürü koşulları altında farklılaşmamıştır. Hücreler, farklı hücre kültürü koşulları altında spesifik epitel hücre tiplerine farklılaşabildikleri için pluripotent olarak kabul edilir. HT-29 hücreleri, glikoz yerine galaktoz koyarak tersinir enterosit farklılaşması sergiler (Pinto vd., 1982). Oluşturulan modelde atasal, aHT-29, farklılaşmış/epitel hücreler (eHT-29) geri farklılaşan (mHT-29)'ne dair EMT belirteçleri şekil 1.8'de verilmiştir.



Şekil 1.8 HT-29 MET-EMT modelinde farklılaşmış (a) ve geri farklılaşmış (b) belirteçler için Western blot. Tüm blotlama aynı membranda gerçekleştirildiğinden aynı β-actin bantları verilmiştir.

Şekilde görüldüğü üzere eHT-29 hücrelerinde epitel belirteçler artarken mezenkimal belirteçler azalmakta ve mHT-29 hücrelerinde tekrar eski haline dönmektedir. Bağırsak epitelinin farklılaşmasının *in vitro* modellerinden biri haline gelmiş ve yaygın olarak kullanılan HT-29 hücre hattının bu özelliği (Simon-Assman vd., 2007) bu tez çalışmasında ilk kez CSC karakterizasyonu için bir model olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan hücre modelinin, bir hücre hattı olması sebebiyle örnek içi heterojenitesi düşüktür ve tekrarlar arasındaki hata payını azaltarak tutarlı veri elde etme avantajı sunar. Model, herhangi bir harici kimyasal kullanılmadan gerçekleştirildiğinden, doğala yakın hücre içi değişiklikleri izlenebilmiştir. Literatürde bu modelin daha önce CSC karakterizasyonu için kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

BÖLÜM İKİ

MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Hücre Kültürü

Bu modelde kendiliğinden farklılaşabilen kolon kanseri HT-29 hücre hattı kullanılmıştır. HT-29 hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümü Sreeparna Banerjee Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. HT-29 hücre hattı, yüksek glikoz tüketimine sahiptir ve normal hücre kültürü koşulları altında farklılaşma gerçekleştirememiştir. Hücreler, farklı hücre kültürü koşulları altında belirli epitel hücre tiplerine farklılaşabildikleri için pluripotent olarak kabul edilir. HT-29 hücreleri, glikozu galaktozla değiştirerek geri dönüşümlü enterosit farklılaşması göstermiştir (Pinto ve diğerleri, 1982; Sade Memişoğlu, 2014). Önceki çalışmalar bu sürecin tersine çevrilebilir olduğunu göstermiştir (Zweibaum ve diğerleri, 1985).

HT-29 hücreleri, 37°Cde 25mM glukoz ve %10 FBS içeren DMEM besiyerinde (Glu-besiyeri) büyütülmüş ve farklılaşmanın tetiklenmesi için %80 doluluğa eriştiklerinde glukoz yerine 5mM Galaktoz ve %10 diyaliz edilmiş FBS içeren (Gal-besiyeri) besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler Glu-besiyerinde %50-60 doluluk oranına erişene kadar büyütülmüş sonrasında bu hücreler atasal hücreler (aHT-29) olarak toplanmıştır. Hücreler %80 doluluk oranına ulaşınca glukoz yerine Gal-besiyerine alınmış ve %100 doluluğa eriştiklerinde 0. Gün olarak kabul edilip 20 gün boyunca Gal-besiyerinde büyütülmüştür. Bu sürenin sonunda toplanan HT-29 hücrelerinin spontan farklılaşma karakteristikleri epitel özellik gösteren farklılaşma grubu olarak ifade edilmiştir (fHT-29). Geri farklılaşma için 21. Günde hücreler tripsin ile dağıtılarak 1:50 oranında hücre kültürü kaplarına ekilmiş ve glu-besiyerinde 4 gün süre ile büyütülmüştür. Dört günün sonunda toplanan hücreler mezenkimal özellik gösteren geri farklılaşma grubunu oluşturmuştur (gHT-29). Yapılan deneylerde atasal aHT-29, 20. gün- fHT-29 (farklılaşmış) ve geri farklılaşmış- gHT-29 olarak 3 tip hücre popülasyonu kullanılmıştır. Belirtilen zamanlarda hücreler toplanıp ilgili deneylerde kullanılmıştır.

2.2 Hücre Ayrımlama ile CSC'lerin tespiti ve ayrıştırılması

Hücreler BD FACSAria™ III cihazı (İzmir biyotıp ve Genom Merkezinde, üniversite personeli kullanımına açıktır) kullanılarak analiz edilmiş ve ayrımlanmıştır. Bunun için hücreler (10×10^6) toplanmış, FACS tamponunda (1 mM EDTA, 25mM HEPES ve 1% FBS in PBS) yıkanmış ve kolon kanseri kök hücrelerinin tespitinde kullanılan belirteçlerden CD44 ((IM7) Rat mAb (FITC Conjugate) (#75122)) ve CD133 ((A8N6N) Mouse mAb (Flow Specific) (Alexa Fluor® 647 Conjugate) (#53276)) ile 30 dakika 4°C'de işaretlenmiştir. İşaretleme sonrası hücreler FACS tamponuyla tekrar yıkanmış, 70 μm filtreden geçirilerek ayrılmış ve ölü hücrelerin ayrılması için DAPI ile çekirdekler işaretlenmiştir. Hücre ayrımlama ile oranlar belirlenmiş ve aynı zamanda bu hücrelerin eş zamanlı ayrımlanması sağlanmıştır.

2.3 Hücre Çoğalması

aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücrelerin çoğalma testi ile çoğalma hızları karşılaştırılmıştır. Hücre çoğalma ölçümü için 96-kuyucuklu plakalara 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve CellTiter Aqueous Assay Kit (Promega) ile üreticinin de protokolünde yönlendirdiği gibi karanlık ortamda her kuyuya 20 μl sıvısını ekleyerek 3 saat 37°Cde inkübe edildikten sonra absorbansı 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hücrelerin 0., 24. ve 48. saatteki çoğalma hızları ölçülmüştür. Hücrelerin bölünme zamanı non-linear regression exponential growth (Graphpad Prism 9) analizi ile hesaplanmıştır.

2.4 Tümör Oluşturma Kapasitesi

aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücre popülasyonlarının *in vitro* tümör oluşturma kapasitesini karşılaştırmak için sferoid oluşturma kapasiteleri ölçülmüştür. Bunun için, düşük adezyon özellikli 96-kuyucuklu plakalara 1000-2500-5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve hücreler serumsuz besiyerinde, fibroblast büyüme faktörü (FGF) (10 ng/ml−1), epidermal büyüme faktörü (EGF) (20 ng/ml−1) ve B27 (1X) bileşeni eklenerek büyütülmüştür ve 10-15 gün boyunca fotoğraflanmıştır. Belirli günlerde oluşan sferoidler sayılmış ve ImageJ programı ile çapları ölçülmüştür.

2.5 Metastaz Kapasitesi

aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücre popülasyonlarının metastaz kapasitesi *in vitro* göç deneyi ile tayin edilmiştir. 24-kuyucuklu plaka içine 8.0 µm PET Membran, 6.5 mm Permeable Cell Culture Insert yerleştirilmiş, insertlerin içine %1 FBS içeren DMEM besiyerinde (Glu-besiyeri) 100.000 hücre/kuyu ekilmiştir. Kuyu içinde insert altında kalan kısma ve DMEM besiyeri (%10 FBS, Glu-besiyeri) eklenmiş ve 37°Cde 72 saat beklenmiştir. 72 saat sonunda insert içindeki büyüme ortamı alınarak sırasıyla %70 etil alkol, kristal viyole ve distile suda yıkaması yapılarak insert içinde kalan hücrelerin fotoğraflanması yapılmıştır.

2.6 İlaç Direnci/Hassasiyeti

aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücre popülasyonlarının günümüz kolon kanseri tedavisinde ilaç direncini ölçmek için kullanılan en yaygın tedavi Oxaliplatin (OP) ve 5-florourasil (5-FU) ilaçları kullanılmıştır. Hücre canlılık testi için MTT kullanılmıştır. DMEM besiyerinde 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 10.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreleri ektikten 24 saat sonra farklı dozlarda ilaç uygulanması gerçekleştirilmiştir. Oxaliplatin için sırasıyla 10, 100, 500, 1000 ve 2000 µM; 5-FU için ise sırasıyla 10, 100, 500,1000 ve 2000 µM ilaç uygulanmıştır. Hücreler ilaçla muamele edildikten 24 saat sonra hücrelere MTT reaktifi (5 mg/ml) verilmiş ve hücreler 37 ^{O}C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Dört saat sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO'da çözülüp absorbansı 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. IC50 değerlerinin belirlenmesi için non linear regression inhibitor vs. normalised response analizi Graphpad Prism 9 kullanılmıştır. Böylece HT-29 hücrelerinde farklılaşma ve CSC dönüşümünün ilaç direncine etkileri anlaşılmıştır.

2.7 Akış Sitometri ile Epitel Belirteç olan CDX-2 İncelenmesi

aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinden hücre ayrımlama sonrasında elde edilen CD133−/CD44+ ve CD133+/CD44+ iki kök hücre popülasyonları BD LSR Fortessa™ cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. CD133+/CD44+ ve CD133−/CD44+ kök hücre popülasyonları %5 FBS içeren PBS içinde santrifüj edildikten sonra karanlık ortamda 40 dakika Thermofisher FIX & PERM™ Medium içinde hücre porları geçirgenlik için açılmıştır. İnkübasyon için 20 dakika BD Bioiences PE Mouse

Anti-Human CDX-2 içinde bekletilmiştir. Akış sitometride CDX-2 oranları belirlenmiştir.

2.8 İstatistiksel Analizler

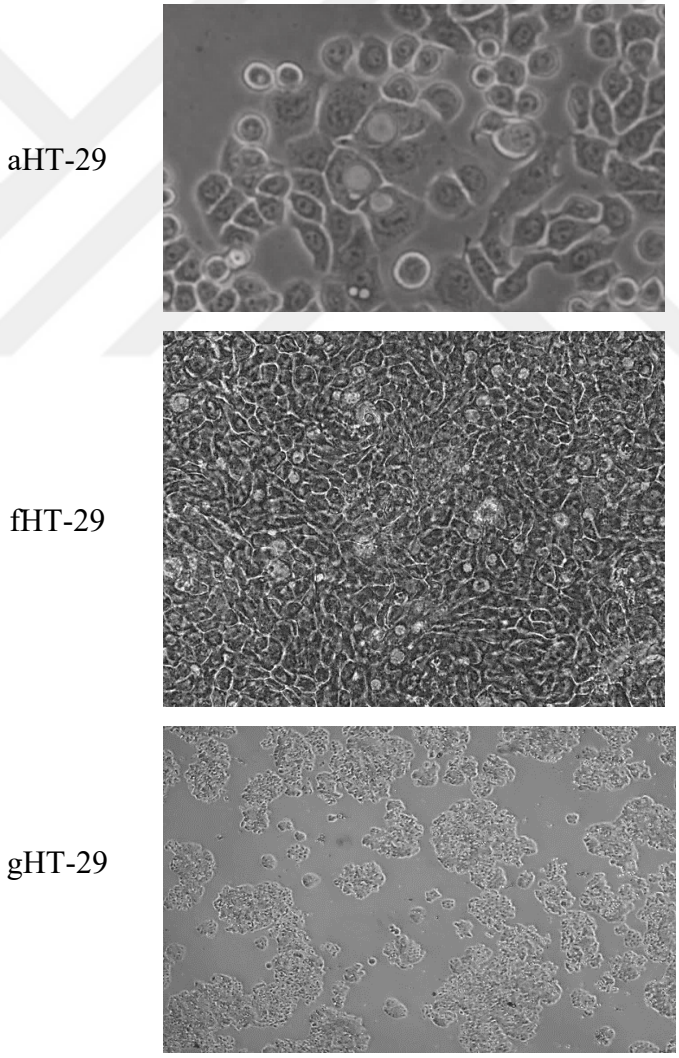
Çalışmada, her deney en az üç biyolojik tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farklar ayrıca belirtilmedikçe One-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. İlaç direnci ve hücre proliferasyonu çalışmalarında non linear regression analizi uygulanmıştır. Tüm analizler Graph-Pad Prism 9 programı ile gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM ÜÇ

BULGULAR

3.1 Farklılaşma Dönemlerinde HT-29 Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri

HT-29 hücreleri; %50 veya %60 doluluk oranına eriştiklerinde atasal HT-29 hücreler (a-HT29), aynı hücreler toplanmadan %80 doluluk oranına ulaştıktan sonra galaktoz içeren büyüme ortamına alınıp %100 doluluk oranına ulaştıktan sonra 20 gün sonunda toplanan hücreler farklılaşmış HT-29 hücreleri (fHT-29), 21.gününde tripsinlenerek seyreltilip 4 gün büyütülerek geri farklılaşmış hücrelerin (gHT-29) mikroskop görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.1).

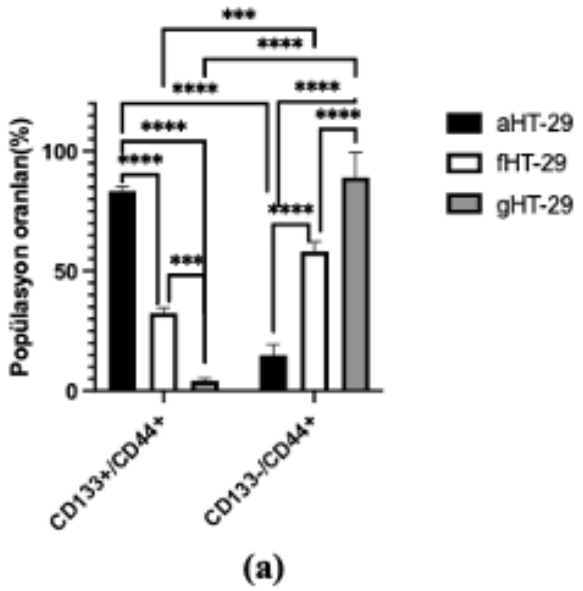


Şekil 3.1 HT-29 hücreleri toplanmadan önce alınmış görüntüler (40X,40X,20X)

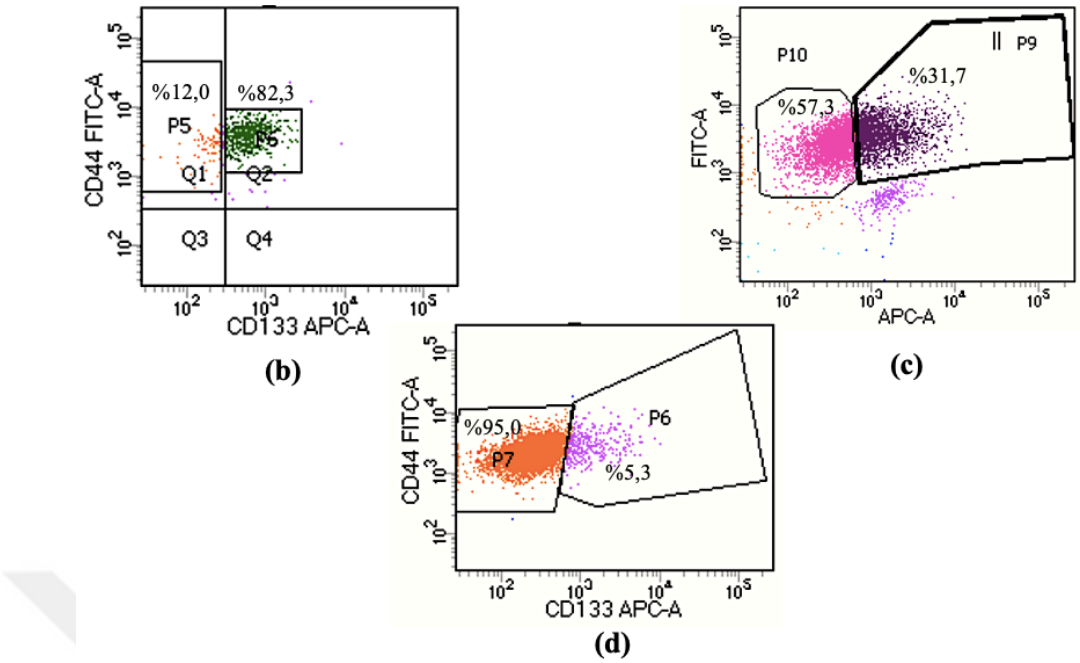
aHT-29 hücreleri ile gHT-29 hücrelerinin morfolojik olarak birbirine benzediği fakat fHT-29 hücreleri ile bu hücrelerin belirgin farklar gösterdiği gözlemlenmiştir. Atasal ve geri farklılaşmış hücrelerin sınırlarının net bir çizgi şeklinde olmadığı, farklılaşmış fHT-29 hücrelerinde bu hücre sınırları daha keskin bir şekilde görülmüştür. Farklılaşmış hücreler 20 gün boyunca aynı ortamda büyümeyi devam ettirdikleri için daha sıkışmış bir görüntü sergilerler bu nedenle hücrelerin morfolojileri hakkında yorum yapmayı zorlaştırmaktadır.

3.2 HT-29 Hücrelerinde Hücre Ayrımlama Sonrası CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ Oranları

Çalışmada atasal, farklılaşmış ve geri farklılaşmış olarak dönüştürülen HT-29 hücrelerinin kök hücre alt popülasyonları CD133 ve CD44 belirteçlerine göre hücre ayrımlamada ayrılmıştır. Oranları Şekil 3.2'de verilmiştir.



(a)



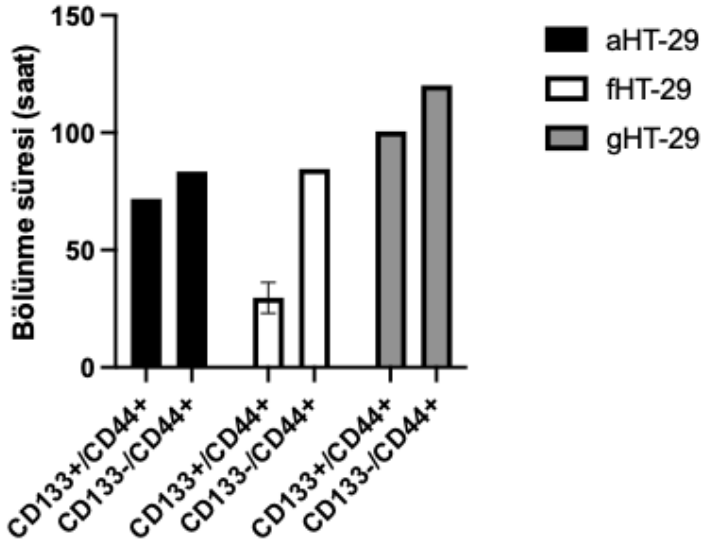
Şekil 3.2 HT-29 hücreleri için hücre ayrımlama sonrası iki kök hücre alt popülayonları. (a) aHT-29, fHT-29 ve gHT-29 hücrelerde CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ oranları; (b) aHT-29 hücrelerinde P6 kapısı CD133+/CD44+ ve P5 kapısı CD133-/CD44+; (c) fHT-29 hücrelerinde P9 kapısı CD133+/CD44+ ve P10 kapısı CD133- CD44+; (d) gHT-29 hücrelerinde P6 kapısı CD133+/CD44+ ve P7 kapısı CD133-/CD44+. ** $p<0.01$, *** p, One way ANOVA with Tukey's multiple comparison, n=3.

Sonuçlara göre, atasal hücreler farklılaşmış hücrelere ve sonrasında da geri farklılaşmış hücrelere geçiş yaptıkça CD133+/CD44+ (double +) hücrelerinin sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ve CD133-/CD44+ hücrelerinin sayısında ise anlamlı bir artış görülmüştür. Farklı hücre durumlarının hiçbirinde CD133-/CD44- hücre elde edilmemiştir.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında elde edilen kök hücre alt popülasyonları çoğalma, ilaç direnci, tümör oluşturma, göç edebilme ve epitel/mezenkimal özellikleri açısından karakterize edilmiştir.

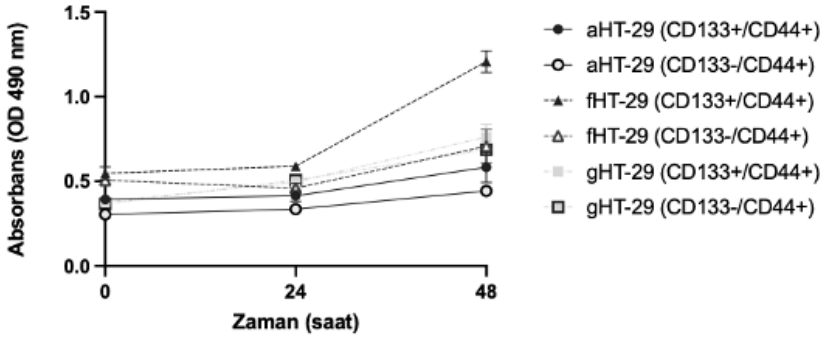
3.3 CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ HT-29 Hücrelerinde Çoğalma

Ayrımlanan alt popülasyonların 48 saatlik bir süreçte hücre çoğalma hızları karşılaştırılmış, bölünme hızları analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 3.3'de verilmiştir.

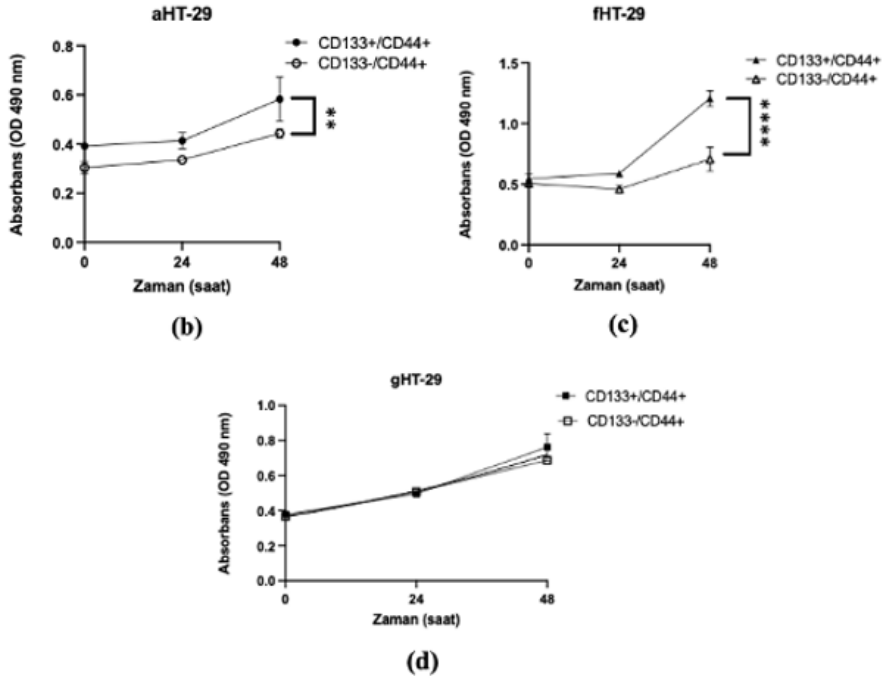


Şekil 3.3 HT-29 hücrelerinde tüm kök hücre alt popülasyonlarının bölünme süreleri

aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinin CD133+/CD44+ kök hücre popülasyonlarının daha hızlı bölünme gerçekleştirdiği görülmüştür. gHT-29 hücrelerinin iki kök hücre alt popülasyonu da diğer kök hücre popülasyonlarına kıyasla en yavaş ve fHT-29 hücrelerinin CD133+/CD44+ alt popülasyonunun diğer kök hücre popülasyonlarına kıyasla en hızlı bölünmeyi gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir.



(a)

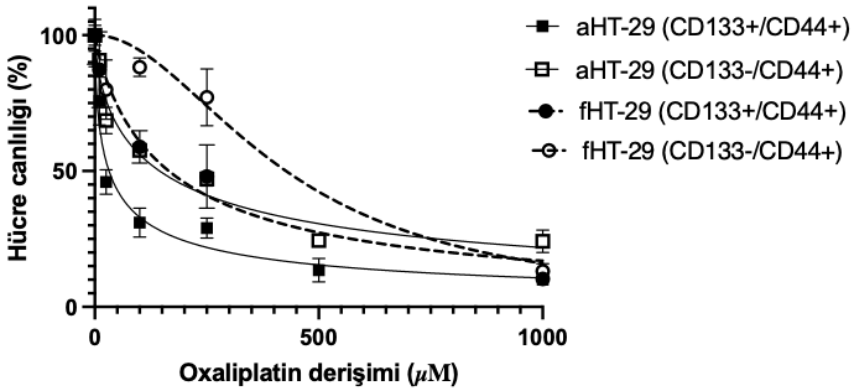


Şekil 3.4 HT-29 hücre popülasyonlarının çoğalması. (a) aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun 0., 24.ve 48. saate göre çoğalma hızları; (b) aHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun; (c) fHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun; (d) gHT-29 hücrelerine ait iki kök hücre popülasyonunun; 0., 24.ve 48. saate göre çoğalma hızları. ** $p<0.01$, *** p, Extra sum of squares F-test, n=3.

Hücrelerin çoğalma hızlarına bakıldığında aHT-29 ve fHT-29 hücrelerinde CD133+/CD44+ hücrelerin CD133-/CD44+ hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla artış gösterdiği görülmüştür. gHT-29 hücrelerinde ise CD133+/CD44+ hücrelerin CD133-/CD44+ hücrelere göre çoğalma hızları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

3.4 CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ HT-29 Hücrelerinde İlaç Direnci

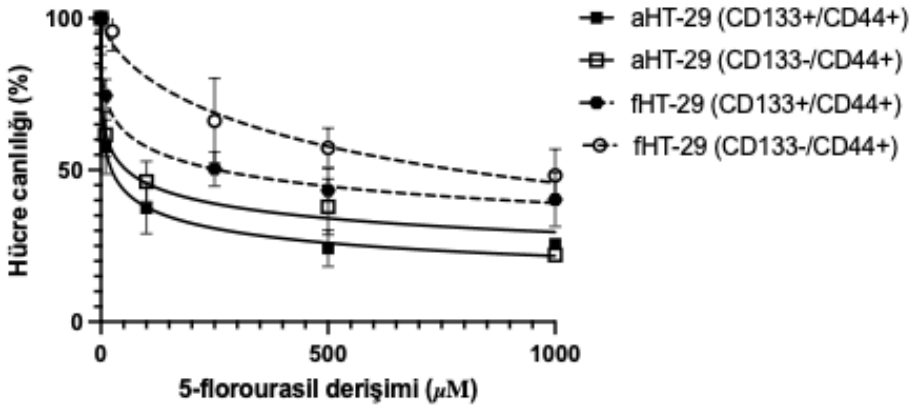
HT29 hücrelerinden ayrımlanan alt popülasyonların oxaliplatin (OP) ve 5-florourasil (5-FU) ilaç dirençleri karşılaştırılmıştır. Geri farklılaşan hücrelerden analiz için yeterli miktarda hücre elde edilemediğinden, analizler atasal ve farklılaşan hücrelerle gerçekleştirilmiştir. Artan OP derişimlerine göre hücre canlılığı Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5 aHT-29 ve fHT-29 hücreleri alt popülasyonları için artan OP derişimlerinde hücre canlılığı

aHT-29 hücreleri için artan OP derişimlerinde CD133+/CD44+ hücrelerin, CD133-/CD44+ hücrelerine göre hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmüştür. Benzer şekilde, fHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücrelerin, CD133-/CD44+ hücrelerine göre hücre canlılıklarındaki azalma daha fazla olmuştur.

Aynı hücre popülasyonları için artan 5-FU derişimlerinde hücre canlılığı Şekil 3.6'da verilmiştir.



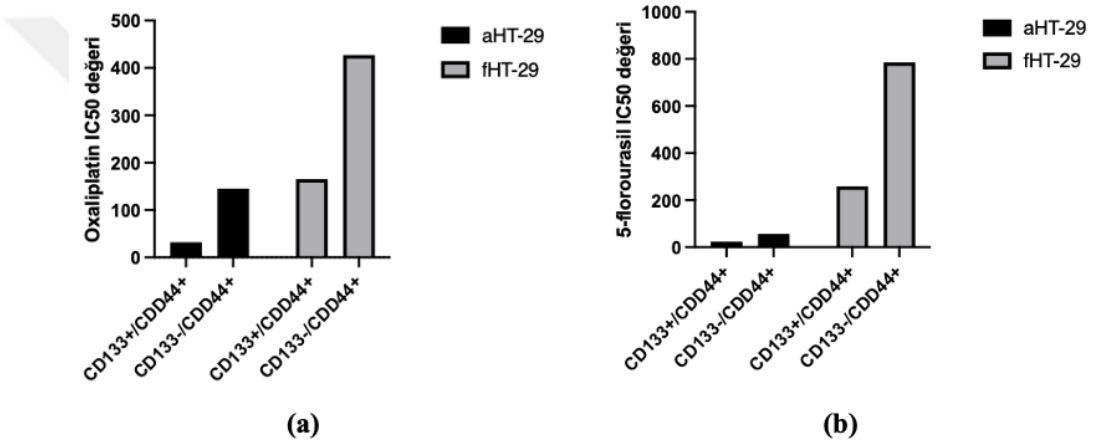
Şekil 3.6 aHT-29 ve fHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 5-FU ilacına gösterdikleri direnç

aHT-29 hücreleri için artan 5-FU derişimlerinde CD133+/CD44+ hücre canlılığının CD133-/CD44+ hücrelerine göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde, fHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücrelerin, CD133-/CD44+ hücrelerine göre hücre canlılığındaki azalma daha yüksek olmuştur.

aHT-29 ve fHT-29 hücrelerinin iki alt kök hücre popülasyonunda hücrelerin %50'sini öldüren ilaç derişimleri (IC50) Tablo 3.1'de ve Şekil 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.1 HT-29 hücrelerinde oxaliplatin ve 5-florourasil için IC50 ilaç derişimleri

	CD133+/CD44+	**CD133-/CD44+**
aHT-29 OP	31,83	145,0
aHT-29 5-FU	23,41	56,22
fHT-29 OP	165,4	427,2
fHT-29 5- FU	259,0	785,5

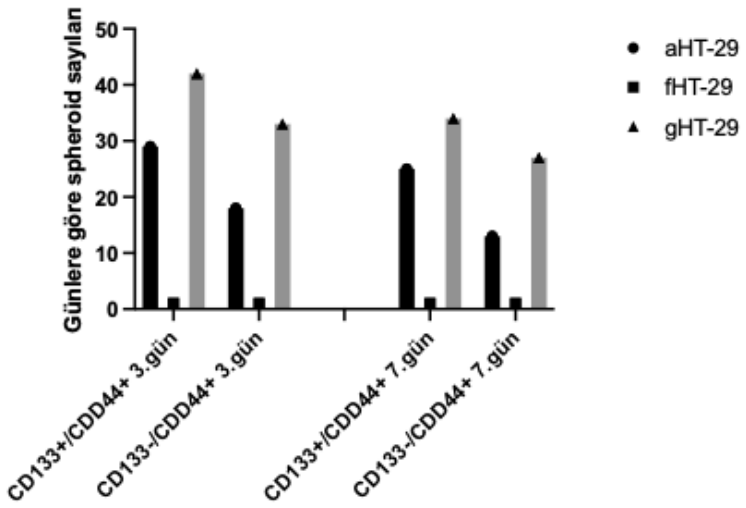


Şekil 3.7 HT-29 hücrelerinde oxaliplatin ve 5-florourasil için IC50 ilaç derişimleri

Farklılaşmış grup her iki ilaca karşı atasal hücrelere göre daha dirençlidir (Tablo 3.1). Ancak farklılaşmış hücrelerin %50'sini öldürmek için gereken 5-FU dozu, aynı miktar hücreyi öldürmek için gereken oxaliplatin miktarına göre fazladır. 5-FU için atasal grubun CD133+/CD44+ hücrelerinin en hassas grup olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.7.b). Her iki ilaç için hem atasal hem de farklılaşmış gruplardan elde edilen CD133+/CD44+ popülasyonunun CD133-/CD44+ popülasyona göre IC50 değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

3.5 CD133+/CD44+ ve CD133- /CD44+ HT-29 Hücrelerinde *in vitro* Tümör Oluşturma Kapasitesi

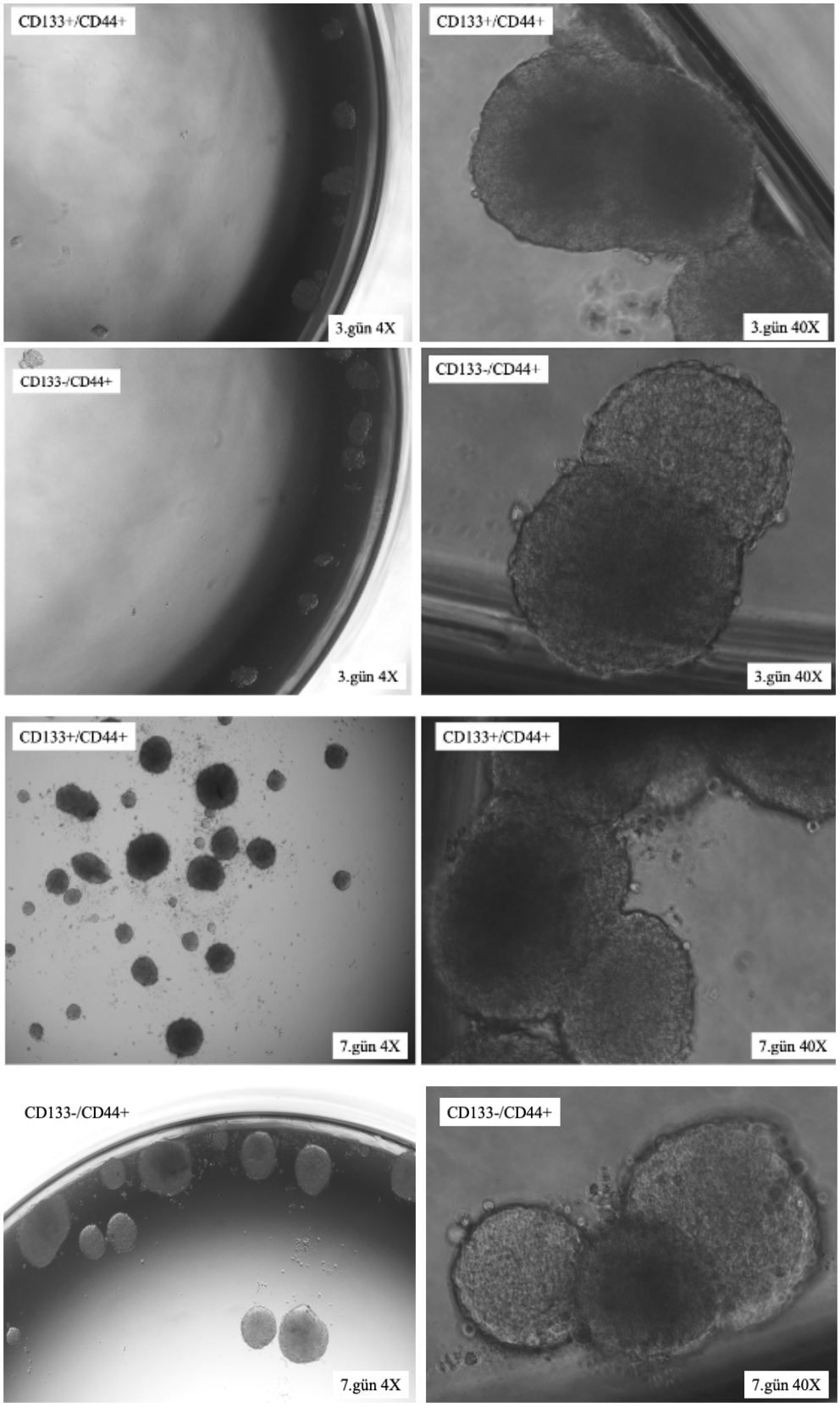
Alt popülasyonlar aynı zamanda *in vitro* tümör oluşturma kapasitelerinin karşılaştırılabilmesi amacı ile kök hücre ortamında sferoid oluşturma kapasiteleri günlere göre değerlendirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinin günlere göre oluşturdukları sferoid sayısı.** p<0.01, *** p, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison, n=3.

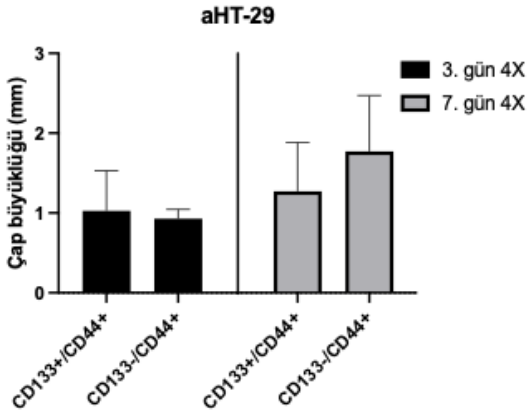
aHT-29 hücrelerinin oluşturduğu sferoid sayıları her iki kök hücre alt popülasyonu için, gHT-29 hücrelerine göre daha azdır. Ayrıca oluşan sferoidlerin CD133+/CD44+ hücrelerinde, CD133-/CD44+ hücrelerinde olana göre sayıca fazla olduğu görülmüştür. fHT-29 hücrelerinden elde edilen iki alt popülasyonda üç boyutlu sferoid yapısı oluşmadığı için sayılamamıştır. aHT-29 ve gHT-29 hücrelerinin CD133+/CD44+ alt popülasyonu 3.gün ve 7.gün sferoidlerine bakıldığında gHT-29 hücrelerinin daha fazla sayıda sferoid oluşturduğu görülmüştür.

Şekil 3.9'da aHT29 hücrelerinden ayrımlanan kök hücre popülasyonlarının mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.9 aHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 3.gün ve 7.gün 4X - 40X sferoid görüntüleri

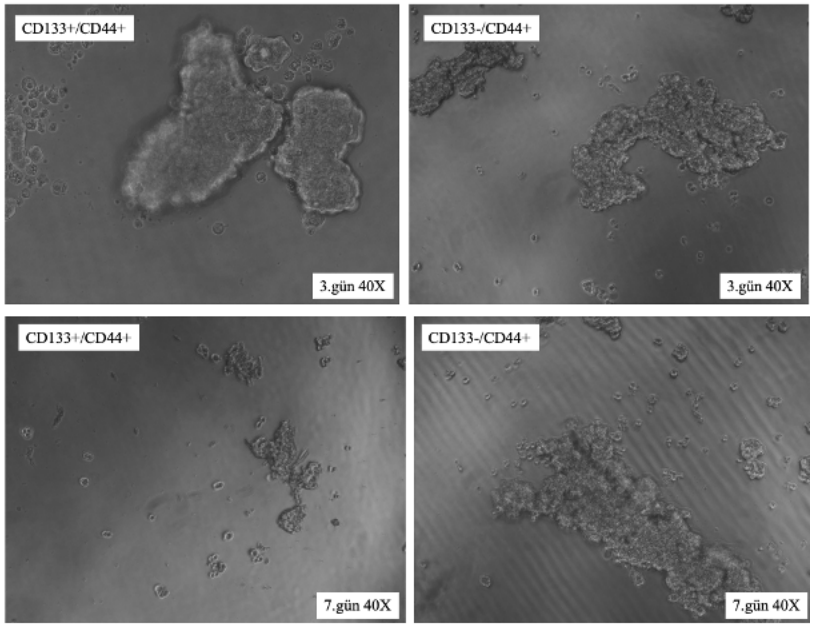
aHT-29 hücrelerinden elde edilen tüm alt popülasyonların düzgün ve üç boyutlu tam bir sferoid oluşturduğu görülmüştür. Aynı zamanda gün geçtikçe küçük çaplı sferoidlerin birbirlerine yaklaştığı ve sferoid çaplarının arttığı görüldü. Sferoid çapları şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10 aHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücre alt popülasyonları için çap uzunlukları

Sferoid çapları 7.gün hücrelerinde daha fazladır. Farklı kök hücre popülasyonları arasında sferoid çapları açısından anlamlı bir fark görülmemiştir.

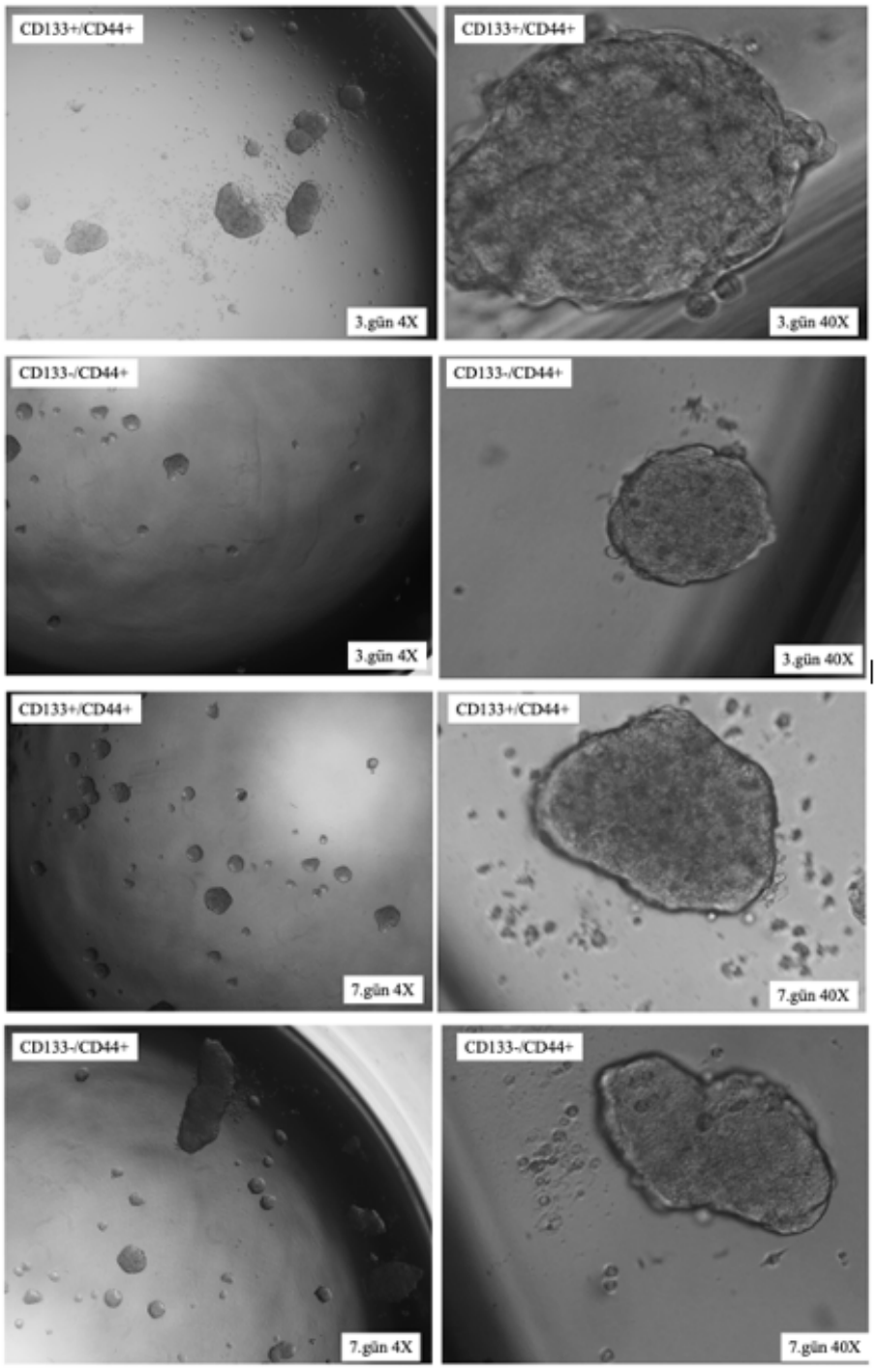
Şekil 3.11'de fHT-29 hücrelerinden ayrımlanan kök hücre popülasyonlarından elde edilen sferoid görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.11 fHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 3.gün ve 7.gün 40X sferoid görüntüleri

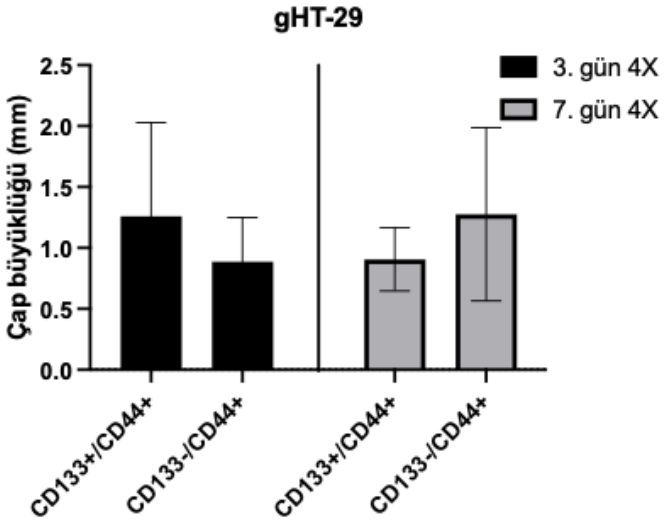
fHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ alt popülasyonların üç boyutlu sferoid yapısı oluşturmadığı görülmüştür. Hücreler iki boyutlu bir düzlem halinde birbirine tutunmuş, canlılıklarını sürdürmüştür.

Şekil 3.12'de gHT29 hücrelerinin ayrımlanmasından elde edilen kök hücre popülasyonlarının oluşturduğu sferoid görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.12 gHT-29 hücreleri alt popülasyonları için 3.gün ve 7.gün 4X - 40X sferoid görüntüleri

gHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücrelerin, CD133-/CD44+ hücrelerine göre kuyu içinde sayıca daha fazla sferiod oluşturduğu , sferoidlerin küre yapısının birleşmelerle birlikte değiştiği görüldü. 3.gün ve 7.gün sferoidlerinde gün geçtikçe küçük çaplı sferoidlerin birbirlerine yaklaştığı ve birleşerek sferoid çaplarının arttığı görüldü. Çap uzunlukları bir sferoidin farklı yerlerinden ortalama olarak alınmıştır ve Şekil 3.13 verilmiştir.

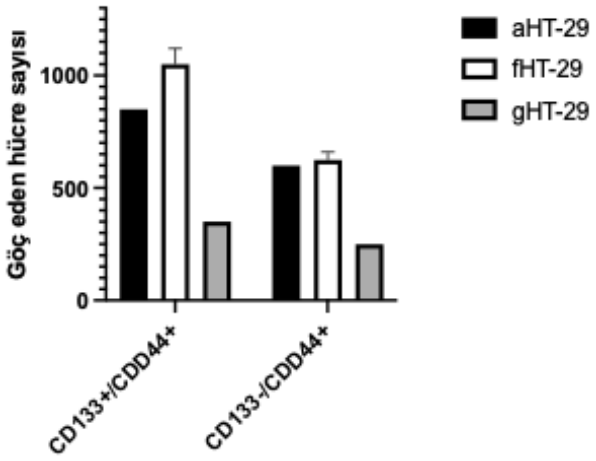


Şekil 3.13 gHT-29 hücrelerinden elde edilen kök hücre alt popülasyonları için çap uzunlukları

Farklı kök hücre popülasyonları arasında sferoid çapları açısından anlamlı bir fark görülmemiştir.

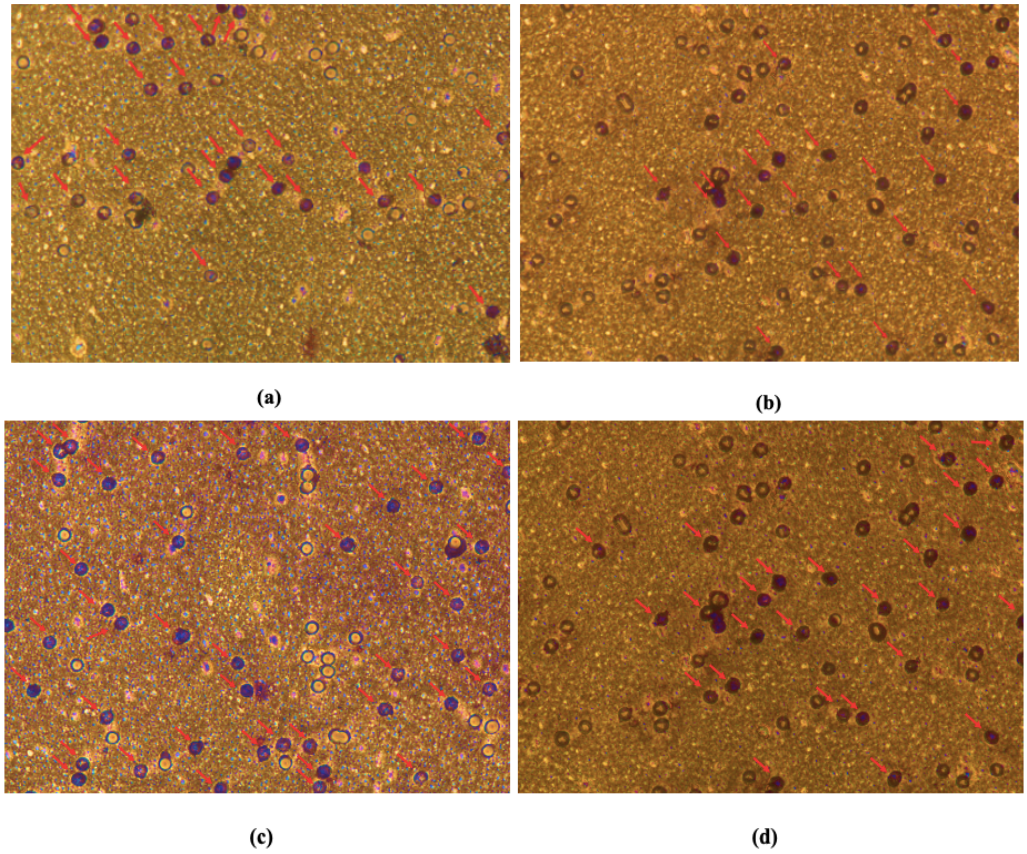
3.6 CD133+/ CD44+ ve CD133-/ CD44+ HT-29 Hücrelerinde *in vitro* Metastaz Kapasitesi

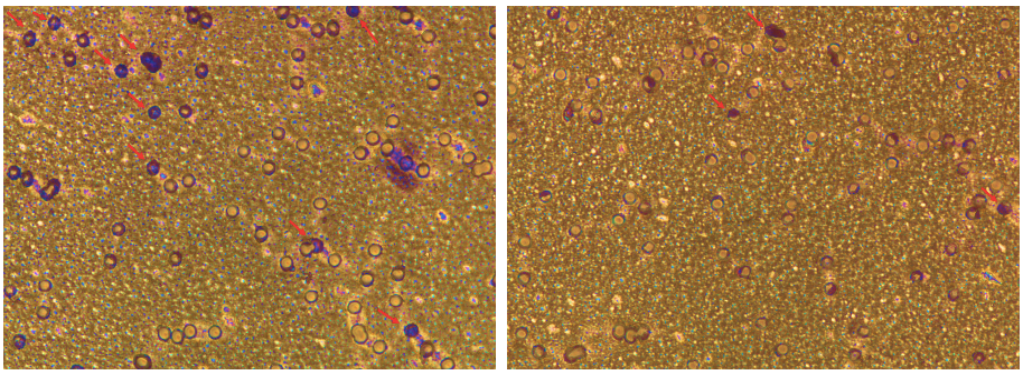
aHT29, fHT29 ve gHT29 hücrelerinden elde edilen kök hücre alt popülasyonları *in vitro* metastaz kapasiteleri açısından karşılaştırılması amacı ile migrasyon analizi yapılmış ve göç eden hücre görüntüleri Şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.14 aHT-29, fHT-29, gHT-29 hücrelerinin kök hücre popülasyonlarında göç eden hücrelerin sayısı

Hücreleri boyama sonrası sayılmış ve grafiği Şekil 3.15'te gösterilmiştir.





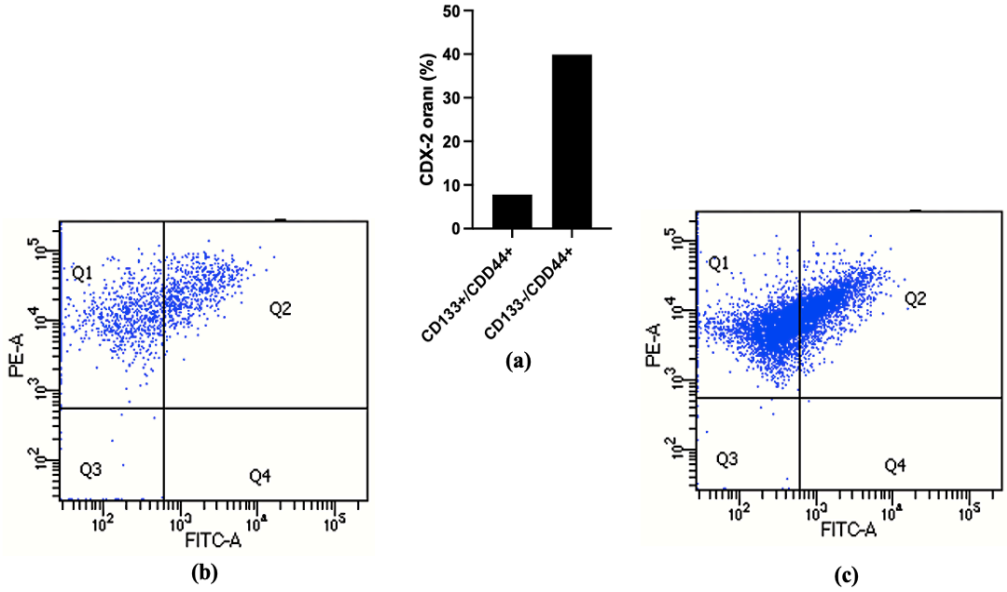
(e) (f)

Şekil 3.15 HT-29 hücrelerinde göç yapabilen hücrelerin 40X mikroskop görüntüleri (a) aHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücreler; (b) aHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133-/CD44+ hücreler; (c) fHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücreler; (d) fHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133-/CD44+ hücreler; (e) gHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücreler; (f) gHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133-/CD44+ hücreler

Sonuçlara göre, bütün hücrelerden elde edilen iki alt popülasyonda CD133+/CD44+ hücrelerinin daha fazla göç ettiği görülmüştür. Geri farklılaşmış CD133-/CD44+ hücrelerde diğer hücre durumlarına göre daha az, farklılaşmış hücrelerin ise en fazla göç eden hücreler olduğu görülmüştür.

3.7 CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ HT-29 Hücrelerinde Epitel Belirteç olan CDX-2 İncelenmesi

Ayrımlanan alt popülasyonların epitel ve aynı zamanda farklılaşma belirteci olan CDX-2 proteinin düzeyleri akış sitometri ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 3.16'de verilmiştir.



Şekil 3.16 aHT-29 hücrelerinden elde edilen iki kök hücre alt popülasyonu için (a) CDX-2 protein oranları, (b) CD133+/CD44+ hücrelerinde Q2 kapısı %7,8 CDX-2 + hücreler, (c) CD133-/CD44+ hücrelerinde Q2 kapısı %39,9 CDX-2 + hücreler

Epitel hücre belirteci olan CDX-2 proteinin CD133+/CD44+ hücrelerde daha az CD133-/CD44+ hücrelerde daha fazla görülmüştür.

BÖLÜM DÖRT

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, kanser hücre plastisitesini yansıtan bir hücre modeli olarak HT-29 hücre hattı kullanılmıştır. Kolon adenokarsinom olan HT-29 hücreleri, epiteliyal morfolojiye ve adheren büyüme tipine sahip hücrelerdir. HT-29 hücreleri besin alımı, çoklu ilaç direnci çalışmalarında (Mitchell ve Ball, 2004), *in vivo* sistemi başarılı bir şekilde yansıttığı için *in vitro* koşullarda insan kolon kanser modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Rodrigues vd., 1990). Çalışmada hücrelerin büyüme koşullarının değiştirilmesiyle elde edilen, aHT-29 (atasal), fHT-29 (farklılaşmış), gHT-29 (geri farklılaşmış), olmak üzere üç tip hücre popülasyonu elde edilmiş ve bunlar içerisindeki kök hücre alt popülasyonlarının karakterizasyonu yapılmıştır. Bunun için, HT-29 popülasyonlarının her birinde CD133+/CD44+ (double +) ve CD133-/CD44+ oranları belirlenmiş ve aynı zamanda bu hücrelerin eş zamanlı ayrımlanması sağlanmıştır. Elde edilen CD133+/CD44+ ve CD133-/CD44+ alt popülasyonlarının çoğalma, ilaç hassasiyetleri ve *in vitro* tümör oluşturma ve metastaz kapasiteleri incelenmiştir.

HT-29 hücre tiplerinde kök hücre popülasyonlarının CD133 ve CD44 belirteçlerine göre ayrımlanması sonucunda, atasal, farklılaşmış, geri farklılaşmış yönünde CD133+/ CD44+ alt popülasyonun azaldığı, ve CD133-/CD44+ alt popülasyonun arttığı gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan farklı HT-29 tiplerinde CD133-/CD44- hücreye rastlanmamıştır. Bu durum özellikle farklılaşmış grup için beklenmedik bir durum olarak düşünülmesine rağmen bu modelin hali hazırda kanser olan bir hücre hattından oluşturulduğu ve dolayısı ile "farklılaşmış" ifadesinin normal bağırsak epitel hücreleriyle eşdeğer olmadığı gözetilmelidir. Elde edilen alt popülasyonlardan biri double+ diğeri ise CD44+ olduğundan, bunlar iki farklı CSC alt popülasyonu olarak değerlendirilmiştir. Atasal HT-29 popülasyonunda oldukça yüksek oranda CD133+/CD44+ alt kök hücre popülasyonu ve az miktarda CD133-/CD44+ kök hücreleri bulunmaktadır. Bulgular, atasal HT-29 hücreleriyle gerçekleştirilen bir diğer çalışmayla uyuşmaktadır (Wang vd., 2012). CD133, hem birincil kolon kanseri hem de kolon kanseri hücre hatlarında CSC'lerin izolasyonu ve tanımlanması için günümüzde kabul edilen bir belirteçtir (De sousa vd., 2011). CD133, CD133+ ve CD133- popülasyonlarının sınıflandırılmasını mümkün kılan ve ek kanser kök hücresi

(CSC) tanımlama hücre yüzey işaretleri ile karşılaştırma yeteneği sağlayan FACS tarafından güçlü, heterojen ifadesi nedeniyle CSC'lerin belirteci olarak kabul edilmiştir (Clevers, 2011). Kolon kanserinde CD133 ifade düzeyinin negatif bir prognostik belirteç olduğu, CD133 pozitifliğinin düşük hayatta kalma ile ilişkili kolon kanseri vakalarını belirlediği bilinmektedir (Chen, 2013). CD133 ve CD44'ün birleşik kullanımının ise, tek işaretli analizlerle karşılaştırıldığında, düşük ve yüksek riskli CRC vakalarının ayrımını iyileştirdiği bulunmuştur (Horst vd., 2009). Kolorektal kanser hastalarından elde edilen materyal kullanılarak yapılan ve yüksek CD133/CD44'ün birleşik ifadesinin kolorektal kanser kök hücrelerini ve kötü prognozlu tümörleri tanımlamada yararlı olduğu gösterilmiştir (Galizia vd., 2012; Chen, 2013). Tüm bu bulgular yanında CD133 pozitifliğinin tümör başlatma için mutlaka gerekmediği, CD44+ hücrelerin farklı hücrelerde daha agresif davranabildiği de çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (Wang 2012; Schmelkov, 2008). Dolayısı ile kök hücre popülasyonlarının karakterizasyonu önem taşımaktadır.

Öncelikle tüm kök hücre alt popülasyonları için hücre çoğalma hızları karşılaştırılmıştır. aHT-29 , fHT-29 ve gHT-29 gruplarında CD133+/CD44+ alt popülasyonunun daha yüksek çoğalma hızına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulguya benzer şekilde, daha önce SW620 CRC hücre hattı ile yapılan bir çalışmada CD133+/CD44+ hücrelerin daha yüksek bölünme hızları olduğu gösterilmiştir (Wang, 2012). gHT-29 hücrelerinin iki kök hücre alt popülasyonu da diğer kök hücre popülasyonlarına kıyasla en yavaş ve fHT-29 hücrelerinin iki kök hücre alt popülasyonu da diğer kök hücre popülasyonlarına kıyasla en hızlı bölünmeyi gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada farklılaşmış hücre grupları geri farklılaşma hücrelerinden daha yüksek çoğalma göstermiştir (Pastushenko vd., 2018). Daha önceki çalışmamızda farklılaşmış HT-29 hücrelerinin daha epitel ve geri farklılaşmış hücrelerin ise daha mezenkimal özellik gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda, epitel hücrelerin hızlı bölünme kapasitesi bu durumla uyumludur (Şahin, 2022). Ayrıca önceki çalışmamızla kıyaslandığında atasal, farklılaşmış ve geri farklılaşmış ana popülasyonların çoğalma hızları, bunlardan elde edilen kök hücre alt popülasyonlarından daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum, popülasyonların bir arada bulunduklarında birbirlerini çoğalma yönünde tetiklediğini düşündürmektedir.

Çalışmada ikinci olarak, HT-29'un farklı tiplerinden elde edilen kök hücre popülasyonlarının oksaliplatin (OP) ve 5-florourasil (5-FU) ilaçlarına direnç düzeyleri karşılaştırılmıştır. Kolorektal kanser tedavisinde 5-florourasil kemoterapisi başta gelmektedir. Son yıllarda 5-FU ile kombine kullanımlarda yer alan Oksaliplatin, kolorektal kanser tedavisinde olumlu sonuç vermektedir (Vodenkova vd.,2020). Kolorektal kanser tedavisinde 5-FU ile %12-24 yanıt alınırken, Oksaliplatin ilavesiyle tedaviye yanıt %60'lara yükselmiştir (Rothenberg, 2000). Kombine tedavi ile hücrenin 5-FU'ya olan duyarlılığını arttırmak ve direnç oluşmasını önlemek tedavide önem teşkil etmektedir. Oksaliplatinin, DNA'da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlanmalar yaparak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonu engellemek suretiyle etki gösterdiği düşünülmektedir (Asmis vd., 2008). Oxaliplatin ayrıca diğer sitotoksik ilaçlarla sinerjistik olarak etki eder, ancak bu etkilerin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Raymond vd., 1998). 5-FU ise nükleositlerin metabolizmasını bozarak hücre ölümüne yol açar, ancak etkinliği, CRC hücrelerinin 5-FU'ya direnci ile gölgelenir (Zhang, 2008). Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, aHT-29 ve fHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133-/CD44+ alt popülasyon, CD133+/CD44+ hücrelere göre her iki ilaca da daha dirençlidir. Her iki ilacın da bölünme kapasitesi yüksek olan hücrelerde daha etkili olduğu bilinmektedir. CD133-/CD44+ hücrelerin bölünme hızlarının ise daha az olduğu belirlenmişti. Dolayısı ile bu durum hücre çoğalma sonuçlarıyla uyumludur. Farklı bir CRC hücre hattı kullanılan bir başka çalışmada, CD133-/CD44+ hücrelerin camptothecin ilacına daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Wang, 2012).

İlk hücre kültürü çalışmaları, basit bir besiyeri ile halen kullanımda olan 2B yöntemiyle başlamıştır. 2B kültür artık standartlaştırılmış ve uygun maliyetli bir analiz yöntemi sunsa da, hücreleri 3B olarak oluştukları ortamın aksine morfolojilerini değiştirerek düz bir yüzeye yapışmaya zorlar. Bu nedenle vücudun doğal ortamını taklit edemez veya hücrelerin çevreleriyle etkileşimini gösteremez (Knight ve Przyborski, 2015). 3B hücre kültür yöntemleri, 3B matris içerisinde tutunmuş duran hücrelerin doğal şekillerini korumalarını veya biyolojik metabolizmalarını gerçeğe daha yakın şekilde gerçekleştirmelerine olanak sağlamaktadır. Bu ortamların hücrelerin tutunma, sinyal ve göç mekanizmalarında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Yamada vd., 2019). Bu nedenle, 3B kültürdeki hücrelerle yapılan

analizler 2B ile kültürlenen çalışmalara oranla daha sağlıklı sonuçlar sağlamaktadır (Bolhaqueiro vd., 2018). 3B kültürlerde yaygın olarak kullanılan teknikler arasında sferoid veya organoid sistemleri, mikroakışkanlar, hidrojeller ve 3B biyobaskı (3D Bioprinting) bulunmaktadır (Vijayavenkataraman vd., 2018). Sferoid oluşturmak için kullanılan, literatürde tanımlı az sayıda yöntem bulunmaktadır. Bunlardan biri, düşük yapışma (low attachment) özelliğinde malzeme ile kaplı, 96-1536 arası kuyucuk bulunduran kültür kaplarının kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Düşük yapışma özelliği, yüzeye tutunmadan ve hücre farklılaşmasını engellemeden büyüyebilen kök hücre fenotipi ile daha fazla hücrenin büyümesini sağlar. Bu nedenle, bu yöntem genellikle *in vivo* tümörgenez analizlerinin *in vitro* versiyonu olarak kullanılır. Literatürde sferoidler için ideal ölçülerin 100-500 μm arasında olduğu belirtilmektedir (Hildebrandt vd., 2011). Ancak 200 μm ve üzeri olana sferoidlerde sıkışıklık artığı için iç kısımda kalan hücrelerin, azalan besin ve oksijen transferi ve sferoidin büyümesiyle orantılı artan kaspaz aktivitesi nedeniyle ölüme gittikleri bilinmektedir (Kelm vd., 2012; Murphy vd., 2014). 200 μm'den büyük yarıçaplı sferoidlerin merkezindeki hücreler, besin taşımasındaki kısıtlılık nedeniyle hipoksiye ve hücre ölümüne karşı savunmasız hale gelmektedir. Bu nedenle çalışmalarda sferoid boyutu dikkatli bir şekilde ayarlanmalıdır (Murphy vd., 2014). Bu çalışmada elde edilen sferoid çapları 15-100 μm arasında değişmekle birlikte kök hücre popülasyonlarının oluşturduğu sferoidler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Çalışmanın bulgularına göre, aHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücrelerin düzgün ve tam bir sferoid oluşturduğu aynı zamanda sayıca CD133-/CD44+ hücrelere göre fazla olduğu gözlenmiştir. fHT-29 hücrelerinden elde edilen alt popülasyonlarda üç boyutlu sferoid yapısı yerine hücrelerin sadece bir araya gelerek iki boyutlu yapıda kaldığı görülmüştür. Atasal hücrelere benzer şekilde, gHT-29 hücrelerinden elde edilen CD133+/CD44+ hücrelerin daha fazla sferiod oluşturduğu görülmüştür. Dolayısı ile CD133+/CD44+ hücrelerinin tümör oluşturma kapasitesi CD133-/CD44+ hücrelerine kıyasla daha yüksektir. Farklı bir kolon kanseri hücre hattı ile yapılan bir çalışmada CD133+/CD44+ hücrelerin daha fazla sayıda koloni oluşturduğu gösterilmiştir (Wang, 2012). Bu bulguları destekleyen bir başka çalışmada, tümör oluşturma kapasitesinin CD133 ifadesinden bağımsız olabildiği, hem CD133+ hem de CD133− kolon kanseri hücrelerinin tümörijenezi başlatabileceği

gözlemlenmiştir (Shmelkov vd., 2008). Ayrıca, nude farelerde tümör oluşumunu başlatmak için sadece 100 CD44+ hücresinin enjeksiyonu yeterlidir ve tek CD44+ hücreleri, çıplak farelere ksenogreftlendiğinde tümörlere dönüşen kök hücre özelliklerine sahip tümör küreleri oluşturur. Bulgulara göre varılan bir diğer sonuç ise geri farklılaşan gruptan elde edilen iki popülasyonun da tümör oluşturma kapasitesinin atasal hücrelere göre daha yüksek olmasıdır. Geri farklılaşan hücrelerin mezenkimal karakterde olduğu göz önüne alındığında bu sonuç beklenen bir durumdur.

Çalışmanın devamında, kök hücre popülasyonlarının göç yeteneği analiz edilmiştir. CD133/CD44'ün yüksek oranda eksprese eden kanser hücresi popülasyonlarının *in vitro* invaziv olduğu ve farelerde *in vivo* metastazlardan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Haraguchi vd., 2008). İstila (invasyon) ve göç ederek yer değiştirme (migrasyon), katı tümörlerin en ölümcül özellikleri olarak kabul edilmiştir ve metastazların çoğundan sorumludur (Yi, 2016). Migrasyon yeteneklerinin kıyaslanmasının hedeflendiği bu deney grubunda hücrelerin metastaz oluşturma kapasitelerine bakıldığında fHT-29 en fazla, gHT-29 en az göç etme yeteneğine sahip olduğu, bütün hücrelerinden elde edilen iki kök hücre alt popülasyonunda CD133+/CD44+ hücrelerinin daha fazla göç ettiği görüldü. CD133+/CD44+ hücrelerinin tüm gruplardaki yüksek göç kabiliyeti literatür ile uyumludur (Lee, 2016; Açıkgöz, 2019). Farklılaşmış hücrelerin yüksek göç kabiliyetini açıklayabilmek için daha fazla veriye vardır. Bu durum farklılaşmış ve geri farklılaşmış hücreler arasında CD133 ve CD44 haricinde başka belirteçlere de bakılması gerekliliğini vurgulamaktadır.

EMT, tümör metastazında, epitel hücrelerinin polaritelerini ve hücre-hücre temasını kaybettiği ve hücre motilitesini ve istilasını kolaylaştırarak hücre iskeletinde dikkate değer bir yeniden modellenmeye uğradığı çok önemli bir olaydır (Kalluri ve Weinberg, 2009). Kanser kök hücre fenotipi genellikle EMT fenotipiyle ilişkilendirilmektedir. Çalışma kapsamında kullanılan CDX-2 epitel bir belirteçtir. Oluşturulan modelde CDX-2'nin aHT-29 hücrelerin kök hücre alt popülasyonu olan CD133-/CD44+ hücrelerde yüksek olduğu, diğer bir kök hücre popülasyonu olan CD133+/CD44+ hücrelerde ise miktarının oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. CDX-2, iyi huylu kolon epitelinde ve çoğu kolorektal adenokarsinomunda ifade edilir (Barbareschi vd., 2003) ve bağırsak metabolizması ve farklılaşmasında yer alan birkaç genin ifadesini

düzenler (Mallo vd., 1997). Literatürde CD133+/CD44+ hücrelerin mezenkimal belirteçleri daha fazla ifade ettikleri belirtilmektedir (Morath vd., 2016; Pachon-Pena vd., 2016). Diğer yandan CD133- kolon kanseri hücrelerinin epitel farklılaşma ile ilişkili antijenler için negatif olduğu gösterilmiştir (Horst vd., 2009). Fakat kullanılan hücre çeşidine göre kök hücre popülasyonlarının farklı özellikler gösterdiği bilinmektedir (Wang, 2012). Hücre bağlantı moleküllerinin azlığının CD133+/CD44+ hücrelere yüksek göç kabiliyeti kazandırması muhtemeldir. Her ne kadar CDX-2 molekülü epitel fenotip için iyi bir belirteç olsa da EMT karmaşık bir süreçtir ve bu sebeple farklı belirteçlerle bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmanın sonuçlarına göre, HT-29 farklılaşma-geri farklılaşma sürecinde kullanılan belirteçlere göre iki farklı kök hücre alt popülasyonu bulunmakta ve hücre çoğalması, ilaç direnci, metastaz kapasitesi ve tümör oluşturma fenotipleri açısından farklılık göstermektedirler. CD44+ kök hücre popülasyonları içinde CD133+ olan alt popülasyon daha fazla hücre çoğalması ve metastaz özelliği gösterirken, CD133- olan popülasyon daha yüksek ilaç direnci ve tümör oluşturma kapasitesi sergilemiştir. Genel olarak, burada sunulan veriler, aynı hücre hattından köken alsa dahi, CD44 ve CD133 için geniş bir ifade aralığına sahip olduğunu göstermiştir. Dolayısı ile CSC'lerin tüm kolon kanseri hücreleri için tek belirteç veya aynı işaret seti ile karakterize edilmesi olası değildir. Farklılaşmamış CSC ve farklılaşmış tümör hücreleri arasındaki geçiş mekanizmaları henüz aydınlatılabilmiş değildir. Çalışmalara bir kök hücre belirteci daha eklenmesi, alt popülasyonların daha iyi tanımlanmasını ve böylece bu heterojenliğin altında yatan moleküler mekanizmaların açığa çıkarılmasını kolaylaştıracaktır.

KAYNAKLAR

Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. ve and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease.

Afify, A., Purnell, P., ve Nguyen, L. (2009). Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Experimental and Molecular Pathology*, *86*(2), 95–100. https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.003

Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., ve Mills, G. (2012). Genetic Alterations in Colorectal Cancer. In *Gastrointest Cancer Res* (Vol. 5). www.myGCRonline.org

Asmis, T. R., Ding, K., Seymour, L., Shepherd, F. A., Leighl, N. B., Winton, T. L., ... & Goss, G. D. (2008). Age and comorbidity as independent prognostic factors in the treatment of non–small-cell lung cancer: A review of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trials. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(1), 54-59.

Barbareschi, M., Colby, T. v, Chilosi, M., Macri, E., Loda, M., ve Doglioni, C. (2003). *CDX-2 Homeobox Gene Expression Is a Reliable Marker of Colorectal Adenocarcinoma Metastases to the Lungs*.

Barker, N., de Wetering, M. van, ve Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. In *Genes and Development* (Vol. 22, Issue 14, pp. 1856–1864). https://doi.org/10.1101/gad.1674008

Basakran, N. S. (2015). CD44 as a potential diagnostic tumor marker. In *Saudi Medical Journal* (Vol. 36, Issue 3, pp. 273–279). Saudi Arabian Armed Forces Hospital. https://doi.org/10.15537/smj.2015.3.9622

Bates, R. C., & Mercurio, A. M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 4, Issue 4, pp. 365–370). https://doi.org/10.4161/cbt.4.4.1655

Bignold, L. P., Coghlan, B. L. D., ve Jersmann, H. P. A. (2006). Hansemann, Boveri, chromosomes and the gametogenesis-related theories of tumours. *Cell Biology International*, *30*(7), 640–644. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.04.002

Bolhaqueiro, A. C., van Jaarsveld, R. H., Ponsioen, B., Overmeer, R. M., Snippert, H. J., & Kops, G. J. (2018). Live imaging of cell division in 3D stem-cell organoid cultures. In *Methods in cell biology* (Vol. 145, pp. 91-106). Academic Press.

Bomken, S., Fišer, K., Heidenreich, O., & Vormoor, J. (2010). Understanding the cancer stem cell. *British journal of cancer*, *103*(4), 439-445.

Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, *3*(7), 730-737.

Bruce, W. R., & Van Der Gaag, H. (1963). A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature*, *199*(4888), 79-80.

Buğra D. (2004). Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. Kolorektal Özel Sayısı. Türkiye Klinikleri Journal of Surgery. 2004, 9(1):1-9.

Chen, Y. C., Chen, Y. W., Hsu, H. S., Tseng, L. M., Huang, P. I., Lu, K. H., Chen, D. T., Tai, L. K., Yung, M. C., Chang, S. C., Ku, H. H., Chiou, S. H., Lo, W. L. 2009. "Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 385 (3):307-13.

Chen S, Song X, Chen Z, Li X, Li M, et al. (2013) CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS One 8: e56380.

Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., ve Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: aacr workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, *66*(19), 9339–9344. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126

Clevers H (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nat Med 17: 313–319.

Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S. M., Simmons, P. J., Peault, B., Buck, D. W., ve Huttner, W. B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(8), 5512–5520. https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5512

Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang , E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., ve Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. www.pnas.org/cgi/content/full/

de Sousa EM, Vermeulen L, Richel D, Medema JP (2011) Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. Clin Cancer Res 17: 647–653.

Erdogan, A., ve Lee, Y. Y. (2019). Colon and pelvic floor anatomy and physiology. In *Clinical and Basic Neurogastroenterology and Motility* (pp. 113–126). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813037-7.00008-X

Eyler, C. E., & Rich, J. N. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *26*(17), 2839.

Fanali, C., Lucchetti, D., Farina, M., Corbi, M., Cufino, V., Cittadini, A., ve Sgambato, A. (2014). Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(4), 923–942. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.923

Ferrer-Vaquer, A., Viotti, M., ve Hadjantonakis, A.K. (2010). Transitions between epithelial and mesenchymal states and the morphogenesis of the early mouse embryo. *Cell Adhesion & Migration*, *4*(3), 447–457. https://doi.org/10.4161/cam.4.3.10771

Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., ve Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: pathologic aspects. In *Journal of Gastrointestinal Oncology* (Vol. 3, Issue 3, pp. 153–173). Pioneer Bioscience Publishing. https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030

Galizia G., Gemei M., Del Vecchio L., Zamboli A., Di Noto R., (2012). Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. Arch Surg 147: 18–24.

Giepmans, B. N. G., ve van IJzendoorn, S. C. D. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1788, Issue 4, pp. 820–831). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.07.015

Hamburger, A.W. ve Salmon, S.E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. In *Bull. Environ. Contam. Toxicol* (Vol. 9). Cambridge Univ. Press. www.sciencemag.org

Hanahan, D. ve Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell, 44*(5), 646-674.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, *100*(1), 57-70.

Haraguchi, N., Ohkuma, M., Sakashita, H., Matsuzaki, S., Tanaka, F., Mimori, K., ... & Mori, M. (2008). CD133+ CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Annals of surgical oncology*, *15*, 2927-2933.

Humphries, A., ve Wright, N. A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 8, Issue 6, pp. 415–424). https://doi.org/10.1038/nrc2392

Huntly, B.J.P. ve Gilliland D.G. (2005). Leukaemia stem cells and the evolution of cancer stem cell research.

Jeff H Tsai, J. Y. (n.d.). *Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis*.

Mallo, G. V., Fiedler, F., Calvo, E. L., Ortiz, E. M., Vasseur, S., Keim, V., ... & Iovanna, J. L. (1997). Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *Journal of biological chemistry*, *272*(51), 32360-32369.

Masters, J.R., Foley C.L., Bisson I. Ve Ahmed A.(2003). Cancer stem cell. Prostate Cancer Research Centre, Institute of Urology, University College London, London, UK

Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44: More than a mere stem cell marker. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *81*, 166-173.

Kalluri, R., ve Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 119, Issue 6, pp. 1420–1428). https://doi.org/10.1172/JCI39104

Klonisch, T., Wiechec, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S. R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., & Los, M. (2008). Cancer stem cell markers in common cancers–therapeutic implications. *Trends in molecular medicine*, *14*(10), 450-460.

Knight, E., & Przyborski, S. (2015). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of anatomy*, *227*(6), 746-756.

Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*, *14*(3), 275-291.

Kusumbe, A. P., Mali, A. M., ve Bapat, S. A. (2009). CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells*, *27*(3), 498–508. https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0868

Kuzu I, Kuzu MA. (2010). Kolorektal kanser patolojisi histopatolojik rapor, evreleme ve prognostik faktörler. Bölüm 7. İçinde: Baykan A, Zorluoğlu A, Geçim E, Terzi C (editörler). Kolon ve Rektum Kanserleri, Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği, İstanbul, 2010:117-144.

Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., ve Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 172, Issue 7, pp. 973–981). https://doi.org/10.1083/jcb.200601018

Li, Z. (2013). CD133: a stem cell biomarker and beyond. In *Experimental Hematology and Oncology* (Vol. 2, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/2162-3619-2-17

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K. , Brisken, C., Yang, J., Weinberg, R. A. (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* 133 (4):704-715.

Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. *Nature reviews cancer*, *12*(5), 323-334.

Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., ve Huttner, W. B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *Journal of Cell Science*, *118*(13), 2849–2858. https://doi.org/10.1242/jcs.02439

Medema, J. P., ve Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. In *Nature* (Vol. 474, Issue 7351, pp. 318–326). https://doi.org/10.1038/nature10212

Mescher AL. (2013) Junqueira's Basic Histology. Text and Atlas. 12th Edition. McGraw Hill.

Miki, J., & Rhim, J. S. (2008). Prostate cell cultures as in vitro models for the study of normal stem cells and cancer stem cells. *Prostate cancer and prostatic diseases*, *11*(1), 32-39.

Mjaatvedt, C.H. ve Markwald, R.R. (1989). Induction of an epithelial- mesenchymal transition by an *in vivo* adheron-like complex. *Developmental Biology, 136*(1), 118- 128.

Moore, K. A., ve Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. In *Science* (Vol. 311, Issue 5769, pp. 1880–1885). https://doi.org./10.1126/science.1110542

Morel, A. P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*, *3*(8), e2888.

Müller, H. A. J., ve Bossinger, O. (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. In *Mechanisms of Development* (Vol. 120, Issue 11, pp. 1231–1256). Elsevier Ireland Ltd. https://doi.org/10.1016/j.mod.2003.06.001

O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., ve Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, *445*(7123), 106–110. https://doi.org/10.1038/nature05372

O'Connor, J. W., ve Gomez, E. W. (2014). Biomechanics of TGFβ-induced epithelial-mesenchymal transition: implications for fibrosis and cancer. *Clinical and Translational Medicine*, *3*(1). https://doi.org/10.1186/2001-1326-3-23

Orian-Rousseau, V. (2010). CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Euro*pean Journal of Cancer, 46(7), 1271–1277. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.024

Pachón-Peña, G., Serena, C., Ejarque, M., Petriz, J., Duran, X., Oliva-Olivera, W., ... & Vendrell, J. (2016). Obesity determines the immunophenotypic profile and functional characteristics of human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells Translational Medicine*, *5*(4), 464-475.

Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., ... & Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, *556*(7702), 463-468.

Pattabiraman, D. R., Bierie, B., Kober, K. I., Thiru, P., Krall, J. A., Zill, C., Reinhardt, F., Tam, W. L. ve Weinberg, R. A. (2016). Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. Science 351 (6277):aad3680.

Pinto, M., Appay, M. D., Simon-Assmann, P., Chevalier, G., Dracopoli, N. ve Fogh, J. (1982). Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Cell Growth Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association For Cancer Research, 44*(2), 193-196.

Polyak, K., Weinberg, R. A. 2009. "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." *Nat Rev Cancer* 9 (4):265-73.

Ponta, H., Sherman, L., ve Herrlich, P. A. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 4, Issue 1, pp. 33–45). https://doi.org/10.1038/nrm1004

Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A., & Cvitkovic, E. (1998). Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology*, *9*(10), 1053-1071.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*, *414*(6859), 105-111.

Ricci-Vitiani, L., Fabrizi, E., Palio, E., ve de Maria, R. (2009). Colon cancer stem cells. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 87, Issue 11, pp. 1097–1104). https://doi.org/10.1007/s00109-009-0518-4

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., ve de Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon cancer initiating cells. *Nature*, *445*(7123), 111–115. https://doi.org/10.1038/nature05384

Rodrigues, N. R., Rowan, A., Smith, M. E., Kerr, I. B., Bodmer, W. F., Gannon, J. V., & Lane, D. P. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(19), 7555-7559.

Rodriguez-Boulan, E., ve Macara, I. G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 4, pp. 225–242). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrm3775

Roignot, J., Peng, X., ve Mostov, K. (2013). Polarity in mammalian epithelial morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(2). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013789

Sade Memişoğlu, A. (2014) Investigation of the molecular pathways involved in intestinal epithelial differentiation [Doktora Tezi]. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.

Sancho, E., Batlle, E., ve Clevers, H. (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 763–770). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.012

Schatton, T., Frank, N. Y., & Frank, M. H. (2009). Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays*, *31*(10), 1038-1049.

Screaton, G. R., Bell, M. V, Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U., ve Bell, J. I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons (CD44 gemn). In *Immunology* (Vol. 89).

Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 51, Issue 1, pp. 1–28). https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.04.007

Sengupta, A., ve Cancelas, J. A. (2010). Cancer stem cells: A stride towards cancer cure? In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 225, Issue 1, pp. 7–14). https://doi.org/10.1002/jcp.22213

Shih, I.-M., ve Kurman, R. J. (2001). *The Pathology of Intermediate Trophoblastic Tumors and Tumor-like Lesions*.

Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology*, *14*(10), 611-629.

Shmelkov, S. V., Butler, J. M., Hooper, A. T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., ... & Rafii, S. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133–metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of clinical investigation*, *118*(6), 2111-2120.

Siegel, R. L., Miller, K. D., ve Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *70*(1), 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21590

Simon-Assman, P., Turck, N., Sidhoum-Jenny, M., Gradwohl, G., Kedinger, M., 2007. “In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation”, Cell Biol Toxicol. 23(4):241-56

Singh, A., & Settleman, J. E. M. T. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, *29*(34), 4741-4751.

Sneath, R. J. S., ve Mangham, D. C. (1998). The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. In *J Clin Pathol: Mol Pathol* (Vol. 51).

Southam, C. M., ve Brunschwig, A. (1961). Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. Preliminary report. *Cancer*, *14*(5), 971–978. https://doi.org/10.1002/1097-0142(196109/10)14:5<971::AID-CNCR2820140510>3.0.CO;2-O

Şahin, Z.A., (2022). Kolon kanseri hücrelerinin mezenkimal-epitel dönüşümü sürecinde epigenetik değişimlerin araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyoloji Yüksek Lisans Tezi

Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*, *19*(11), 1438-1449.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., Nieto, M. A. 2009. "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* 139 (5):871-90.

Thompson, E. W., Torri, J., Sabol, M., Sommers, C. L., Byerst, S., Valverius, E. M., ~11, G. R. M., Lippman, M. E., Stampferr, M. R., Dickson, R. B., ve Thompson, E. W. (1994). Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. In *Clin. Exp. Metastasis* (Vol. 12).

Todaro, M., Alea, M. P., di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., ve Stassi, G. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of

ınterleukin-4. *Cell Stem Cell*, *1*(4), 389–402. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001

Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., Gulotta, G., Dieli, F., De Maria, R., Stassi, G. (2014). CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. Cell Stem Cell 14 (3):342-56.

Uchida, Y., Kitayatna, S. & Duffy, S. (2007). Self as cultural mode of being.

Wang, C., Xıe J., Guo J., Mannıng H.C., Gore J.C, & Guo N., (2012), Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer, DOI: 10.3892/or.2012.1951

Wang, Y., Kuang, H., Xue, J., Liao, L., Yin, F. ve Zhou, X. (2017). LncRNA AB073614 regulates proliferation and metastasis of colorectal cancer cells via the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *93*, 1230–1237.

Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., ve Huttner, W. B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells (Vol. 94). www.pnas.org.

Wıdmaıer E., Raff H. ve Strang K.T. (2014). Yiyeceklerin sindirilmesi ve emilmesi. içinde: vander insan fizyolojisi vücut fonksiyon mekanizmaları. Özgünen T (Çeviri editörü). Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. 13. baskı, Ankara, Güneş kitabevleri, 2014:534-571.

Wielenga, V. J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., ve Pals, S. T. (1999). Expression of CD44 in apc and tcf mutant mice implies regulation by the wnt pathway.

Vijayavenkataraman, S., Yan, W. C., Lu, W. F., Wang, C. H., & Fuh, J. Y. H. (2018). 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*, *132*, 296-332.

Yamada, K. M., & Sixt, M. (2019). Mechanisms of 3D cell migration. *Nature Reviews molecular cell biology*, *20*(12), 738-752.

Yang, J., ve Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. In *Developmental Cell* (Vol. 14, Issue 6, pp. 818–829). https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.009

Yeung, T. M., Gandhi, S. C., Wilding, J. L., Muschel, R., ve Bodmer, W. F. (2010). Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(8), 3722–3727. https://doi.org/10.1073/pnas.0915135107

Yi Y-S. (2016).Functional role of milk fat globule-epidermal growth factor VIII in macrophage-mediated inflamma- tory responses and inflammatory/autoimmune diseases. *Mediators Inflamm*; 2016: 5628486.

Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D. W., ve Johnson, R. H. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells myelomonocytic, and megakaryocytic repopulation *in vivo* while the cd34 dim population contains lineage-committed.

Zhou, L., Zhang, R., Zhang, L., Sun, Y., Yao, W., Zhao, A., Li, J., ve Yuan, Y. (2013). Upregulation of transgelin is an independent factor predictive of poor

prognosis in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Science*, *104*(4), 423–430. https://doi.org/10.1111/cas.12107

Zoetemelk, M., Rausch, M., Colin, D. J., Dormond, O., Nowak Sliwinska, P. (2019). Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. Sci Rep 9 (1):7103.

Zweibaum, A. M., Pinto, G., Chevalier, E., Dussauix, N., Triadou B. ve Lacroix, K. (1985). Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar free medium and its inhibition by glucose. *Journal of Cellular Physiology, 122*(1), 21-29.