

Kanser Kök Hücreleri ve Notch Yolağında Umut Veren Ortak Embriyonik Dönem İnhibisyonu

Gülperi Öktem^{1*}, Serap Uslu^{1*}, Ayşegül Uysal¹, Ayhan Bilir², Şule Ayla³, Burak Cem Soner⁴, Çağ Çal⁴

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

²İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³Şanlıurfa Kadın Hastalıkları ve Doğumevi, Şanlıurfa

⁴Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Eğitimi ve Bilişim Anabilim Dalı, Konya

⁵Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, İzmir

*Araştırmacılar bu çalışmaya eşit olarak katkı sağlamışlardır.

Özet

Amaç: Notch sinyal iletimi, embriyonik ve postnatal gelişimde hücre kaderinin belirlenmesi ve kök hücre devamlılığının sağlanmasında rol oynar. Erişkinde bu etkilerin çeşitli nedenlerle aksamasıyla Notch, onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak etki eder. Notch 1 reseptörü, ligantları Delta 1 ve Jagged 1 hücre membranı ile bağlantılı olup embriyogenezis ve malign hastalıkların gelişim sürecinde etkilidir. Kanser Kök Hücreleri (KKH), pek çok özelliğiyle kök hücreye benzeyen tümör hücreleridir. Verapamil, KKH'de "Side Population" (SP) hücrelerini tamamen ortadan kaldıran bir Ca²⁺ kanal blokeridir. Verapamil uygulamalarının embriyonik gelişimde etki mekanizmalarının belirlenmesi, tedaviye dirençli KKH'nin yok edilmesi için yeni tedavi seçeneklerinin ortaya konmasında yol gösterici olabilir.

Yöntem: Bu çalışmada, Verapamil'in sublethal dozlarının embriyogenezis sürecindeki etkileri fetal böbrekte inceleyerek Notch yolağında olası değişimlerin gösterilmesi amaçlandı. Gebeliğin 9. gününden (E9) itibaren 2x10mg/kg/gün Verapamil uygulandıktan sonra (E18) ve (E21) günlerde fetal böbrek dokuları incelendi. Kök hücreleri için c-kit reseptör tirozin kinaz (CD 117) ile Notch yolağında ise Notch 1 reseptörü, Delta 1 ve Jagged 1 immunohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: Verapamilin böbrek embriyonik gelişim sürecinde Notch yolağında inhibitör etkisinin (E21)'de belirgin olarak arttığı, glomerüller ve tübül alanlarda c-kit immunoreaktivitesinin azaldığı görüldü.

Sonuç: Verapamilin embriyonik gelişim üzerindeki etkilerinin, KKH'nin yok edilmesi için yeni tedavi seçeneklerinin ortaya konmasında yol gösterici olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: Kanser kök hücre, notch yolağı, verapamil

Cerrahpaşa Tıp Derg 2009; 40: 23-27

The promising inhibition of the joint embryonic period in the cancer stem cells and notch pathway

Abstract

Objectives: The Notch signaling plays role to provide determining of cell fate and surviving of stem cell in the embryonic and postnatal development. The retardation effects of Notch in adult acts as oncogene or tumor suppressor gene. Notch 1 receptor and Notch ligands, Delta 1 and Jagged 1 interconnect with plasma membrane plays active role in duration of embryogenesis and malign diseases development. Cancer Stem Cells (CSC) are tumor cancer cells, their many characteristics are similar with stem cells. Verapamil is a calcium canal blocker which completely disappeared "Side Population" (SP) cells. If effective mechanism of Verapamil enlightened in the embryonic development, it could be guide in cancer researches for many new alternative therapies by the way of CSC.

Methods: In our study, we aimed to examine possible changes in the Notch pathway of sublethal doses of Verapamil in the fetal kidney during embryogenesis. Verapamil was administrated 2x10mg/kg/day from embryonic 9th day (E9) and fetal kidneys were removed in 18th (E18) and 21th (E21). C-kit receptor tyrosine kinase (CD 117) for stem cells and Notch 1 receptor, Delta 1 and Jagged 1 ligands in the Notch pathway was determined by immunohistochemistry.

Results: As a result, inhibitor effect (E21) of Verapamil in Notch pathway was significantly increased, immunoreactivity of c-kit decreased especially in glomerular and tubular areas in the metanephric kidney.

Conclusion: In conclusion the effects of Verapamil in embryonic development and the correlative mechanism with CSC can be guide for the treatment of cancer and enable to new alternative therapies.

Key words: Cancer stem cells, notch pathway, verapamil

Cerrahpaşa J Med 2009; 40: 23-27

Alındığı Tarih: 16 Şubat 2009

Yazışma Adresi (Address): Doç. Dr. Gülperi Öktem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İzmir

e-posta: gülperi.oktem@ege.edu.tr

Kanser kök hücreleri (KKH)'ne bağlı oluşan direncin ortadan kaldırılarak kanserin tedavi edilmesini hedefleyen çalışmalar giderek yoğunlaşmaktadır. Embriyonik dönemden itibaren Kök Hücre ve Notch yolağın-

daki ortak inhibisyonun tanımlanması ve yeni invitro araştırmalarla desteklenmesiyle kanser tedavisi için umut verici gelişmeler yaşanacaktır. Son yıllarda kanser tedavilerinde dikkati çeken ve tedavide yardımcı yeni hedef moleküllerin ortaya çıkmasını sağlayan en önemli gelişmelerden biri embriyonik ve tumorojenik yolların birbirleriyle bağlantılarının keşfedilmesidir [1,2]. Agresif tumor hücreleri embriyonik projenitörlerle pek çok karakteristik özellik paylaşır. Bu tumor hücrelerinin plastisitesi ise bir "puzzle" ın taşları gibidir. Karışık ve halen anlaşılmasız olan bağlantı kök hücre ve onun çevre dokusu arasında ortaya çıkmaktadır ve bu da hücre kaderinin belirlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Öncelikle aydınlatılması gereken Kök hücre nasıl bir değişime uğramakta ve onkogenezişte rol almaktadır?

Kanser kök hücresi (KKH) normal kök hücre ve KKH arasındaki kendi kendini yenileyebilme mekanizmasındaki benzerlikten kaynaklanmıştır. Her iki tip hücre de kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahiptir. Bununla beraber tümör dokusu hücre fenotip yönüyle heterojendir, çoğalma potansiyeli ve süregelen mutasyonlar bu heterojeniteyi kısmen açıklar [3,4]. KKH tümör hücresinin küçük bir gurubudur, kendini yenileme özelliği vardır heterojen tümörün bütün bölümlerinde görülebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda normal kemik iliğinde primitif CD34 low/neg kök hücre popülasyonunun olduğu belirlenmiştir [5]. Bu alt grup lipofilik boyaları geçirme kapasitesine sahiptir ve karakteristik görünüşleri sebebiyle bu hücrelere "side population" (SP) hücreleri olarak tanımlanır. İnsan da dahil olmak üzere pek çok türde kemik iliğinde ve kas dokusunda belirlenmiştir. Ca²⁺ kanal blokeri olan Verapamil SP hücrelerini tamamen ortadan kaldırabilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle, Verapamil uygulamalarının embriyonik gelişime etkilerini ve etki mekanizmalarını belirlemek, tedaviye dirençli KKH'nin yok edilmesi için yeni tedavi seçeneklerinin ortaya konmasında yol gösterici olabilir [6,7,8].

Kanserde embriyonik dönemde tanımlanan pek çok yolak kök hücre gelişimini düzenler. Örneğin Oct-4, BMP, Janus kinaz ailesi, Notch, SHH, wnt sinyal ileti yolağı gibi kanser gelişimi ile bağlantılı yollar aynı

zamanda kök hücrenin kendi kendini yenileme özelliğini de düzenler. Bunlardan "Notch" geni ilk olarak 1980'lerde *Drosophila*'da izole edilmiştir. Notch gelişimsel olarak korunan transmembran reseptörlerini kodlar ve bu reseptörler birbirinden farklı ama eşit olarak korunmuş transmembrana bağlanan iki ayrı ligant ailesi tarafından aktive olurlar. Böylece Notch sinyali hücre-hücre bağlantısı yoluyla meydana gelir [9].

Bu çalışmada, Verapamil ile karşılaşan SP hücrelerinin akım sitometri cihazında tamamen yok olması özelliğinden yola çıkılmıştır. Embriyonik dönem sonrası sublethal dozlarda Verapamil uygulanan sıçanlarda, embriyonik dönemde bir kök hücre belirleyicisi olan CD 117 (c-kit reseptör tirozin kinaz) ekspresyonundaki değişimin ve Notch sinyal iletilisinde yaptığı değişikliklerin fetal böbreklerde immunohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Deney Modelinin Oluşturulması

Bu çalışmada ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen beş aylık Wistar-Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar çalışmadan bir hafta önce deney hayvanları üretme çiftliğinden alınarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi Anabilim Dalı laboratuvarında gruplara ayrılıp deneye alındı. Sıçanlar oda ısısında ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık evrede tutulup standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Bu çalışma Ege Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Gruplar E18 Kontrol (n=10), E18 Verapamil (n=8), E21 Kontrol (n=6) ve E21 Verapamil (n=8) olarak düzenlendi. Araştırmanın başında gebe bırakılan sıçanlara düşük oluşmasını engelleyecek miktarda uygun Verapamil dozu belirlenmeye çalışıldı. Yapılan çalışmalar intraperitoneal uygulamada 67 mg/kg/gün verapamil dozunun sıçanlar için lethal doz olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada sıçanlarda düşük takibi yapılarak sublethal dozlar uygulandı ve gebeliğin 9. gününden (E9) itibaren 2x10 mg/kg/gün Verapamil'in uygun doz olduğu belirlendi. Gebe sıçanlar E18 ve E21 günlerde sakrifiye edilerek fetal böbrek dokuları incelendi.

Doku Takibi ve İmmunohistokimya

Dokular %4 paraformaldehit (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) içinde 24saat, 4°C' de bekletildi. Fiksasyon sonunda rutin doku takibine alındı ve hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kesitler (Leica MR 2145) elde edildi. Rutin protokole uygun olarak etanol serilerinden geçirildi ve immunohistokimyasal analiz için hazır hale getirildi. Dokular önce distile su ardından 10 dk. Fosfat tamponlu salin (PBS) uygulandı. Sonrasında 50 mM Tris buffer (pH 7,5) içerisindeki % 2 trip-sin'de (Sigma chemical Co. St. Lois, Missouri, USA) 37°C 15 dk. bekletildi. Kesitlerin çevresi Dako pen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çizilerek görünür hale getirildi ve %3 H₂O₂ solüsyonunda 15 dk. endojen peroksidaz aktivitesi için bekletildi. Sonrasında kesitler primer antikorlar ile inkübe edildi. C-kit (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, sc- 168), Notch 1 (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, sc-6014), Jagged 1 (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, sc-6011) ve Delta 1 (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, sc-8155) antikorları kullanıldı. Kesitler Biotinli sekonder antikorla ve Streptavidin konjuge horseradish peroxidase (herikisi de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA) ile en az 30 dk. inkübe edildi. Son olarak Diaminobenzidine (DAB) (DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega, Madison, USA) eklendi ve 5dk. kadar beklenerek immunohistokimyasal işaretlenmesi sağlandı. Bütün dilusyonlar ve yıkama basamaklarında PBS kullanıldı. Kesitlere Mayer hematoksilen (Zymed Laboratories, U.S.A.) ile zıt boyama yapıldı. Sudan geçirildikten sonra etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilen ile temizlenerek entellan (Merck) ile kapatıldı. Negatif kontroller için primer antikör uygulamasından önce yukarıdaki protokol uygulandı. Pozitif kontrolünde nöroblastom kesitleri kullanıldı. İmmunoreaktivite, negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak değerlendirildi.

Bulgular

Bu çalışmada kök hücrelerin embriyogenezis sırasındaki değişimi, bir protoonkogen olan ve projenitör hücre belirleyicisi olarak kullanılan c-kit reseptör tirozin kinaz (CD 117) ile Notch yolağı Notch 1 reseptörü, Delta 1 ve Jagged 1 ligantlarındaki değişiklikler immu-

nohistokimyasal olarak incelendi. E18 ve E21 günlerden alınan örneklerde kontrol gruplarında c-kit (Şekil 1), böbrek glomerüler ve özellikle tübüler alanlarda Notch 1, Jagged 1 ve Delta 1 immunoreaktiviteleri güçlü (+++) olarak bulundu. Deney gruplarında Verapamil'in metanefrik böbrek gelişimini engelleyici etkisi izlenmedi. Bununla beraber kök hücre ve Notch yolağı ile c-kit üzerindeki inhibitör etkisi her iki embriyonik günde de gözlemlendi. (E18) Verapamil gurubunda c-kit (Şekil 2), Notch 1 ve Delta 1 orta derecede (++) immunoreaktivite gösterirken Jagged 1 negatif olarak bulundu (Şekil 3). (E21) Verapamil uygulanan gruplarda immunoreaktivitenin belirgin olarak azaldığı saptandı. Söz konusu bu gruplarda Notch 1'de orta derecede (++) (Şekil 4), c-kit ve Delta 1'de (Şekil 5) zayıf (+), Jagged 1'de ise negatif immunoreaktivite bulundu (Tablo1).

Tartışma

KKH'ne bağlı oluşan direncin ortadan kaldırarak kanserin tedavi edilmesini hedefleyen çalışmalar giderek yoğunlaşmaktadır (10). Kök hücre tiplerinin, bölünme, kendini yenileme süreçlerinde ve hücre içi sinyalinde embriyonal dönemden itibaren içerdiği yolların birbiri ile benzerlikler göstermesi, bununla birlikte embriyonal gelişimdeki mekanizmalar ile onkogenetik süreç ilişkisinin aydınlatılması bu çalışmanın çıkış noktasıdır [11]. Bu çalışmada KKH'de etkili olduğu düşünülen Verapamil'in kök hücre gelişimi [12] ve Notch sinyaline etkisi incelenmiştir. Sublethal dozda böbrek gelişiminde ışık mikroskop düzeyinde gelişim kusuru oluşturmadan kök hücre sayısında azalma ve Notch sinyaliletisinde değişiklik oluşturduğu belirlenmiştir.

Normal kök hücreler farklılaşmamış ve özelleşmemiş hücrelerdir. Kendilerini yenilerler. Bir veya daha fazla özelleşmiş hücre tipine, kendilerine ait olan fonksiyonlarını kazanarak dönüşürler. Normal kök hücrenin belirleyici özelliği herhangi bir aktivite göstermeden veya bölünmeden kalabilme, asimetric bölünme ve multipotent olma özelliğidir. Memelilerde üç tip kök hücre bulunmaktadır. Bunlar embriyonal, germinal ve somatik (erişkin) kök hücrelerdir [13]. Embriyonal kök hücreler fertilizasyona uğramış embriyonun 1. bölünmesinden sonra ortaya çıkarlar. Erişkin organların tamamına dönüşebilme yetenekleri vardır. Embriyonik dönem bo-

yunca embriyonal kök hücreler sahip oldukları özellikleri kaybederler ve farklılaşma yeteneği kazanırlar. Erişkindeki germinal kök hücreler ovum ve sperm üreterek üremeden sorumludurlar. Somatik kök hücreler sınırlı farklılaşma potansiyeline sahiptir ve matür hücrelere farklılanırlar. Farklı tiplerdeki kök hücreler farklı özellikleri vardır ve birbirinden farklı şekillerde proliferer olurlar. Erişkin kök hücreler oluşturdukları organdan köken alırlar. Uzun süren kopyalanabilme potansiyeli vardır ve organın hücresel bölümleri arasında kendini yenileme ve farklılanma özellikleri vardır [13].

SP hücreleri izole edildikleri dokularda kök hücre fonksiyonu gösterirler ve transdiferansiye olabilirler [14]. Bulgular SP hücrelerinin daha önce insan solid tümörlerinde tanımlanamayan hücre popülasyonu olduğunu göstermiştir [8,15]. Bu hücrelerin yüksek ilaç dışarı atma yeteneklerinin MDR1 den farklı olarak ABCG2 ve ABCA3 içeren ilaç taşıyıcı proteinlerinden kaynaklandığını göstermektedir [8,16]. Bu sebeple bu malign hücreler hızlı çoğalırlar ve pek çok sitotoksik ilacı hücre dışına atarlar, böylelikle kemoterapiye dirençli hale gelirler ve hastalığın tekrar etmesine neden olurlar [17]. Kök hücre subpopülasyonu insanlar da dahil olmak üzere pek çok memelide Rhodamine 123 ve Hoechst 33342 kullanılarak gösterilebilir. Bu çalışmada, ilk aşamada fertilizasyonun 1. gününden itibaren hayvanlara enjekte edilen Verapamil gebe sıçanlarda önlenemez düşüklere neden olmuştur. Bu düşüklere Verapamilin embriyonik kök hücre gelişimindeki olumsuz etkiden kaynaklanması olasıdır. Ancak 9. günde verilen Verapamil sonrasında gebeliklerini devam ettirebilen hayvanlara uygulanan ilaç uygulamaları olasılıkla somatik kök hücre gelişiminde değişikliklere neden olduğu düşünülebilir. Kök hücre aktivitesini sadece c-kit ekspresyonu ile tartışmak tam olarak mümkün değildir. Ancak bu başlangıç çalışmasında, kök hücre profili hakkında bir miktar bilgi verebilir.

Notch sinyal iletilisinin embriyonik gelişimde olduğu kadar kanser gelişiminde de rol oynadığının ortaya konmuş olması ve bütün bu yolağın kök hücre ile bağlantısının kurulması bilim çevrelerinin bu moleküle olan ilgisini arttırmıştır (18). Memelilerde *Drosophila Serrata* [19] ile ilişkili 4 adet Notch reseptörü (Notch 1-4) ve 5 ligant vardır (Delta-like 1,3,4 ve Jagged 1-2) vardır [20].

Notch sinyali embriyonik dönemde, hücre kaderinin belirlenmesinde çok önemli bir role sahip olup solucandan insana kadar tüm evrim sürecinde korunur. Aktive Notch sinyali kök hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkiler [21].

Önceki kanser modellerinde hücrelerin önlenemeyen büyümesinin bir seri genetik kazanım sonunda olduğu düşünülmekteydi. Bu genetik aktivasyonların hücrelerin proliferasyon potansiyellerini artması, proliferasyonu inhibe eden genlerin sessizleşmesi ve programlı hücre ölümüne ait genlerin by-pass edilmesi şeklinde ortaya çıktığı düşünülüyordu [22,23]. KKH hipotezinde, tümör progresyonundaki diğer anahtar rol kök hücre yenilenmesine ait genlerin düzenlenmesindeki değişikliklerdir.

Birbirleriyle benzer özelliklere sahip kök hücre alt grupları ve onkogenezis ile paralel sinyal ileti molekülleriyle devamlılığı sağlanan embriyonik gelişimin cevabı aranan soruların açığa çıkmasında yardımcı olacaktır. KKH'deki SP hücrelerini ortadan kaldıran Verapamil'in Notch sinyal yolağına ve kök hücre gelişimine onkogenetik süreçte olduğu gibi embriyo döneminde de etkisi vardır. İleri çalışmalarla bu moleküller ile KKH ve embriyogenezis ilişkisinin aydınlatılması kanser tedavisinde yeni modellerin ortaya çıkmasına yardımcı olabilecek niteliktedir.

Kaynaklar

1. Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, et al. Emerging roles of nodal and Cripto-1: from embryogenesis to breast cancer progression. *Breast Dis* 2008; 29: 91-103.
2. Leong KG, Gao WQ. The Notch pathway in prostate development and cancer. *Differentiation* 2008; 76: 699-716.
3. Raaijmakers MH, Scadden DT. Divided within: heterogeneity within adult stem cell pools. *Cell* 2008; 135: 1006-1008.
4. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112: 4793-4807.
5. Pearce DJ, Ridler CM, Simpson C, Bonnet D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood* 2004; 103: 2541-2546.

6. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy. *Cell Cycle* 2005; 4: 203-205.
7. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14228-14233.
8. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005; 65: 6207-6219.
9. Chen J, Crabbe A, Duppen VV, Vankelecom H The notch signaling system is present in the postnatal pituitary: marked expression and regulatory activity in the newly discovered side population. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 3293-3307.
10. Bozkurt KM. Kemoterapi ve Kanser Kök Hücreleri. İstanbul: Uyum Yayıncılık; 2007.
11. Marotta LL, Polyak K. Cancer stem cells: a model in the making. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 44-50.
12. Morrow M, Wait RB, Rosenthal RA, Gamelli RL. Verapamil enhances antitumor activity without increasing myeloid toxicity. *Surgery* 1987; 101: 63-68.
13. Şenel F. Klonlamada yeni ufuklar: Kök hücreler. *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi* 2002; (410): 44.
14. Cheng XY, O'Neill HC. Oncogenesis and cancer stem cells: Current opinions and future directions. *J Cell Mol Med* 2009; 16.
15. Ward RJ, Dirks PB. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol* 2007; 2: 175-189.
16. Szakács G, Jakab K, Antal F, Sarkadi B. Diagnostics of multidrug resistance in cancer. *Pathol Oncol Res* 1998; 4: 251-257.
17. Licht T, Fiebig HH, Bross KJ, Herrmann F, Berger DP, Shoemaker R, Mertelsmann R. Induction of multiple-drug resistance during anti-neoplastic chemotherapy in vitro. *Int J Cancer* 1991; 49: 630-637
18. BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003; 22: 6598-6608.
19. Singh SR, Hou SX. Multipotent stem cells in the Malpighian tubules of adult *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 2009; 212: 413-23.
20. Koch U, Radtke F. Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2746-2762.
21. Bolós V, Blanco M, Medina V, Aparicio G, Dfáz-Prado S, Grande E. Notch signalling in cancer stem cells. *Clin Transl Oncol* 2009; 11: 11-9.
22. Akbulut H, Akbulut KG. Karsinogenez In: Içli F, ed. *Tıbbi Onkoloji*. Ankara: ANTIP Afi Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar; 1997. p. 23-38.
23. Lecture GFF. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest* 1996; 109: 14-19.