Marmara Fen Bilimleri Dergisi 2018, 1 94-104
DOI: 10.7240/marufbd.336015

REVIEW / DERLEME

Meme Kanser Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolağının İnhibisyonunda Güncel Yaklaşımlar

Recent Applications in Inhibition of Notch Signalling Pathway on Breast Cancer Stem Cell

Selcen ARI[1]

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kestel, Alanya/ Antalya.

Öz

Dünyada kadınlarda kanser sebepli ölümlerde meme kanseri en üst sıralarda yer almaktadır. Kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi gibi yöntemler meme kanserinin tedavisi için kullanılmasına rağmen metastaz ve nüks sıkça karşılaşılan durumlardır. Meme kanseri tedavisinin etkin olarak sağlanamamasında en çarpıcı etken tümör dokusundaki ufak bir popülasyonu oluşturan kanser kök hücreleridir. Meme kanser kök hücrelerinin eliminasyonu konusundaki çalışmalar kök hücre özelliklerinin ortaya çıkmasında kritik rol oynayan gelişimsel sinyal yolakları üzerinde etkili olabilecek yaklaşımları içermektedir. Gelişimsel sinyal yolaklarından en önemlilerinden biri olan Notch sinyal yolağı meme kanser kök hücrelerinde apoptoz, proliferasyon, anjiyogenez ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde oldukça etkilidir. Güncel çalışmalar kanser kök hücrelerinin karakteristiğinde kritik rol oynayan Notch sinyal yolağının inhibisyonunun etkili tedavi yaklaşımları için önemli olduğunu göstermektedir. Bu derlemede meme kanserinin tedavisinde Notch sinyal yolağının inhibisyonu için getirilmiş farklı yaklaşımlar ele alınacak ve gelecekte etkin kanser tedavisinin geliştirilmesinde faydalı olabilecek yöntemler tartışılacaktır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, Notch, Kanser kök hücre.

Abstract

In the world, breast cancer is at the top of the list in deaths due to cancer in women. Although treatments such as chemotherapy, radiotherapy, hormonal therapy are used for the treatment of breast cancer, metastasis and recurrence are frequent cases. The most striking factor in the inability to effectively breast cancer treatment is cancer stem cells, which form a small population of tumor tissue. Studies on the elimination of breast cancer stem cells involve approaches that may be effective on developmental signaling pathways that play a critical role in the forming of stem cell characteristics. One of the most important developmental signaling pathways, the Notch signaling pathway is highly effective on apoptosis, proliferation, angiogenesis and differentiation mechanisms in breast cancer stem cells. Recent studies indicate that inhibition of the Notch signaling pathway, which plays a critical role in the characterization of cancer stem cells, is important for effective treatment approaches. In this review, different approaches will be discussed for inhibition of Notch signalling pathway in breast cancer treatment and methods that may be useful for efficient cancer treatment.

Keywords: Breast cancer, Notch, Cancer stem cell.

I. GİRİŞ

Meme kanserinin kadınlarda görülme oranı yaklaşık %29' dur ve en çok tanı koyulan kanser türü olmakla birlikte kanser sebepli ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır [1]. Meme kanseri tedavisi için son yıllarda farklı yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen etkin tedavi hala geliştirilememiştir. Günümüz tedavilerinin yeterli etkinlikte sağlanamamasının ana sebeplerinden biri olarak *Meme Kanser Kök Hücreleri* (MKKH) gösterilmektedir. İlk olarak Al-Hajj ve arkadaşlarının NOD/SCID (Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) dişi fareleri kullanarak katı tümörde yaptıkları çalışmalar ile meme kanser kök hücresi tanımlanmış [2], meme kanseri kök hücresinin biyolojisi ve tedavideki yeri konusunda çalışmalar başlamıştır. Al-Hajj ve arkadaşları heterojen yapıdaki meme tümör dokusunda

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Selcen ARI, Tel: 02425106120, e-posta: selcen.ari@alanya.edu.tr
Gönderilme/Submitted: 24.08.2017, **Düzenleme/Revised:** 26.03.2018, **Kabul/Accepted:** 30.03.2018.

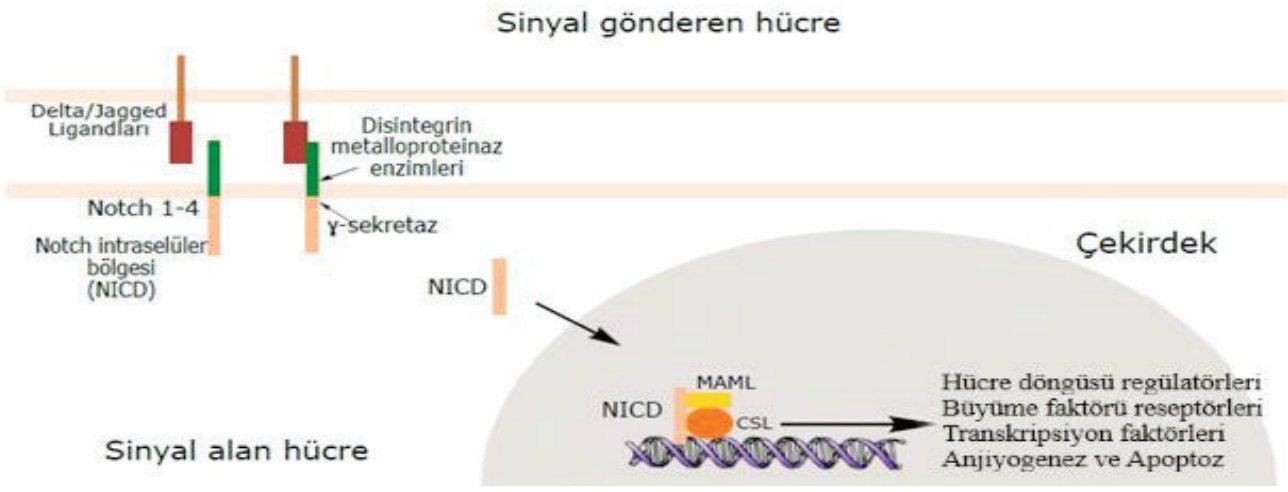
çok küçük bir popülasyonu oluşturan CD44+CD24-/düşük fenotipteki hücrelerin farklı fenotip sergileyen hücrelere göre daha tümörogenik olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak MKKH'lerin normal kök hücreler ile farklılaşma ve kendini yenileme özelliklerini de paylaştığını belirtmişlerdir. Sonraki çalışmalarda MKKH'lerin kemoterapötik ilaçların metabolize edilmesinde etkili olan Aldehitdehidrojenaz (ALDH) enzim ifadesi veya Epitelyal Yüzey Antijeni (ESA) ifadesi de yapabilecekleri gösterilmiştir [3-6]. Tümör içerisindeki çok az sayıdaki kanser kök hücrelerinin tümör oluşumu [7], ilerlemesi, invazyonu ve metastazında önemli olduğu görülmüştür. Meme kanseri kök hücrelerinin spesifik yüzey ifadeleri sadece belirteç görevi görmekle kalmayıp; bununla birlikte tümör oluşumundan metastaza kadar tüm fonksiyonlarda da görev alabilmektedir. MKKH'lerin bu fonksiyonları gerçekleştirmesinde sinyal yolaklarının kendine has düzenlenmesi de kritik rol oynamaktadır. MKKH'lerde Notch, Hedgehog ve Wnt gelişimsel sinyal yolakların bir veya birkaçının anormal düzenlenmesi diğer sinyal yolaklarının da anormalliğine sebep olarak farklı fizyolojik sonuçlara yol açmaktadır [8]. MKKH'lerin sistemik tedavinin etkinliğini düşürmesi sebebiyle güncel çalışmalar bu sinyal yolaklarını hedefleyebilecek özellikte yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine odaklanmış haldedir.

MKKH'lerin fizyolojik aktivitelerinin düzenlenmesinde etkili olan gelişimsel sinyal yolakları Notch, Hedgehog ve Wnt'dir [9]. Doku onarımı ve embriyo doku modellemesinde önemli rolü olan Hedgehog (HH) sinyal yolağı kanser kök hücreleri için de kritik görevlere sahiptir. Sinyal yolağının transmembran reseptörü Patched1'in (PTCH) Smoothened (SMO) üzerindeki inhibe edici etkinliği HH ligandlarının bağlanması sonucunda baskılanmaktadır [10]. SMO'nun aktifleşmesi sonucunda kaskat başlar ve GLI transkripsiyon faktörünün nükleer yerleşimi ve aktivasyonu sonucunda sağ kalım, proliferasyon ve anjiyogenezde görev alan hedef genlerin ifadeleri gerçekleştirilir [8]. Wnt sinyal yolağında Frizzled reseptörüne Wnt'nin bağlanmasıyla β-katenin'in bozunması inhibe edilir ve hücre nükleusunda birikmesi sonucunda hedef genlerin ifadesi sağlanmaktadır [11]. Wnt hedef genlerinin ifadesi sonucunda kendini yenileme, epitelyal-mezenkimale dönüşüm (EMT) ve kanser kök hücresi fenotipinin ifadesi gerçekleşmektedir [12]. Notch ise fazla sayıda ligand ve reseptör alt birimini içeren kök hücre karakterinin ortaya çıkmasında kritik rolü olan karmaşık bir sinyal yolağıdır [13].

Kanserde gelişimsel sinyal yolaklarının hücredeki fonksiyonları ve çapraz etkileşimleri pek çok çalışmada ele alınmıştır. Günümüze kadar ağırlıklı olarak klinik çalışmaların sonuçlarının derlemesini, bir kanser türündeki sinyal yolaklarının etkileşimini veya bir hücresel fonksiyon için sinyal yolaklarının görevlerini içeren çalışmalar gerçekleştirilmiştir [8, 14-17]. Notch sinyal yolağı doku spesifik olarak hücrede kritik süreçlere yön vermesinden dolayı önem taşımaktadır [18]. Özellikle diğer gelişimsel sinyal yolaklarından farklı olarak Notch hücreler arasında doğrudan etkileşim yoluyla sinyalizasyon gerçekleştirdiği, kompleks bir yapıya sahip olması sebebiyle doku spesifik olarak fonksiyonu değişebildiği için kritiktir [18, 19]. Notch sinyal yolağının artmış aktivitesinin meme kanserinde kanser kök hücre fenotipinin sergilenmesinde ve küresel yapının oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir [20]. Bununla birlikte spesifik meme kanseri tiplerinde Notch sinyal yolağının aktivitesi veya önemi farklı çalışmalarda belirtilmiştir [21-23]. Demans hastalıkları için üretilmiş ancak kanser türlerinde Notch sinyal yolağı aracılı etkili olabileceği düşünülen, spesifik Notch inhibitörü gruplarının genel klinik çalışmalarının ele alındığı kaynaklar da mevcuttur [24]. Bu derlemeyle ise MKKH anormal işleyişinde kritik rol oynayan Notch sinyal yolağının hedeflenmesi ve inhibisyonu ile ilgili günümüze kadar olan farklı yaklaşımları içeren çalışmalar ele alınacaktır.

II. NOTCH SİNYAL YOLAĞININ FİZYOLOJİK AKTİVİTESİ

İnsan ve fare embriyonik kök hücrelerinde Notch sinyallerin sonuçları hücrelerin akıbetinin ne olacağının belirlenmesinde [25], proliferasyon, farklılaşma ve apoptozun dengesinde kritiktir [26-28]. Hücre-hücre etkileşimlerinde önemli olan bu yolak aynı zamanda anjiyogenez [29], kanser kök hücre [30], kemoterapötik ilaç dirençliliği ve tümör immünitesi için de önemlidir [12]. Transmembran protein yapıdaki Notch (Notch 1-4) reseptörleri, Delta-benzeri (DLL1,3,4) ve Jagged (Jagged 1,2) ligandları, Notch sinyal yolağının ana bileşenlerini oluşturmaktadır [23]. Endoplazmik retikulum ve golgi tarafından işlenmiş olan reseptör plazma membranına translokasyona uğramakta ve sinyali oluşturan hücrenin membranında konumlanmış aktifleşmiş olan Delta-benzeri ve Jagged ligandları ile bağlanmaktadır [9]. Ligand reseptör arasındaki bu etkileşim reseptörün iki basamaklı proteolitik yıkımına sebep olmaktadır [12]. Birinci yıkım disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM10, ADAM17 veya TACE) enzimleri tarafından hücre dışında yürütülürken [31]; sonraki basamak ilk aşamada gerçekleşen yıkım ürününün ɣ-sekretaz ile hücre içinde bir yıkıma daha uğratılmasını içerir [21]. Proteolitik yıkım sürecinden sonra ise Notch hücre içi bölgesi (NICD) hücre nükleusuna geçer ve hedef gen bölgelerinin ifadesini sağlayan DNA'ya bağlı CSL (CBF1/Su(H)/LAG-1) [32] proteini ve Mastermind benzeri (MAML) proteiniyle etkileşimi gerçekleştirir [12, 17]. Sinyallerin transkripsiyonel hedefleri hücre döngüsü regülatörleri, büyüme faktörleri reseptörleri, transkripsiyon faktörleri ve anjiyogenez ve apoptoz düzenleyicileridir[26] (Şekil1).



Şekil1: Kanser kök hücrelerinde anormal düzenlenmiş Notch sinyal yolağının aktivitesi.

Tümörogenezde önemli role sahip olan Notch sinyal yolağının herhangi bir bileşenindeki anormal düzenlenmeler katı tümörlerde sıkça karşılaşılan bir durumdur [21]. Notch reseptör ve ligandlarının translasyon sonrası modifikasyonları ile yarı ömürleri ve ligand afiniteleri değişmektedir [32]. Örneğin, Notch3'te 34 ve Notch4'te 29 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) tekrarı bulunması, reseptörlerin ligandlara olan afinitelerine etki etmektedir [33]. Notch reseptörünün golgi içerisinde glikozilasyonunun da Delta veya Jagged ligandlarıyla bağlanmasına etki ettiği belirtilmiştir. Öyle ki FRINGE tarafından golgi içerisinde yürütülen glikozilasyon işlemi Notch reseptörünün Delta ligandına cevabını arttırırken, Jagged indüklenmiş sinyalleri negatif etkilemektedir [32]. Meme kanser hücrelerinde Notch sinyal yolağı alt birimlerinin hangilerinin kök hücre karakteristiğine etki ettiği hala tartışmalı bir konu olup günümüze kadar farklı sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanser kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda Notch4 reseptör anormal aktivitesinin tümör başlamasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir [34]. Ancak Östrojen Reseptör Pozitif (ER+) [35] ve üçlü negatif meme kanser (TNBC) hücrelerinde [36] Notch1 sinyal yolağının anormal düzenlendiği görülmüştür. Buna benzer olarak Notch1 aşırı ifadesinin zayıf derece farklılaşmış meme tümörünün klinikopatolojik özellikleriyle örtüştüğü de bildirilmiştir [37].

İnsan meme kanser kök hücrelerinde, Notch sinyallerinin tümörogeneze ve tedaviye yanıtsızlığa olan katkısında diğer sinyal yolaklarıyla etkileşimleri de önemlidir. Notch sinyallerinin NF-κB (Nuclear factor-kappa B) sinyallerini aktive etmesi veya TGFβ (Transforming growth factor beta) sinyallerini düzenlemesiyle metastazın en önemli basamağı olan EMT gerçekleştirilmektedir [38]. Meme kanser hücrelerinin kemik metastazında kemik hücreleri kaynaklı TGFβ sitokini ve Jagged-1 ligandının etkileşimiyle, kemik hücrelerinde aktifleştirilen Notch sinyallerinin önemli rolü olduğu görülmüştür [39]. γ-sekretaz inhibitörü PF-03084014'ün Notch sinyal yolağını inhibe ettiği gibi translasyon sonrası aktif β-katenin miktarının azaltılması yoluyla Wnt sinyal yolağını da inhibe ettiği bilinmektedir [40]. Bununla birlikte histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve tümör oluşumunda önemli olan Mel-18'in Wnt sinyal yolağını negatif düzenleme yoluyla Jagged-1 aracılı Notch inhibisyonunu desteklediği de gösterilmiştir [41]. Östrojen reseptör pozitif meme kanser türlerinde çoğunlukla hormonal tedavi yöntemleri seçilse de, antiöstrojenlere olan direnç sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Direnç gelişiminde Notch sinyallerinin östrojen yokluğunda aktifleşerek östrojen reseptör α bağımlı transkripsiyonunu tetiklemesi ve antiöstrojen etkinliğinde inhibitör etki göstermesinin etkili olduğu düşünülmektedir [21].

III. NOTCH'U HEDEFLEMEK AMACIYLA GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

Notch sinyallerinin kanser kök hücrelerindeki anormal fonksiyonlarının inhibisyonu için günümüze kadar pek çok yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar temel olarak sinyal yolağının işleyişinin herhangi bir basamağında etkili olarak hedef ifadelerin gerçekleşmesini engelleyici yöndedir. Notch sinyallerinin inhibisyonu için yaklaşımlar; inhibitörler, doğal ajanlar, nükleik asitler, antikorlar ve nanotaşıyıcılar olarak gruplandırılabilir (Tablo1).

Tablo 1: Meme kanserinde Notch sinyal yolağının inhibisyonu için gerçekleştirilen çalışmalar

Türü	Ajan	Mekanizma	Kapsam	Referans
İnhibitör	DAPT	Notch4 ve DLL3 inhibisyonu aracılı anjiyogenez baskılanması	*In vivo*	[47]
	LY900009	γ – sekretaz inhibisyonu	Faz I	[50]
	PF03084014	γ – sekretaz inhibisyonu	Faz I	[51]
	MK-0752	γ – sekretaz inhibisyonu	*İn vivo,* Faz I-II	[52]
	R04929097	γ – sekretaz inhibisyonu	*In vitro*	[53]
Antikor	Enoticumab	DLL4 monoklonal antikor	Faz I	[59]
	MMGZ01	DLL4 monoklonal antikor	*In vivo*	[60]
Nükleik asitler	miR-200	Jagged-1 aracılı Notch inhibisyonu	*In vitro*	[67]
	miR-34a	Notch1 geni baskılanması	*In vitro*	[68, 69]
Doğal ajanlar	Vitamin D türevleri	Notch1,2,3 inhibisyonu	*In vitro*	[74]
	Kapsaisin	NICD translokasyonunun engellenmesi	*In vitro*	[75]
	Luteolin	Notch sinyal yolağıyla ilgili protein ve miRNA'ların inhibisyonu	*In vitro, In vivo*	[76]
	Xanthohumol	Notch1 ve Hes1 ifadesinin azaltılması	*In vitro, In vivo*	[77]
	Oridonin	Notch 1-4 protein ifadesinin azaltılması	*In vitro,In vivo*	[79]
	Paeoniflorin	Notch1 ve Hes1 ifadesinde azalma	*In vitro*	[80]
Nanotaşıyıcılar	Mezoporlu silika nanopartikül	γ – sekretaz inhibitörü DAPT ile Notch inhibisyonu, folik asit ile kanser hücre hedeflemesi	*In vivo*	[83,84]
	Katyonik mezoporlu silika nanopartikül	γ – sekretaz inhibitörü DAPT ile Notch inhibisyonu, glikoz ile kanser hücre hedeflemesi	*In vitro, In vivo*	[85]
	Manyetik çok fonksiyonlu nanopartikül	shRNA ile Notch inhibisyonu ve folik asit ile kanser hücre hedeflemesi	*In vitro*	[86]

3.1. İnhibitörler

Notch sinyal yolaklarının inhibisyonu amacıyla çalışılan ilk inhibitörler γ-sekretaz inhibitörleri (GSI) olup, mekanizmaları Notch reseptörlerinin son basamaktaki proteolitik yıkımlarının engellenmesi temeline dayanmaktadır [17, 21]. γ-sekretaz inhibitörleri esasında alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan etken maddelerdir [42]. GSI'lar proteozom aktivitesinin inhibe edilmesi ve endoplazmik retikulum stresinin arttırılması yoluyla tümör hücrelerini apoptoza götürmektedir [43]. GSI'lar meme kanseri fare modellerinde, kanser kök hücrelerinin proliferasyon inhibisyonunu, apoptoz ve farklılaşma indüklenmesini sağlamaktadır [44]. Kemoterapötiklerin kanser hücrelerinde ilaç direnç gelişimine ve kanser kök hücre fenotipinin ortaya çıkmasına sebep olduğunu gösteren güncel bir çalışmada GSI inhibitörü DAPT (N-[N-(3,5difluorofenasetil) – L-alanil] – S-fenilglisin t-bütil ester)'nin Notch4 ve DLL3 inhibisyonuyla metastaz için önemli olan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün (VEGF) [45] aracılığıyla tümör anjiyogenezini azalttığı gösterilmiştir [46]. Östrojen reseptör, Progesteron reseptör ve HER2 ifadesi göstermeyen zayıf prognozla karakterize TNBC türünün kök hücre benzeri kanser hücrelerini içerdiği bilinmektedir [47, 48]. GSI LY900009'un ileri düzey meme kanseri hastalarında gerçekleştirilen klinik çalışmasında antikanserojen etkinlik beklenilen düzeyde sağlanamamış, özellikle gastrointestinal sistemde yan etkileri gözlenmiştir [49]. Locatelli ve arkadaşlarının klinik faz 1 çalışmasında PF-03084014 GSI ve Docetaxel'in kombineli kullanımında inhibitörün kemoterapötik ilacın farmakokinetiği üzerinde negatif etkisinin olmadığı bildirilmiştir [50]. Buna benzer şekilde MKKH yönlü tedavi için GSI MK-0752'nin etkinliğinin preklinik ve klinik olarak incelenmesiyle kemoterapötik ilaçların etkinliğinin arttırıldığı bildirilmiştir [51]. Diğer bir GSI olan R04929097'nin kanser kök hücre fenotipindeki inflamatuar meme kanser hücrelerinin büyümesinde bir miktar etki ettiği ve bir antikanserojen ajanla daha etkili bir sonuç alınabileceği belirtilmiştir [52]. Ancak lokal ileri ve metastatik özellikteki TNBC hastalarında nötropeni, bulantı, lökopeni, anemi gibi yan etkiler görülmüş ve etkin bir antikanserojen etki sağlanmamıştır [50]. Diğer yandan γ-sekretazların normal doku hücrelerinde önemli fizyolojik işlevlere sahip olması [32], bu inhibitörlerin γ-sekretaz dışındaki proteazlar üzerinde de etkili olabilmesi ve bununla birlikte γ-sekretazların Notch sinyali dışındaki ErbB4, sindekan ve

CD44 gibi önemli substratlarının bulunması [53], umut vaat edici olan GSI'ların klinik uygulamalarının oldukça zor olduğunu göstermektedir [54].

3.2. Antikorlar

Notch reseptör ve ligand alt birimlerinin hedeflenmesi ve inhibisyonu amacıyla yüksek spesifiteye sahip antikorların üretilmesi mümkündür. Antikorların yüksek spesifite ve afiniteye sahip olması, kullanım uygunluğu açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Notch inhibitörlerinin intestinal sistemdeki yan etkinlerinin giderilmesi için yalnızca Notch1 sinyallerinin düzenlenmesine yönelik antikor kullanımına dair yaklaşımlar mevcuttur [55]. Notch sinyal yollarındaki EGF tekrarlarını spesifik şekilde tanıyarak ligand bağlamasını engelleyen monoklonal antikor yaklaşımları bulunmaktadır. Sharma ve arkadaşlarının çalışmasında 11 ve 12. EGF tekrarlarına spesifik monoklonal antikorların Notch-1 reseptör aktivasyonunu iyi şekilde inhibe ettiği, kök hücre karakteristiğini belirleyen genlerin ifadesini ve EMT'yi etkilediği görülmüştür [56].

Vücut normal vaskülerizasyonuna etkide bulunmadan tümör anjiyogenezi üzerinde etki edilmesi yoluyla DLL4 antikorları da tümör büyümesini negatif etkilemektedir [57]. DLL4 antikorlarının katı tümörlerde etkinliğinin ortaya çıkarılması için yalnızca Enoticumab ile gerçekleştirilen faz-1 klinik çalışmasında GSI'lara göre intestinal sistemde daha az yan etki oluşturduğu gösterilmiştir [58]. Notch sinyal yolağının inhibisyonuna dair en dikkat çekici yaklaşımlardan olan antikorların kemoterapötik ilaçlarla kullanımı sayesinde etkin tedavinin gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir. Notch sinyal yolağının üyesi DLL4 üzerinde etkili olabilecek monoklonal antikor üretilmiş, kemoterapötiklerle kombinasyonunda MKKH popülasyonunda ve kanser hücresi proliferasyonunda azalma görülmüştür [59]. DLL4 antikorlarının katı tümörlerdeki etkinliğine dair çalışmalar devam etmektedir (NCT sayısı: NCT03292783, NCT01577745). Ancak antikorların büyük moleküler yapılarda olması Notch inhibisyonunda kullanılmasında en önemli kısıtlamadır. Bu büyük moleküllerin lokal seviyede kolayca dağılımı gerçekleştirilebilirken, kanser kök hücrelerinin rol oynadığı metastatik kanser türlerinde geniş alanda etkili olabilmeleri için etkin antikor dağılımı sağlanmalıdır [60].

3.3. Nükleik Asitler

Meme kanser kök hücrelerinde Notch sinyal yolaklarının inhibisyonu amacıyla Notch anormal fonksiyonunu hücresel ifadelere etki yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilecek nükleik asit yaklaşımları mevcuttur. Kanser kök hücre fenotipinin ortaya çıkmasına neden olabilen gen bölgelerinin Notch sinyal yolağıyla ilişkisini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. DNA hasar onarımı, kromatin yeniden modellemesi ve hücre döngüsü kontrol noktası denetimi gibi pek çok önemli fonksiyonda görev alan BRCA-1'de meydana gelen mutasyonlar sonucunda kök hücre aktivitesinde artış görülmektedir [61]. BRCA-1'in Notch sinyallerinin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla Notch ve Jagged-1 üzerinde etkili olduğu, meme kanser hücrelerinin akıbetinin belirlenmesinde önemli olabileceği bulunmuştur [62]. BRCA-1 genini hedefleyerek düzenlenmesini sağlayan miR-182, miR-146 gibi farklı mikroRNA (miRNA) türleri mevcuttur [63]. Moskwa ve arkadaşları tarafından meme kanser hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada miR-182'nin, BRCA-1'i hedefleyebileceği ve baskılayıcı etkinliği sonucunda DNA onarımını engelleyerek radyasyon tedavisini olumlu yönde etkilediği *in vitro* ve *in vivo* gösterilmiştir [64]. Bununla birlikte, tümör baskılayıcı veya tam tersine onkogenik özellikte olan miRNA'ların, Notch sinyal yolağıyla doğrudan ilişkili olduğu da bildirilmiştir [65]. miR-200 ailesinin meme kanser hücrelerinde Notch sinyallerini inhibe ettiği ve kök hücre karakterini kazandırdığı belirtilen çalışmada miR-200 ile transfekte edilen hücrelerde Jagged-1 ligand aracılı Notch sinyal inhibisyonu gerçekleştirilmiştir [66]. Öte yandan Notch1 geninin 3' UTR ucuyla doğrudan olarak etkileşimde olan miR-34a'nın, ilaç dirençli meme kanser hücrelerinde Notch inhibisyonu için önemli bir hedef olabileceği sonucuna ulaşılmıştır [67]. Kang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışma ile ise Paclitaxel ile miR-34a tedavisi uygulanan meme kanser hücrelerinde kök hücre benzeri fenotipin azaldığı ve ilaca duyarlılığın arttığı belirtilmiştir [68]. miRNA'ların hücresel veya serum nükleazları tarafından bozunması, negatif yüklü olması ve boyutları sebebiyle hücre membranından geçememesi kanser tedavisinde kullanımında ortaya çıkan temel zorluklardır [69]. Bu zorlukların giderilmesi için güncel çalışmalar miRNA'ların modifikasyonu ve taşınması yönündedir.

3.4. Doğal Ajanlar

Kanser kök hücrelerinin eliminasyonunun sağlanması sırasında sağlıklı dokularda meydana gelebilecek toksik etkilerin tedavi açısından dezavantajının ortadan kaldırılması için doğal bileşiklerin kullanımına dair çalışmalar da mevcuttur. *Psoralea Corylifolia* (Babchi) iç çekirdeğinden elde edilen Psoralidin, EMT Notch1 sinyalleri üzerinde γ – sekretaz inhibitörü vazifesi gördüğü, meme kanser ve kanser kök hücreleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [70, 71]. D vitamini türevi BXL0124'ün, kanser kök hücre fenotipindeki meme kanser hücrelerin Notch Ligandları üzerinde

inhibitör etki oluşturduğu gösterilmiştir [72]. TNBC hücrelerinin (SUM159) Notch reseptörlerinin vitamin D türevleri ile inhibe edilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmada Notch1,2,3 ifadesinin yanı sıra pluripotensi belirteci OCT4'ün ve kök hücre sinyal düzenlemesinin ana elemanlarından olan NF-κB1'in de dikkate değer şekilde inhibe edildiği belirtilmiştir [73]. Bununla birlikte, tümör invazyon ve metastazında kritik bir süreç olan EMT için meme kanser hücrelerince ifade edilen sitokeratin 5 ve 18 seviyesinin de vitamin D türevi ile düşürüldüğü gösterilmiştir. Shim ve arkadaşları MKKH fenotipi sergileyen MCF7 hücreleri üzerinde kırmızı biberden elde edilmiş Kapsaisin ($C_{18}H_{27}NO_3$) molekülünü uyguladığında, NICD'nin nükleusa translokasyonunun gerçekleşmediğini ve kanser kök hücre sayısının belirgin düzeyde azaldığını göstermiştir [74]. Diğer yandan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda toksik olmayan flavonoid bileşiklerinden Luteolin'in Notch sinyal yolağının ve miR-34a'nın ifadesini değiştirerek meme kanserinde invazyon, göç ve vaskülerizasyon üzerinde negatif etkili olduğu saptanmıştır [75]. Sun ve arkadaşları ise *Humulus Lupulus'*tan elde edilmiş bir flavonoid olan Xanthohumol'ün Notch1 aracılı olarak meme kanser hücrelerinin sağ kalımını inhibe ettiğini göstermiştir [76]. Bunların dışında curcumin, delphinidin, likopen, withaferin A, oridonin, paeoniflorin gibi diğer doğal bileşiklerin de meme kanser kök hücreleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [77-79]. En ilgi çekici tedavi yaklaşımlarından olan doğal bileşikler etkinlik açısından umut vaat edicidir. Uzun süreli kullanımı ve klinik uygulaması konusunda çalışmaların gerçekleştirilmesiyle faydalı yaklaşımların getirilebileceği düşünülmektedir.

3.5. Nanotaşıyıcılar

Notch sinyal yolağının diğer dokularda da normal düzenlenmiş olması halinde pek çok düzenleyici fonksiyonunun olması, bu sinyal yolaklarının spesifik olarak kanser ve kanser kök hücrelerinde hedeflenmesini gerekli kılmıştır. Tümör doku ve hücrelerinin sağlıklı dokulardan farklı özelliklerinin seçimini sağlayan nanotaşıyıcı sistemler, Notch inhibitörlerinin hedef bölgeye taşınmasında da kullanılmıştır. Kanser hücreleri metabolizmalarında folik asite ihtiyaç duydukları için folik asit reseptör ifadesi oldukça fazladır [80, 81]. Bu yönde folik asit ile modifiye edilmiş DAPT γ-sekretaz inhibitörü yüklenmiş mezoporlu silika nanopartiküllerinin folik asit reseptörü ifadesi gösteren meme kanser hücrelerinde *in vivo* terapötik etkinliği iyileştirdiği gösterilmiştir [82, 83]. Tümör hücrelerinin yüksek glikoz ihtiyacının hedeflendiği, Mamaeva ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada glikozla yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş katyonik mezoporlu silika nanopartiküllerine γ-sekretaz inhibitörü DAPT yüklenip kanser ve kanser kök hücreleri üzerinde etkinliği incelendiğinde MKKH'ler tarafından kolayca içselleştirildiği ve inhibitör etki oluşturduğu, tümör büyümesini ise negatif yönde etkilediği görülmüştür [84].

Nanotaşıyıcılar Notch sinyalizasyonunun inhibisyonunda, nükleik asitlerin taşınması amacıyla da kullanılmaktadır. Kanser gen tedavisi konusunda viral yaklaşımlar olmasına rağmen viral kökenli uygulamaların immünojen özellikte olması, transfeksiyon etkinliğinin düşük olması gibi sebeplerle istenilen sonuçlar elde edilememiştir. Bunun sonucu olarak formülasyon optimizasyonu, ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması ve immünojenite göstermemesi gibi avantajlara sahip olmaları sebebiyle nanotaşıyıcılar gen taşınması ve hedeflenmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Yang ve arkadaşları Notch-1 shRNA'nın (small hairpin RNA) folik asit ile hedefleme yapan manyetik çok fonksiyonlu nanopartiküllerle taşınması sonucunda folat reseptörü ifade eden hücreler tarafından hücresel alımının arttırıldığını, Notch sinyallerinin etkili bir şekilde inhibe edildiğini ve proliferasyonun baskılandığını belirtmiştir [85]. Nanotaşıyıcıların kanser tedavisinde kemoterapötikler ile kullanımı mevcut klinik uygulamalarda karşımıza çıkmaktadır. Ancak kanser kök hücreleri ve özellikle Notch gibi sinyal yolaklarını inhibe edici nitelikte sistemler *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar şeklinde yürütülmektedir.

IV. SONUÇ

Meme kanserinde metastaz ve nüks gibi durumların sebebi olarak gösterilen kanser kök hücrelerinin biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, gelişimsel sinyal yolaklarının tedavi için hedef olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu yönde Notch sinyal yolağının hedeflenmesi; kanser kök hücrelerinin eliminasyonu, tümör ilerlemesinin inhibisyonu, anjiyogenez ve metastazın engellenmesi için büyük önem taşımaktadır. Notch anormal düzenlenmesinin inhibisyonu, ancak karmaşık düzendeki sinyal yolağının alt birimlerinde veya spesifik bölgelerinde etkinlik sağlanması ile mümkündür. Sinyal yolağının inhibisyonu için günümüze kadar geliştirilen yaklaşımlar; inhibitörler, antikorlar, doğal bileşikler, nükleik asitler ve nanotaşıyıcılar olarak gruplandırılabilmektedir. Notch sinyal inhibitörlerinin ilk jenerasyonu, genellikle alzheimer için kullanılan moleküller olan γ-sekretaz inhibitörleridir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda etkili sonuçlar vermekle birlikte klinik olarak intestinal yan etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bununla birlikte bir antikanserojen ajanla kullanımının etkili proliferasyon inhibisyonu sağlayacağı düşünülmektedir. Notch sinyal yolağının spesifik bölgelerini hedef alan antikor yaklaşımları, γ-sekretaz inhibitörlerinde olduğu gibi, alzheimer

benzeri hastalıkların tedavisi için geliştirilmiştir. Bu antikorlar Notch sinyal yolağının meme kanserinde önemli olduğunun saptanmasıyla klinik ve klinik öncesi araştırmalarda çalışılmıştır. Ancak, meme kanser hücrelerinde hangi Notch alt birimlerinin veya alt birimlerin hangi spesifik bölgelerinin anormal düzenlendiği açık olarak hala belirlenememiştir. Notch sinyal yolağı aktivitesinin canlı vücudunun farklı bölgelerinde fonksiyon gösterdiği düşünüldüğünde, antikorların kanser hücresinde tam olarak tanımlanmış olan Notch kompleks sisteminde daha faydalı olabileceği düşünülmektedir. Doğal bileşikler Notch sinyal yolağını nasıl düzenlediği ve klinik etkinliğinin nasıl gerçekleştiği incelenmesi gereken terapötiklerdir. Notch sinyal yolağının doku spesifik olarak fonksiyonunun değişebildiği düşünüldüğünde inhibitör özellikteki moleküllerin, inhibitörlerin veya antikorların kullanımı konusunda soru işaretlerine sebep olmaktadır. Kanser kök hücre temelli çalışmalarda son zamanlarda oldukça dikkat çeken bir yaklaşım olan nanotaşıyıcılar diğer ajanların taşınması ve doğru lokasyona iletilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Nanotaşıyıcı sistemlerin kontrollü olarak ajanların salımını sağlayabilmesi, sentez aşamasında belli parametrelerle ayarlanabilir özelliklerinin olması kanser tedavisi için faydalı olabileceğini göstermektedir.

Notch inhibisyonu için yaklaşımlar incelendiğinde bu ajanların doğrudan tedavi edici etkinlik sağlamadığı, ancak antikanserojenlerle kullanımıyla daha etkili sonuçlar verdiği görülmektedir. Meme kanser kök hücrelerinin heterojen bir tümör dokusu içerisinde bulunduğu ve niş kaynaklı mikroçevreyle farklı etkileşimler gerçekleştirdiği düşünüldüğünde bir etkili bir tedavinin gerçekleştirilmesinin zor olduğu açıktır. Öyle ki günümüz çalışmaları göz önünde bulundurulursa spesifik olarak tümör dokusunu hedefleyen akıllı taşıyıcı sistemler, antikanserojenlerin ve Notch inhibisyonunu sağlayan ajanların birlikte kullanılması daha etkili bir tedavinin gerçekleştirilmesini sağlayabilir. Bu şekilde gerçekleştirilecek yeni yaklaşımlarla antikanserojenlerin ve Notch inhibisyon ajanlarının istenmeyen yan etkilerinin de önüne geçilebilir.

Notch sinyal yolağının tümör gelişimi, invazyonu, metastazında önemli olan diğer sinyal yolaklarıyla etkileşimi negatif sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir. Ancak Notch sinyal yolağı, Wnt ve Hedgehog sinyal yolağından farklı olarak, hücre-hücre etkileşimlerini doğrudan ligand-reseptör bağlantısıyla sağladığı için daha etkili bir hedef olarak gösterilebilir. Aynı zamanda kompleks yapısından dolayı dokuda sinyal yolağının reseptör ve ligand alt birimlerinden hangilerinin etkileşeceği inhibisyonunun nasıl gerçekleşeceğinin belirlenmesinde kritiktir. Sinyal yolağının alt birimler halinde olması tedavinin spesifikleşmesini sağlarken, sadece etkileşimde olan belirli bir kanser ve kanser kök hücre topluluğu hedeflenerek tedavinin etkinliğini arttırabilir. Sonuç olarak Meme kanserinin Notch inhibisyonu hedefli tedavisinin bütün bu etkenler göz önüne alınarak şimdiye kadar yapılan çalışmaların sonuçları ışığında gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] American Cancer Society. (2016). Cancer Facts & Figures. Retrieved from https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2016.html

[2] Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A, 100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100

[3] Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D.,. Wicha, M. S. (2009). Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature. *Cancer Res, 69*(4), 1302.

[4] Croker, A. K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B. D., Hess, D. A., & Allan, A. L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med, 13*(8b), 2236-2252. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x

[5] Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res, 10*(2), R25-R25. doi:10.1186/bcr1982

[6] McCubrey, J. A., Davis, N. M., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., Libra, M., Nicoletti, F., D'Assoro, A.B., Cocco, L., Martelli, A.M., Steelman, L. S. (2014). Targeting breast cancer initiating cells: advances in breast cancer research and therapy. *Adv Biol Regul, 56*, 81-107. doi:10.1016/j.jbior.2014.05.003

[7] Wang, R., Lv, Q., Meng, W., Tan, Q., Zhang, S., Mo, X., & Yang, X. (2014). Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis, 6*(6), 829-837. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38

[8] Takebe, N., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2011). Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res, 13*(3), 211. doi:10.1186/bcr2876

[9] Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol, 44*(12), 2144-2151. doi:10.1016/j.biocel.2012.08.022

[10] Dragu, D. L., Necula, L. G., Bleotu, C., Diaconu, C. C., & Chivu-Economescu, M. (2015). Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J Stem Cells, 7*(9), 1185-1201. doi:10.4252/wjsc.v7.i9.1185

[11] Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature, 434*(7035), 843-850.

[12] Iqbal, W., Alkarim, S., AlHejin, A., Mukhtar, H., & Saini, K. S. (2016). Targeting signal transduction pathways of cancer stem cells for therapeutic opportunities of metastasis. *Oncotarget, 7*(46), 76337-76353. doi:10.18632/oncotarget.10942

[13] Espinoza, I., Pochampally, R., Xing, F., Watabe, K., & Miele, L. (2013). Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets & Therapy, 6*.

[14] Pires, B. R., D. E. Amorim IS., Souza, L. D., Rodrigues, J. A. & Mencalha, A. L. (2016). Targeting Cellular Signaling Pathways in Breast Cancer Stem Cells and its Implication for Cancer Treatment. *Anticancer Res.,* 36(11): p. 5681-5691.

[15] Koury, J., L. Zhong, & J. Hao, (2017), Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment. *Stem Cells International*. 2017: p. 10.

[16] Han, J., M.J. Hendzel, & J. Allalunis-Turner, (2011). Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment?, *Breast Cancer Research : BCR*. 13(3): p. 210-210.

[17] Takebe, N., Miele, L., Harris, P. J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., Yang, S. X., Ivy, S. P. (2015). Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol, 12*(8), 445-464. doi:10.1038/nrclinonc.2015.61

[18] Fortini, M.E., (2009)., Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. *Developmental Cell*, 16(5): p. 633-647.

[19] Lobry, C., P. Oh, & I. Aifantis, (2011), Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *The Journal of Experimental Medicine*. 208(10): p. 1931-1935.

[20] D'Angelo, R.C., Ouzounova, M., Davis, A., Choi, D.,Tchuenkam, S.M., Kim, G., Luther, T., Quraishi, A.A., Senbabaoglu, Y., Conley, S.J., Clouthier, S.G.,Hassan, K.A.,Wicha, M.S., Korkaya, H., (2015), Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity. *Molecular cancer therapeutics*, 14(3): p. 779-787.

[21] Al-Hussaini, H., Subramanyam, D., Reedijk, M., & Sridhar, S. S. (2011). Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Mol Cancer Ther, 10*(1), 9-15. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0677.

[22] Acar, A., Simoes, B.M., Clarke R.B. & Brennan, K., (2016), A Role for Notch Signalling in Breast Cancer and Endocrine Resistance. *Stem Cells Int*, p. 2498764.

[23] Liu, J., Shen, J.X., Wen X.F., Guo, Y.X. & Zhang, G.J., (2016), Targeting Notch degradation system provides promise for breast cancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*,. 104: p. 21-9.

[24] Yuan, X., Wu, H., Xu, H., Xiong, H., Chu, Q., Yu, S., Wu, G. S. & Wu, K., (2015), Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett*,. 369(1): p. 20-7.

[25] Dontu, G., Jackson, K. W., McNicholas, E., Kawamura, M. J., Abdallah, W. M., & Wicha, M. S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Research, 6*(6), R605. doi:10.1186/bcr920

[26] Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B., & Miele, L. (2010). Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res, 16*(12), 3141-3152. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2823

[27] Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol, 7*(9), 678-689. doi:10.1038/nrm2009

[28] Yang, F., Xu, J., Tang, L., & Guan, X. (2017). Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci, 74*(6), 951-966. doi:10.1007/s00018-016-2334-7

[29] Dufraine, J., Funahashi, Y., & Kitajewski, J. (2008). Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene, 27*(38), 5132-5137. doi:10.1038/onc.2008.227

[30] Harrison, H., Simões, B. M., Rogerson, L., Howell, S. J., Landberg, G., & Clarke, R. B. (2013). Oestrogen increases the activity of oestrogen receptor negative breast cancer stem cells through paracrine EGFR and Notch signalling. *Breast Cancer Research, 15*(2), R21. doi:10.1186/bcr3396

[31] Atapattu, L., Saha, N., Chheang, C., Eissman, M. F., Xu, K., Vail, M. E., Hii, L., Llerena, C., Liu, Z., Horvay, K., Abud, H.E., Kusebauch, U., Moritz, R.L., Ding, B.S., Cao, Z., Rafii, S., Ernst, M., Scott, A.M., Nikolov, D.B., Lackmann, M., Janes, P. W. (2016). An activated form of ADAM10 is tumor selective and regulates cancer stem-like cells and tumor growth. *J Exp Med, 213*(9), 1741-1757. doi:10.1084/jem.2015109

[32] Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling—are we there yet? *Nat Rev Drug Discov, 13*(5), 357-378. doi:10.1038/nrd4252

[33] Zhang, J., Kuang, Y., Wang, Y., Xu, Q., & Ren, Q. (2017). Notch-4 silencing inhibits prostate cancer growth and EMT via the NF-κB pathway. *Apoptosis, 22*(6), 877-884. doi:10.1007/s10495-017-1368-0

[34] Harrison, H., Farnie, G., Howell, S. J., Rock, R. E., Stylianou, S., Brennan, K. R., Brundred, N.J., Clarke, R. B. (2010). Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res, 70*(2), 709-718. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1681

[35] Clarke, R. B., Spence, K., Anderson, E., Howell, A., Okano, H., & Potten, C. S. (2005). A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol, 277*(2), 443-456. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.044

[36] Andrieu, G., Tran, A. H., Strissel, K. J., & Denis, G. V. (2016). BRD4 Regulates Breast Cancer Dissemination through

Jagged1/Notch1 Signaling. *Cancer Res, 76*(22), 6555-6567. doi:10.1158/0008-5472.can-16-0559

[37] Li, Y., Burns, J. A., Cheney, C. A., Zhang, N., Vitelli, S., Wang, F., Bett, A., Chastain, M., Audoly, L.P., Zhang, Z.-Q. (2010). Distinct expression profiles of Notch-1 protein in human solid tumors: Implications for development of targeted therapeutic monoclonal antibodies. *Biologics : Targets & Therapy, 4*, 163-171.

[38] Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer, 9*(4), 265-273.

[39] Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G., & Kang, Y. (2011). Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell, 19*(2), 192-205. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.022

[40] Kwon, C., Cheng, P., King, I. N., Andersen, P., Shenje, L., Nigam, V., & Srivastava, D. (2011). Notch Post-Translationally Regulates β-Catenin Protein in Stem and Progenitor Cells. *Nature cell biology, 13*(10), 1244-1251. doi:10.1038/ncb2313

[41] Won, H. Y., Lee, J. Y., Shin, D. H., Park, J. H., Nam, J. S., Kim, H. C., & Kong, G. (2012). Loss of Mel-18 enhances breast cancer stem cell activity and tumorigenicity through activating Notch signaling mediated by the Wnt/TCF pathway. *Faseb j, 26*(12), 5002-5013. doi:10.1096/fj.12-209247

[42] Golde, T.E., Koo, E.H., Felsenstein, K.M., Osborne, B.A. & Miele, L., (2013), γ-Secretase inhibitors and modulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1828(12): p. 2898-2907.

[43] Steg, A. D., Burke, M. R., Amm, H. M., Katre, A. A., Dobbin, Z. C., Jeong, D. H., & Landen, C. N. (2014). Proteasome inhibition reverses hedgehog inhibitor and taxane resistance in ovarian cancer. *Oncotarget, 5*(16), 7065-7080.

[44] Kondratyev, M., Kreso, A., Hallett, R. M., Girgis-Gabardo, A., Barcelon, M. E., Ilieva, D., Ilieva, D., Ware, C., Majumder, P.K., Hassell, J. A. (2012). Gamma-secretase inhibitors target tumor-initiating cells in a mouse model of ERBB2 breast cancer. *Oncogene, 31*(1), 93-103. doi:http://www.nature.com/onc/journal/v31/n1/suppinfo/onc2011212s1.html

[45] Li, S., & Li, Q. (2014). Cancer stem cells and tumor metastasis (Review). *Int J Oncol, 44*(6), 1806-1812. doi:10.3892/ijo.2014.2362

[46] Zhang, P., He, D., Chen, Z., Pan, Q., Du, F., Zang, X., Wang, Y., Tang, C., Li, H., Lu, H., Yao, X., Jin, J. Ma, X. (2016). Chemotherapy enhances tumor vascularization via Notch signaling-mediated formation of tumor-derived endothelium in breast cancer. *Biochem Pharmacol, 118*, 18-30. doi:10.1016/j.bcp.2016.08.008

[47] Collignon, J., Lousberg, L., Schroeder, H., & Jerusalem, G. (2016). Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer : Targets and Therapy, 8*, 93-107. doi:10.2147/BCTT.S69488

[48] Guestini, F., McNamara, K. M., Ishida, T., & Sasano, H. (2016). Triple negative breast cancer chemosensitivity and chemoresistance: current advances in biomarkers indentification. *Expert Opin Ther Targets, 20*(6), 705-720. doi:10.1517/14728222.2016.1125469

[49] Pant, S., Jones, S. F., Kurkjian, C. D., Infante, J. R., Moore, K. N., Burris, H. A., McMeekin, D.S., Benhadji, K.A., Patel, B.K., Frenzel, M.J., Kursar, J.D., Zamek-Gliszczynski, M.J., Yuen, E.S., Chan, E.M., Bendell, J. C. (2016). A first-in-human phase I study of the oral Notch inhibitor, LY900009, in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer, 56*, 1-9. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.021

[50] Locatelli, M. A., Aftimos, P., Dees, E. C., LoRusso, P. M., Pegram, M. D., Awada, A., Huang, B., Cesari, R., Jiang, Y., Shaik, M.N., Kern, K.A., Curigliano, G. (2017). Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer. *Oncotarget, 8*(2), 2320-2328. doi:10.18632/oncotarget.13727

[51] Schott, A.F., Landis, M. D., Dontu, G., Griffith, K. A., Layman, R. M., Krop, I., Paskett, L. A., Wong, H., Dobrolecki, L. E., Lewis, M. T., Froehlich, A. M., Paranilam, J., Hayes, D. F., Wicha, M. S. & Chang, J. C., (2013), Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors. *Clin Cancer Res*, 19(6): p. 1512-24.

[52] Debeb, B.G., Cohen, E. N. Boley, K. Freiter, E. M.,Li, L.,Robertson, F. M.,Reuben, J. M., Cristofanilli, M., Buchholz, T. A. & Woodward, W., (2012) A.Pre-Clinical studies of Notch Signaling Inhibitor RO4929097 in Inflammatory Breast Cancer Cells. *Breast cancer research and treatment*,. 134(2): p. 495-510.

[53] Nickoloff, B. J., Osborne, B. A., & Miele, L. (2003). Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene, 22*(42), 6598-6608. doi:10.1038/sj.onc.1206758

[54] Shih Ie, M., & Wang, T. L. (2007). Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res, 67*(5), 1879-1882. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3958

[55] Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T. J., de Leon, G. P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., u, X., Fidgway, J., Schahin-Reed, D., Dow, G.J., Shelton, A., Stawicki, S., Watts, R.J., Zhang, J., Choy, R., Howard, P., Kadyk, L., Yan, M., Zha, J., Callahan, C. A., Hymowitz, S. G., Siebel, C. W. (2010). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature, 464*(7291), 1052-1057. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7291/suppinfo/nature08878_S1.html

[56] Sharma, A., Paranjape, A. N., Rangarajan, A., & Dighe, R. R. (2012). A monoclonal antibody against human Notch1 ligand-binding domain depletes subpopulation of putative breast cancer stem-like cells. *Mol Cancer Ther, 11*(1), 77-86. doi:10.1158/1535-7163.mct-11-0508

[57] Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.-C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J.S., de

Sauvage, F., Plowman, G., Yan, M. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature, 444*(7122), 1083-1087. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7122/suppinfo/nature05313_S1.html

[58] Chiorean, E. G., LoRusso, P., Strother, R. M., Diamond, J. R., Younger, A., Messersmith, W. A., Adriaens, L., Liu, L., Kao, R.J., DiCioccio, A.T., Kostic, A., Leek, R., Harris, A., Jimeno, A. (2015). A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dll4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res, 21*(12), 2695-2703. doi:10.1158/1078-0432.ccr-14-2797

[59] Xu, Z., Wang, Z., Jia, X., Wang, L., Chen, Z., Wang, S., . . . Wu, M. (2016). MMGZ01, an anti-DLL4 monoclonal antibody, promotes nonfunctional vessels and inhibits breast tumor growth. *Cancer Lett, 372*(1), 118-127. doi:10.1016/j.canlet.2015.12.025

[60] Purow, B. (2012). Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Adv Exp Med Biol, 727*, 305-319. doi:10.1007/978-1-4614-0899-4_23

[61] Smalley, M. J., Reis-Filho, J. S., & Ashworth, A. (2008). BRCA1 and stem cells: tumour typecasting. *Nat Cell Biol, 10*(4), 377-379.

[62] Buckley, N. E., Nic An tSaoir, C. B., Blayney, J. K., Oram, L. C., Crawford, N. T., D'Costa, Z. C., Quinn, J.E., Kennedy, R.D., Harkin, D.P., Mullan, P. B. (2013). BRCA1 is a key regulator of breast differentiation through activation of Notch signalling with implications for anti-endocrine treatment of breast cancers. *Nucleic Acids Res, 41*(18), 8601-8614. doi:10.1093/nar/gkt626

[63] Chang, S., & Sharan, S. K. (2012). BRCA1 and MicroRNAs: Emerging Networks and Potential Therapeutic Targets. *Molecules and Cells, 34*(5), 425-432. doi:10.1007/s10059-012-0118-y

[64] Moskwa, P., Buffa, F. M., Pan, Y., Panchakshari, R., Gottipati, P., Muschel, R. J., Beech, J., Kulshrestha, R., Abdelmohsen, K., Weinstock, D.M., Gorospe, M., Harris, A.L., Helleday, T., Chowdhury, D. (2011). miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell, 41*(2), 210-220. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.005

[65] Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2010). Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Lett, 292*(2), 141-148. doi:10.1016/j.canlet.2009.11.012

[66] Brabletz, S., Bajdak, K., Meidhof, S., Burk, U., Niedermann, G., Firat, E., Wellner, U., Dimmler, A., Faller, G., Schubert, J., Brabletz, T. (2011). The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *Embo j, 30*(4), 770-782. doi:10.1038/emboj.2010.349

[67] Li, X.-j., Ji, M.-h., Zhong, S.-l., Zha, Q.-b., Xu, J.-j., Zhao, J.-h., & Tang, J.-h. (2012). MicroRNA-34a Modulates Chemosensitivity of Breast Cancer Cells to Adriamycin by Targeting Notch1. *Archives of Medical Research, 43*(7), 514-521. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.09.007

[68] Kang, L., Mao, J., Tao, Y., Song, B., Ma, W., Lu, Y., Zhao, L., Li, J., Yang, B. & Li, L., (2015), MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Sci*. 106(6): p. 700-8.

[69] Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov, 9*(10), 775-789. doi:10.1038/nrd3179

[70] Suman, S., Das, T. P., & Damodaran, C. (2013). Silencing NOTCH signaling causes growth arrest in both breast cancer stem cells and breast cancer cells. *Br J Cancer, 109*(10), 2587-2596. doi:10.1038/bjc.2013.642

[71] Pal, D., Kolluru, V., Chandrasekaran, B., Baby, B. V., Aman, M., Suman, S., Sirimulla, S., Sanders, M.A., Alatassi, H., Ankem, M.K., Damodaran, C. (2017). Targeting aberrant expression of Notch-1 in ALDH+ cancer stem cells in breast cancer. *Mol Carcinog, 56*(3), 1127-1136. doi:10.1002/mc.22579

[72] So, J. Y., Wahler, J., Das Gupta, S., Salerno, D. M., Maehr, H., Uskokovic, M., & Suh, N. (2015). HES1-mediated inhibition of Notch1 signaling by a Gemini vitamin D analog leads to decreased CD44(+)/CD24(-/low) tumor-initiating subpopulation in basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol, 148*, 111-121. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.12.013

[73] Shan, N. L., Wahler, J., Lee, H. J., Bak, M. J., Gupta, S. D., Maehr, H., & Suh, N. (2016). Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.12.001

[74] Shim, Y., & Song, J. M. (2015). Quantum dot nanoprobe-based high-content monitoring of notch pathway inhibition of breast cancer stem cell by capsaicin. *Mol Cell Probes, 29*(6), 376-381. doi:10.1016/j.mcp.2015.09.004

[75] Sun, D. W., Zhang, H. D., Mao, L., Mao, C. F., Chen, W., Cui, M., Ma, R., Cao, H.X., Jing, C.W., Wang, Z., Wu, J.Z., Tang, J. H. (2015). Luteolin Inhibits Breast Cancer Development and Progression In Vitro and In Vivo by Suppressing Notch Signaling and Regulating MiRNAs. *Cell Physiol Biochem, 37*(5), 1693-1711. doi:10.1159/000438535

[76] Sun, Z., Zhou, C., Liu, F., Zhang, W., Chen, J., Pan, Y., Ma, L., Liu, Q., Du, Y., Yang, J. & Wang, Q., (2018), Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway in vivo and in vitro. *Oncology Letters*. 15(1): p. 908-916.

[77] Moselhy, J., Srinivasan, S., Ankem, M. K., & Damodaran, C. (2015). Natural Products That Target Cancer Stem Cells. *Anticancer Res, 35*(11), 5773-5788.

[78] Xia, S., Zhang, X., Li C. & Guan, H., (2017), Oridonin inhibits breast cancer growth and metastasis through blocking the Notch signaling. *Saudi Pharmaceutical Journal,* 25(4): p. 638-643.

[79] Zhang, J., Yu, K., Han, X., Zhen, L., Liu, M. Zhang, X., Ren, Y. & Shi, J., (2018), Paeoniflorin influences breast cancer cell proliferation and invasion via inhibition of the Notch1 signaling pathway. *Mol Med Rep,*. 17(1): p. 1321-1325.

[80] Brannon-Peppas, L., & Blanchette, J. O. (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews, 64*, 206-212.

[81] Hartmann, L. C., Keeney, G. L., Lingle, W. L., Christianson, T. J., Varghese, B., Hillman, D., Oberg, A. L., Low, P. S. (2007). Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *Int J Cancer, 121*(5), 938-942.

[82] Wittig, R., Rosenholm, J. M., von Haartman, E., Hemming, J., Genze, F., Bergman, L., Simmet, T., Lindén, M., Sahlgren, C. (2014). Active targeting of mesoporous silica drug carriers enhances gamma-secretase inhibitor efficacy in an in vivo model for breast cancer. *Nanomedicine (Lond), 9*(7), 971-987. doi:10.2217/nnm.13.62

[83] Mamaeva, V., Rosenholm, J. M., Bate-Eya, L. T., Bergman, L., Peuhu, E., Duchanoy, A., Fortelius, L.E., Landor, S., Toivola, D.M., Lindén, M. (2011). Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer. *Molecular Therapy, 19*(8), 1538-1546.

[84] Mamaeva, V., Niemi, R., Beck, M., Ozliseli, E., Desai, D., Landor, S., Gronroos, T., Kroqvist, P., Pettersen, I.K.N., McCormack, E., Rosenholm, J.M., Linden, M., Sahlgren, C. (2016). Inhibiting Notch Activity in Breast Cancer Stem Cells by Glucose Functionalized Nanoparticles Carrying gamma-secretase Inhibitors. *Mol Ther, 24*(5), 926-936. doi:10.1038/mt.2016.42

[85] Yang, H., Li, Y., Li, T., Xu, M., Chen, Y., Wu, C., Dang, X., Liu, Y. (2014). Multifunctional core/shell nanoparticles cross-linked polyetherimide-folic acid as efficient Notch-1 siRNA carrier for targeted killing of breast cancer. *Sci Rep, 4*, 7072. doi:10.1038/srep07072.