

MEME KANSERİ VE HEPATOSELLÜLER KANSER HÜCRE DİZİLERİNDE AMPK MODÜLASYONUNUN KANSER HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN GERÇEK-ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ xCELLigence ARACILIĞIYLA İNCELENMESİ

Evaluation of the Effects of AMPK Modulation on Cancer Cell Proliferation via Real-Time Cell Analysis System xCELLigence in Breast and Hepatocellular Cancers

Gürcan GÜNAYDIN, M. Emre GEDİK

ÖZET

AMP (adenozin monofosfat) aktive edici protein kinaz (AMPK), hücrenin çeşitli metabolik stres durumlarında aktive olarak hücredeki enerji homeostazını sağlayan önemli bir serin / treonin protein kinazdır. Stres ve hipoksik ortam koşulları gibi organizmadaki enerji miktarının düşük olduğu veya enerji tüketiminin yüksek olduğu koşullarda hücresel AMP miktarı artmakta ve AMPK aktivasyonu ile birlikte yağ asidi oksidasyonu ve glikolizis gibi katabolik reaksiyonlar artmaktadır. AMPK aktivasyonu; birçok kanser türünde dereğüle olmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar, AMPK agonisti ajanlar ile kanser hücrelerinin hedeflenebileceğini ve bu sayede ortalama sağkalımın artırılabilceğini öne sürmektedir. Bu görüşün aksine bazı çalışmalar ise, tümör gelişimi sürecinde AMPK aktivasyonunun arttığını göstermektedir. Kanser hücrelerinin olumsuz koşullar altında AMPK aktivasyonu gösterdiği ve AMPK'ın protümör özellikte olduğu iddia edilmektedir. Kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda ortaya çıkan bu çelişkili durumun, hücrenin moleküler profiline ve tümör mikroçevresindeki koşullara bağlı olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca, AMPK aktivitesi enflamasyonu ve anti-tümör immün yanıtları düzenleyerek tümör gelişimi ve ilerlemesini azaltabilir. Bu çalışmada, farklı moleküler profillere sahip meme kanseri (SK-BR-3) ve hepatosellüler kanser (Huh-7) hücre dizileri, AMPK inhibitör ve aktivatör ajanları ile ayrı ayrı olarak inkübe edilmiştir. İlaç inkübasyonları sonucu hücre proliferasyon paternleri, gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence) kullanılarak analiz edilmiş ve gözlemlenen değişimler kendi aralarında ve ilaç ile inkübe edilmemiş kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Bu sayede, iki farklı kanser türünde AMPK hedefine yönelik doğru stratejinin karşılaştırılması olarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Genel olarak AMPK aktivasyonu, hem meme kanserinde hem de hepatosellüler kanserde hücre proliferasyonu ve agresifliğini arttırmıştır. Öbür taraftan, AMPK inhibisyonu ise genel anti-tümör etkiler göstermiştir. Ancak, hepatosellüler kanser hücrelerinde düşük-doza AMPK inhibisyonu proliferasyonu artırmıştır. Kanser tedavisinde AMPK modülasyonunun, kanser metabolizması ve anti-tümör immün yanıtlar üzerinde kritik bir regülasyon potansiyeli olduğu unutulmamalıdır. Bu çalışmanın sonuçları, kanser metabolizmasını ve anti-tümör immün yanıtları hedef alan anti-kanser tedavi stratejilerinin farklı kanserlerde dikkatle geliştirilmesi ve uygulanması gerekliliğine dikkat çekmektedir.

Anahtar Sözcükler: AMPK; Hepatosellüler kanser; Kanser metabolizması; Meme kanseri; Tümör immünolojisi; xCELLigence

ABSTRACT

AMP (adenosine monophosphate) activating protein kinase (AMPK), is a crucial serine / threonine protein kinase that is activated in several cellular metabolic stress conditions in order to maintain cellular energy metabolism. In states of low energy or high energy expenditure in the organism such as conditions of stress and hypoxia, cellular AMP level increases and AMPK becomes activated. This, in turn, results in an increase in catabolic reactions like fatty acid oxidation and glycolysis. AMPK activation becomes dysregulated in several types of cancer. Several studies suggest that AMPK agonist agents can be utilized to target cancer cells, which may increase mean survival. On the contrary, several other studies report that AMPK activation is increased during tumor development. It is proposed that cancer cells show AMPK activation under unfavorable conditions and AMPK has pro-tumoral features. This contradiction that has arisen in studies with varying results obtained from cancer cells was proposed to be due to the molecular profile of the cells and the conditions of the tumor microenvironment. In addition, AMPK activity may decrease tumor development and progression by regulating inflammation and anti-tumor immune responses. In the current study, breast (SK-BR-3) and hepatocellular (Huh-7) cancer cell lines with different molecular profiles were incubated with either AMPK inhibitor or activator agents. Cellular proliferation patterns after drug incubations were analyzed with a real-time cell analysis system (xCELLigence) and the results were compared with other treatment group as well as the control group was not incubated with any of the drugs. By this way, we aimed to determine the right strategy to target AMPK in two different cancer types in a comparative manner. In general, activation of AMPK increased cancer cell proliferation and aggressiveness in both breast and hepatocellular cancers. On the other hand, AMPK demonstrated anti-tumoral effects in general. However, low-dose AMPK inhibition increased the proliferation of hepatocellular cancer cells. It should be kept in mind that AMPK modulation as a cancer treatment approach has a critical regulatory potential on cancer metabolism and anti-tumor immune responses. The results of the current study call attention to the importance of meticulous development and application of anticancer treatment modalities that target cancer metabolism in different cancer types.

Keywords: AMPK; Hepatocellular cancer; Cancer metabolism; Breast cancer; Tumor immunology; xCELLigence

Hacettepe Üniversitesi
Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji
Anabilim Dalı, Sıhhiye, 06100,
Ankara

Gürcan GÜNAYDIN, Dr. Öğr. Üyesi
M. Emre GEDİK, Uzm. Biyolog

İletişim:

Dr. Öğr. Üyesi Gürcan GÜNAYDIN
Hacettepe Üniversitesi Kanser Ens.
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye,
06100, Ankara
Tel: +90-312-305-4322
e-mail:
gurcangunaydin@hacettepe.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 14.06.2018
Kabul tarihi/Accepted: 26.09.2018
DOI: 10.16919/bozoktip.434074

Bozok Tıp Derg 2018;8(4):95-103
Bozok Med J 2018;8(4):95-103

Giriş

AMP (adenozin monofosfat) aktive edici protein kinaz (AMPK), hücrenin çeşitli metabolik stres durumlarında aktive olarak hücredeki enerji homeostazını sağlayan önemli bir serin / treonin protein kinazdır (1). Bu protein kinaz, enerji homeostazında rol alan bir besin ve enerji sensörü özelliği taşır (2). Enerji seviyesi düştüğünde aktive olarak ATP üretimini destekler. Stres ve hipoksik ortam koşulları gibi organizmadaki enerji miktarının düşük olduğu veya enerji tüketiminin yüksek olduğu koşullarda hücresel AMP miktarı artmakta ve AMPK aktivasyonu ile birlikte yağ asidi oksidasyonu ve glikolizis gibi katabolik reaksiyonlar artmaktadır. Bunun sonucunda yağ asidi, kolesterol ve protein sentezi gibi anabolik reaksiyonlar baskılanmaktadır (3). AMPK, büyümenin regülasyonunda ve metabolizmanın tekrar programlanmasında önemli role sahiptir (4). Hem kemirgenlerde (5) hem de insanlarda (6) kas kontraksiyonları ile şiddete bağımlı bir şekilde aktive olmaktadır (7). Bu sayede, egzersiz sırasında iskelet kası enerji dengesinin sağlanmasında rol oynamaktadır. AMPK ayrıca, otofaji ve hücre polarite gibi hücresel süreçlerle de ilişkilidir. İntakt hücrelerde AMPK'ın aktivasyonu için AMP analogu olarak AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) kullanılabilir (8). AMPK'ın AICAR ile farmakolojik aktivasyonu, hem iskelet kaslarında (9) hem de kalpte (10) yağ asidi alımını arttırmaktadır. Ayrıca, Foretz ve arkadaşlarının sonuçlarına göre AMPK, yağ asidi sentezin glukoz-uyarımli transkripsiyonunu inhibe etmektedir (11). Adiponektin'in, AMPK'ı aktive ettiği gösterilmiştir (12,13). Buna ilaveten, in vivo AMPK aracılı HMG-CoA redüktaz'ın hormonal düzenlenmesinin, kolesterol metabolizması regülasyonunda önemli olabileceği düşünülmektedir (14). AMPK, protein sentezini de birçok noktada inhibe etmektedir (15). White ve arkadaşları AMPK ile enflamasyon arasında da bir etkileşim olduğu ifade etmiştir (16). AMPK aktivatörleri, insan adipositlerinde pro-enflamatuvar yanıtları modüle etmektedir (16). AMPK, kriptom fosforilasyonu ve yıkımı aracılığıyla sirkadyan saatin düzenlenmesinde de rol almaktadır (17).

Yakın zamanlı çalışmaların sonuçlarına göre AMPK, enflamatuvar sinyal yollarında kritik role sahiptir (18). Pro-enflamatuvar uyarı (LPS) sonucunda AMPK

aktivitesi azalmakta iken anti-enflamatuvar sitokin (IL-10, TGF- β) uyarısı sonucu artmaktadır (19). AMPK inhibisyonu durumunda TNF α , IL-6 ve IL-1 üretimi artarken; AMPK artışı durumunda enflamatuvar yanıtlar zayıflamakta ve IL-10 üretimi artmaktadır (19). Blagih ve arkadaşlarının sonuçlarına göre, AMPK aynı zamanda T hücre metabolik adaptasyonunu regüle etmekte ve efektör yanıtlarını düzenlemektedir (20). Aktive T hücrelerde, AMPK tarafından kontrol edilen metabolik bir kontrol-noktası bulunmaktadır (20). Bu sayede T hücre metabolizması etkin bir şekilde sağlanabilmektedir. Bu nedenle de T hücre yanıtları için AMPK kritik bir önem taşımaktadır. AMPK aktivitesi enflamasyonu ve anti-tümör immün yanıtları düzenleyerek tümör gelişimi ve ilerlemesini de azaltabilir (21).

AMPK aktivasyonu; diyabette, kalp kası bozukluklarında, enflamatuvar hastalıklarda ve viral enfeksiyonlarda olduğu gibi birçok kanser türünde de deregüle olmaktadır (22). Ciddi obezitede baskılanmış AMPK sinyal iletimi, metabolik sendromu alevlendirebilmektedir (15). Literatürde yer alan çeşitli araştırmalar, diyabet tedavisinde etkili sonuçlar oluşturan AMPK agonisti ajanların kanser oluşumunu baskılayıcı özelliğe sahip olduğunu belirtmektedir (23). AMPK'ın çeşitli tümör supresörlerle bağlantılı olması, bu yolağın yerleşmiş diyabet ilaçlarıyla terapötik manipülasyonunun kanserde önemli olabileceğini düşündürmektedir (24).

Bu çalışmada, meme kanseri (SK-BR-3) ve hepatosellüler karsinom (Huh-7) hücre dizileri, AMPK inhibitör ve aktivatör ajanları ile ayrı ayrı olarak inkübe edilmiştir. İlaç inkübasyonları sonucu hücre proliferasyon paternleri analiz edilmiştir ve gözlemlenen değişimler kendi aralarında ve ilaç ile inkübe edilmemiş kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Bu sayede, iki farklı kanser türünde AMPK hedefine yönelik doğru stratejinin karşılaştırılması olarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Dizileri ve İlaç Uygulamaları:

Çalışma kapsamında kullanılan meme kanseri (SK-BR-3 [American Type Culture Collection, Manassas, VA, ABD]) ve hepatosellüler kanser (Huh-7 [Prof. Dr. İhsan

Gürsel'in nazik hediyesi, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye)) hücre dizileri ile yapılan çalışmalar, hücre kültürü çalışmalarımız için laboratuvarımızda mevcut olan dikey akım kabini (laminar flow) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre dizileri %10 FBS, 2 mM L-Glutamin, %1 Penisilin/streptomisin ilave edilmiş DMEM besiyerinde (Lonza, İsviçre) çoğaltılarak CO₂'li etüvde 37°C'da inkübe edilmiştir. Hücrelerin, farklı dozlarda AMPK aktivatörü "A 769662 (Abcam, İngiltere)" veya inhibitörü "Compound C (Dorsomorphin) (Abcam, İngiltere)" ajanları ile inkübasyonları sağlanmıştır. "A 769662" etkili, tersinir bir AMPK aktivatörüdür. AMP etkilerini taklit ederek AMPK'ı direkt olarak aktive eder. AMPK'ı hem allosterik olarak hem de AMPK defosforilasyonunu inhibe ederek aktive etmektedir. "Compound C (Dorsomorphin)" ise etkili ve tersinir bir AMPK inhibitörüdür.

xCELLigence Aracılı Gerçek-Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi:

Gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi, altın biyosensör mikroelektrotlar kullanarak elektriksel empedans ölçmektedir. Bu sistemin hücre sağlığı ve davranışı üzerine zararı olmadığı gösterilmiştir (25). Hücre sayısının artışı, empedansı değiştirmektedir. Bu sayede de gerçek-zamanlı kantitatif hücre analizi yapılabilmektedir. Bu uygulamalar için hücrenin işaretlenmesi de gerekmemektedir (26). Bu çalışmada, RTCA SP xCELLigence Sistemi (ACEA, San Diego, CA, ABD) kullanılarak dinamik ve gerçek-zamanlı hücre proliferasyonu incelenmiştir. Analiz prosedürü kısaca şöyledir. Gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi içindeki altın mikroelektrotların empedansı, içinde hücre bulunmayan tam hücre besiyeri kullanılarak ölçülmektedir. Bunu arkasından kanser hücreleri E-plakaya ekilmektedir. Gerçek-zamanlı hücre analiz sisteminin "E-plate"lerine her koşul için 3000 hücre/kuyu-başı Huh-7 veya 4000 hücre/kuyu-başı SK-BR-3 ekilmiştir. Hücrelerin plakaya tutunmaları için 19 saat beklenilmiştir. Bu sürenin sonunda değişen konsantrasyonlarda AMPK aktivatörü (A 769662) veya inhibitörü (Compound C) ajanlar hücrelerin üzerine eklenmektedir. Kanser hücrelerine çalışma konsantrasyonu olarak 63 µM, 100 µM, 158 µM ve 250 µM AMPK aktivatörü (A 769662) veya 4,5 µM, 10 µM, 22 µM, ve 50 µM AMPK inhibitörü

(Compound C) uygulanmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda daha önce kullanılmış olan A 769662 ve Compound C konsantrasyonları araştırılmış ve kullanılacak maksimum / minimum konsantrasyonlar belirlenmiştir. Bu aralıkta yer alacak şekilde ara konsantrasyonlar, logaritmik artış / azalış gösterecek biçimde belirlenmiştir. Eklenen ajanların varlığında hücrelerin proliferasyonu takip edilerek toplam 120 saatlik proliferasyon kinetiği incelenmiştir. Prolifere olan hücreler, "E-plate"e tutunan toplam hücre sayısını arttırdığı için empedans değişmektedir ve bu değişim 96 saat süreyle dinamik olarak tespit edilmektedir. Bu yöntemle dinamik hücre proliferasyonu kinetiği tespit edilmiştir ve farklı zaman noktalarındaki "hücre indeksleri (CI)" hesaplanmıştır.

BULGULAR

Gerçek-zamanlı hücre analiz sisteminin "E-plate"lerine Huh-7 veya SK-BR-3 hücreleri ekilmiştir. Kanser hücrelerine AMPK aktivatörü (A 769662) veya AMPK inhibitörü (Compound C) uygulanmıştır. Hücrelerin belirtilen ajanlara >4 gün süreyle maruz kalması sağlanmıştır. Her koşul için deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Ayrıca, herhangi bir ajana maruz bırakılmayan Huh-7 ve SK-BR-3 hücreleri, kontrol olarak kullanılmıştır.

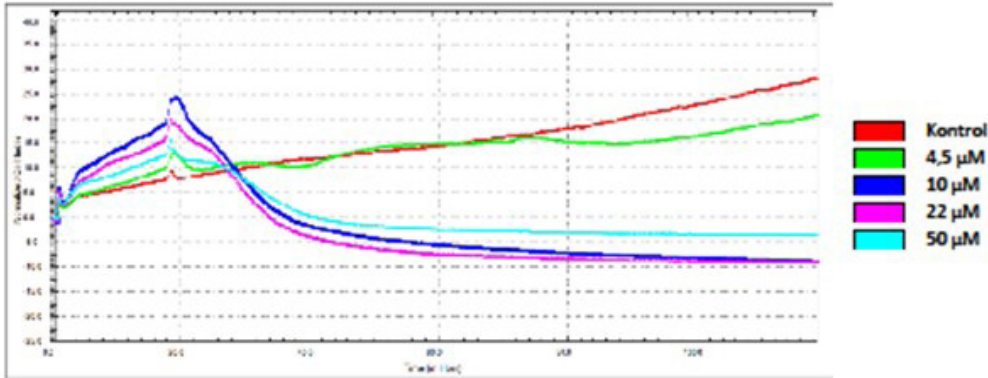
AMPK aktivasyonu yapılan meme kanseri hücreleri, 63 µM, 100 µM, 158 µM dozlarında kontrole göre daha fazla proliferasyon göstermiştir. Ancak 250 µM konsantrasyonda bu etki bulunmamaktadır (Şekil 1).

Benzer şekilde, 250 µM dışındaki AMPK aktivatörü dozlarında hepatosellüler kanser hücre proliferasyonu artış göstermektedir (Şekil 2).

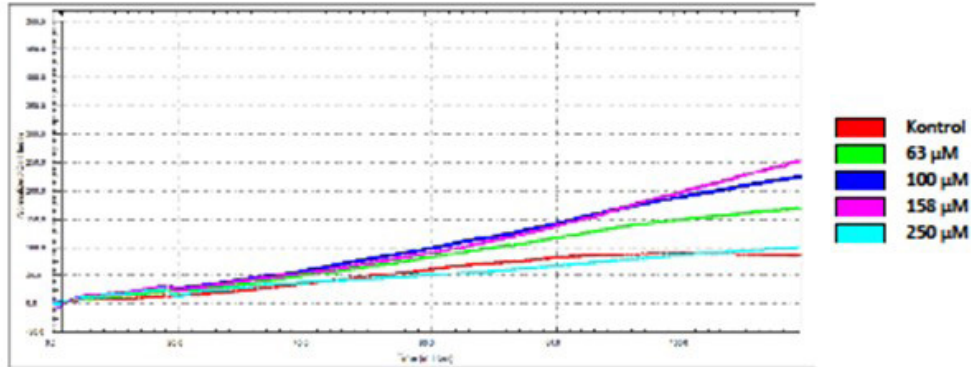
Öbür taraftan, AMPK inhibisyonu uygulanana meme kanseri hücrelerinde en düşük doz olan 4,5 µM bile hücre proliferasyonunu arttırmamıştır (Şekil 3). Dahası, 10 µM, 22 µM, ve 50 µM gibi daha yüksek AMPK inhibitörü konsantrasyonlarında hücrelerde belirgin sağkalım azalması izlenmiştir. Meme kanseri hücrelerine benzer şekilde, hepatosellüler kanser hücreleri de 10 µM, 22 µM, ve 50 µM AMPK inhibitörü varlığında hayatta kalamamıştır (Şekil 4).

48 saat süre boyunca AMPK aktivasyonu yapılan hücrelerde, aktivatör konsantrasyonunun hücreler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 5 ve Şekil 6'da görüldüğü üzere, 63 μM , 100 μM , 158 μM AMPK aktivatörü varlığında hem meme kanseri hem de hepatosellüler kanser hücrelerinin proliferatif özelliklerinde artış görülmektedir.

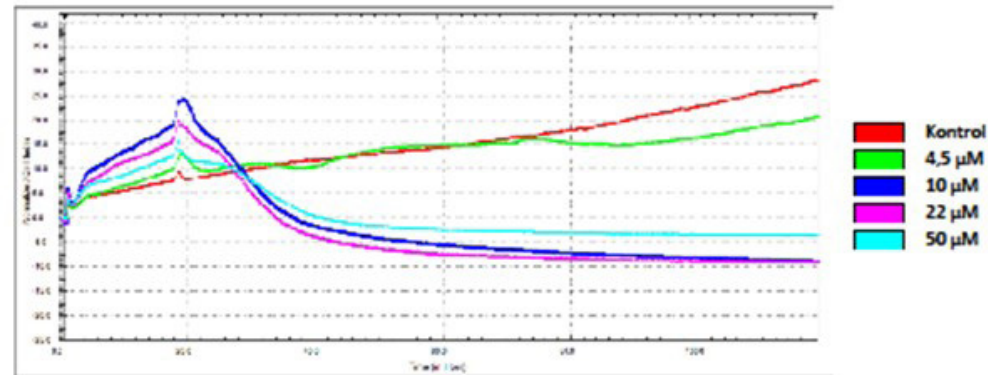
Şekil 1. Değişen konsantrasyonlarda AMPK aktivatörüne maruz bırakılan meme kanseri hücrelerinin ortalama gerçek-zamanlı hücre analizi.



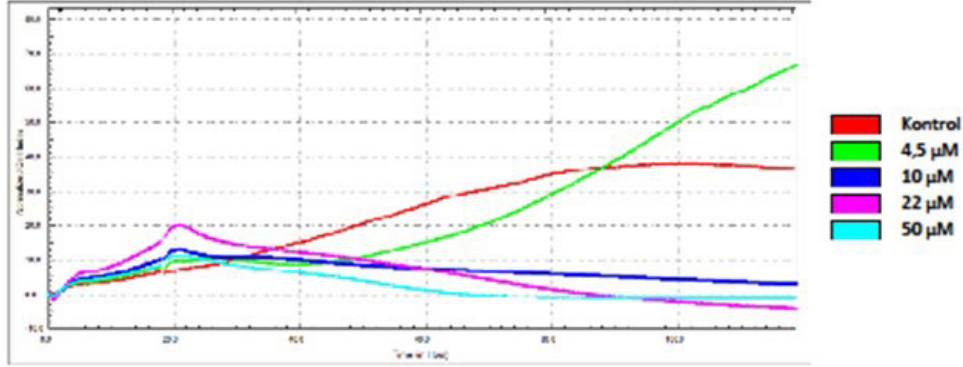
Şekil 2. Değişen konsantrasyonlarda AMPK aktivatörüne maruz bırakılan hepatosellüler kanser hücrelerinin ortalama gerçek-zamanlı hücre analizi.



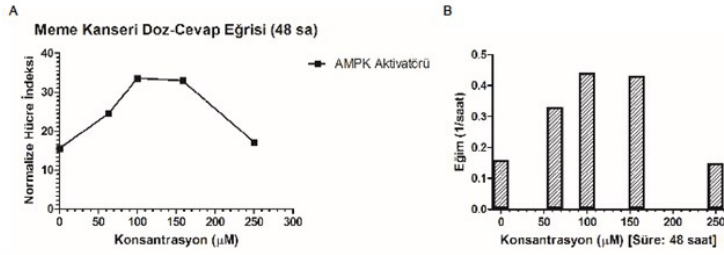
Şekil 3. Değişen konsantrasyonlarda AMPK inhibitörüne maruz bırakılan meme kanseri hücrelerinin ortalama gerçek-zamanlı hücre analizi.



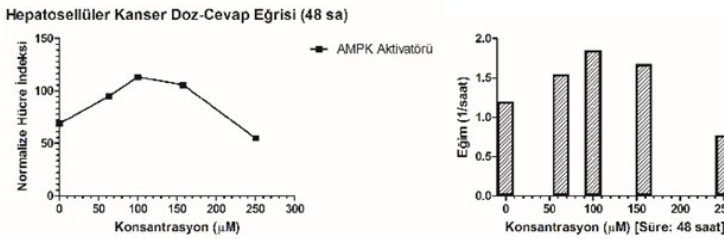
Şekil 4. Değişen konsantrasyonlarda AMPK inhibitörüne maruz bırakılan hepatosellüler kanser hücrelerinin ortalama gerçek-zamanlı hücre analizi.



Şekil 5. (A) Meme kanseri hücrelerinin 48 saat AMPK aktivatörü maruziyeti doz-cevap grafiği. (B) Meme kanseri hücrelerinin 48 saatlik AMPK aktivatörü maruziyeti dönemindeki hücre proliferasyon eğrisinin eğimleri grafiği. Her kuyu için 48 saatlik ilaç maruziyeti periyodu içindeki normalize CI değerleri doğrusal bir modele oturtulduktan sonra, eğimler hesaplanmıştır.



Şekil 6. (A) Hepatosellüler kanser hücrelerinin 48 saat AMPK aktivatörü maruziyeti doz-cevap grafiği. (B) Hepatosellüler kanser hücrelerinin 48 saatlik AMPK aktivatörü maruziyeti dönemindeki hücre proliferasyon eğrisinin eğimleri grafiği. Her kuyu için 48 saatlik ilaç maruziyeti periyodu içindeki normalize CI değerleri doğrusal bir modele oturtulduktan sonra, eğimler hesaplanmıştır.



TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonucunda sağlıklı hücrenin kanser hücrelerine transformasyonu sonucu gelişen metabolik değişiklikte önemli rol oynayan AMPK proteininin aktivasyonu ve inhibisyonu sonucu hücrenin proliferatif paternindeki değişiklikler karşılaştırılmıştır. AMPK'nin hedeflenmesine yönelik çeşitli literatür

çalışmalarında karşılaşılan farklı sonuçların çapraz analizler yapılarak değerlendirilmesi sağlanmıştır. Aynı hücre dizilerinin zıt yönde AMPK modülasyonu, ilk defa karşılaştırılmıştır. AMPK diyabette, kalp kası bozukluklarında, enflamatuvar hastalıklarda ve viral enfeksiyonlarda olduğu gibi birçok kanser türünde de deregüle olmaktadır. Hücrenin metabolik sinyal

yolağının ana regülatuar proteini olan AMPK aktivasyonunun, hücre proliferasyonu, apoptotik yolak aktivasyonu, protein translasyonunun baskılanması gibi bir takım değişikliklere yol açtığı ileri sürülmektedir. Kanser hücresinde AMPK ifadesindeki değişikliklerin hücrenin sağkalımını etkilediği ve metabolik faaliyetlerini minimize ederek sağlıklı hücreler ile kıyaslandığında kanser hücresine çeşitli avantajlar sağladığı belirtilmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışma aracılığıyla farklı moleküler profillere sahip meme kanseri ve hepatosellüler kanser hücre dizilerinde AMPK'nin farmakolojik olarak hedeflenmesi sonucunda hücrenin proliferasyonunda ve sağkalımında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

Çalışmamızda, hücrelerin AMPK aktivatörü ile inkübasyonları sonucu hem meme kanseri hem de hepatosellüler kanser hücrelerinde 100 µM ilaç konsantrasyonuna kadar hücre proliferasyonu / agresifliği giderek artmaktadır (Şekil 5 ve Şekil 6). Bu bulgu, literatürde ifade edildiği üzere AMPK aktivitesinin kanser hücre sağkalımı üzerinde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Ancak AMPK aktivatör dozu daha da arttırılırsa, bu etki yavaşça tersine dönmektedir. 158 µM AMPK aktivatörü varlığında hücre proliferasyonu hala kontrolden fazla olsa da, 100 µM ilaç konsantrasyonuna kıyasla daha düşüktür. İlaç konsantrasyonu daha da arttırılırsa (250 µM), AMPK aktivatörünün pro-tümöral etkisi tersine dönmektedir. Bu sonuçlar, kanser hücresi için AMPK aktivitesinin regülasyonunun ne kadar kritik olduğunu altını çizmektedir. Yapılan klinik ve prelinik çalışmalar, AMPK agonisti ajanlar ile kanser hücrelerinin hedeflenebileceğini ve bu sayede ortalama sağkalımın arttırılabileceğini göstermektedir (27-29). Bu görüşün aksine bazı çalışmalar ise, tümör gelişimi sürecinde AMPK aktivasyonunun arttığını göstermektedir (30, 31). Hepatosellüler kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada, kanser başlatıcı hücrelerin kök hücre belirteci ve homeo kutu proteini olan NANOG'un hücre metabolizmasını regüle ettiğini göstermektedir. NANOG ve AMPK aktivasyonu birlikte oksidatif fosforilasyon metabolizmasının yağ asidi oksidasyonuna dönüşümü gerçekleştirmektedir. Bu durumun, kanser başlatıcı kök hücrelerin ilaca karşı direnç geliştirmelerini sağladığı öne sürülmektedir. (32). Kanser hücrelerinin olumsuz

koşullar altında metabolik faaliyetlerini AMPK aktivasyonu ile regüle ederek sağkalım avantajı sağladığı ve bu bağlamda AMPK'ın pro-tümöral bir protein kinaz olduğu ifade edilmektedir (33, 34). AMPK aktivitesinin baskılanmasıyla birlikte hücredeki metabolik stresi kontrol edemeyen kanser hücresinin ölümü hedeflenmektedir (35, 36). Yakın zamanlı çalışmaların sonuçlarına göre AMPK, kanserde farklı koşullarda proveya anti-tümörijenik etki gösterebilmektedir (22, 33). Kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda ortaya çıkan bu çelişkili durumun, hücrenin moleküler profiline ve tümör mikroçevresindeki koşullara bağlı olduğu öne sürülmektedir (37, 38). Bizim çalışmamızda da kanser hücresi hızlı çoğalmasını desteklemek için belirli bir düzeye kadar AMPK aktivite artışından fayda görürken, kritik eşiğin üzerinde bu fayda kaybolmaktadır. Dahası, AMPK aktivasyonunun yapılmasının ve bu aktivasyonun düzeyinin hücreler üzerindeki etkisi meme kanseri ve hepatosellüler kanser hücrelerinde benzer olarak bulunmuştur.

AMPK inhibisyonunun kanser hücreleri üzerindeki etkisi ise daha farklıdır. 10 µM, 22 µM, ve 50 µM AMPK inhibitörü uygulanan hem meme kanseri hem de hepatosellüler kanser hücreleri proliferasyon özelliklerini belirgin düzeyde kaybetmiştir. AMPK fonksiyonlarının kanser hücresi metabolizması üzerindeki önemi düşünüldüğünde aslında bu bulgu oldukça mantıklıdır. Zaten hücrenin proliferasyonu ve hayatta kalması için AMPK fonksiyonu oldukça kritiktir. İlginç olan bir bulgu ise, 4,5 µM AMPK inhibitör dozunda izlenmiştir. Meme kanseri hücrelerinde düşük düzeyli bu inhibisyon, kontrole kıyasla çok belirgin bir fark yaratmamıştır (Şekil 3). Özellikle 60 saat süreyle AMPK inhibitörüne maruz kalan hücreler kontrole benzer düzeyde proliferasyon göstermiştir. Ancak 60 saatten sonra hücrelerin AMPK inhibisyonuna tolerans özelliği azalmakta ve meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu kontrole kıyasla düşmektedir (Şekil 3). Bu kinetik değişim, gerçek-zamanlı hücre analizi yapılmasının kanser metabolizması çalışmaları için ne kadar önemli olduğunu bir göstergesidir. Meme kanseri hücrelerinin 4,5 µM AMPK inhibitörüne 60 saate kadar dayanabildiğinin tespiti, sadece bu yöntemle ortaya konulabilir, çünkü belirli bir zaman noktası temelli sitotoksiste tespiti yaklaşımları, bu kinetik

değişimi kolaylıkla atlayabilecektir. Bu gerçek-zamanlı yaklaşımın önemi, hepatosellüler kanser hücrelerinin AMPK inhibisyonuna verdiği yanıtlar incelendiğinde daha fazla ortaya çıkmaktadır. Hepatosellüler kanser hücrelerinin 4,5 µM AMPK inhibitörüne verdiği yanıt, meme kanseri hücrelerinin verdiği yanıtın tam tersidir. Yaklaşık 72 saate kadar ilaç maruziyeti süresince düşük dozda AMPK inhibitörü ile inkübe edilen hepatosellüler kanser hücreleri, kontrol hücrelerine kıyasla daha az proliferasyon göstermiştir. Ancak 72 saatlik inkübasyondan sonra 4,5 µM AMPK inhibitörüne maruz kalan hücrelerin sayısı, kontrol grubunu geçmiştir (Şekil 4). Daha yüksek dozda AMPK inhibitörüne karşı hücreler tolerans gösteremeseler de, hepatosellüler kanser hücrelerinin düşük dozda AMPK inhibitörüne yaklaşık 72 saat gibi bir sürede adapte olması oldukça ilginçtir. Aslında bu bulgu, tümörün değişimi ve de bunun sonucu olarak farklı koşullara adaptasyonunun ne kadar kuvvetli olduğunun bir göstergesi olarak da kabul edilebilir. Bunlara ilaveten, AMPK'ın immün sistemdeki önemi göz önüne alındığında, AMPK modülasyonunun anti-tümör immün yanıtlar için ne kadar kritik olduğu görülebilir. AMPK-aracılı metabolik homeostazın, T hücre aracılı adaptif immün yanıtlarda önemli rol oynadığı bilinmektedir (20). Ayrıca AMPK agonistleri doğal ve adaptif immün yanıtları baskılayabilmektedir (39). Öbür taraftan, AMPK'ın doğal immün sistemi indüklediği de rapor edilmiştir (40). Bu bulgular, kanser tedavisinde AMPK modülasyonunun kanserin önemli özellikleri arasında yer alan hem kanser metabolizması hem de anti-tümör immün yanıtlar üzerinde kritik bir regülasyon potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır.

SONUÇ

Bu çalışmada, kanser hücre metabolizması için kritik öneme sahip olduğu bilinen AMPK'ın modülasyonunun meme ve hepatosellüler kanser hücre proliferasyonu ve sağkalımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu etkilerin kinetik değişimlerini detaylı olarak tespit edebilmek amacıyla xCELLigence gerçek-zamanlı hücre analizi sistemi kullanılarak dinamik ölçümler yapılmıştır. Çeşitli çalışmalarda kanser hücresi proliferasyonunda ve protein translasyonunda regülatör görev sağlayan AMPK aktivasyonunun, hücreye rezistans özellik kazandırdığı belirtilmektedir. Gerçekten de bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda, AMPK

aktivasyonun belirli sınırlar dahilinde kalmak koşuluyla hem meme kanserinde hem de hepatosellüler kanserde hücre proliferasyonunu ve agresifliğini arttırdığı tespit edilmiştir. AMPK inhibisyonu ise genel olarak anti-tümör etkiler göstermiştir. Bunun bir istinası ise hepatosellüler kanser hücrelerinin düşük dozda AMPK inhibisyonuna artmış proliferasyon yanıtı vermesidir. Bu bulgular, kanser heterojenitesine dikkat çekmekte ve dolayısıyla kanser metabolizmasını hedef alan anti-kanser tedavi stratejilerinin farklı kanserlerde dikkatle uygulanması gerekliliğinin altını çizmektedir. Ayrıca kanser tedavisinde AMPK modülasyonunun anti-tümör immün yanıtlar üzerinde kritik bir regülasyon potansiyeli olduğu da unutulmamalıdır. Bu bağlamda bu çalışma ile AMPK'a yönelik terapötik stratejilerin belirlenebilmesine katkı sağlanmıştır. Daha sonra yapılacak çalışmalarda AMPK modülasyonunun in vivo etkilerinin değerlendirilmesi, bu çalışmanın sonuçlarına değer katabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Russo GL, Russo M, Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *Biochemical pharmacology*. 2013;86(3):339-50. doi: 10.1016/j.bcp.2013.05.023. PubMed PMID: 23747347.
2. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):251-62. doi: 10.1038/nrm3311. PubMed PMID: 22436748.
3. Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *The FEBS journal*. 2016;283(16):2987-3001. doi: 10.1111/febs.13698. PubMed PMID: 26934201; PubMed Central PMCID: PMC4995730.
4. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011;13(9):1016-23. doi: 10.1038/ncb2329. PubMed PMID: 21892142; PubMed Central PMCID: PMC3249400.
5. Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol*. 1996;270(2 Pt 1):E299-304. PubMed PMID: 8779952.
6. Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, Richter EA, Kiens B. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2000;528 Pt 1:221-6. PubMed PMID: 11018120; PubMed Central PMCID: PMC32270117.
7. Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*. 2003;52(9):2205-12. PubMed PMID: 12941758.

8. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* 1995;229(2):558-65. PubMed PMID: 7744080.
9. Shearer J, Fueger PT, Vorndick B, Bracy DP, Rottman JN, Clanton JA, et al. AMP kinase-induced skeletal muscle glucose but not long-chain fatty acid uptake is dependent on nitric oxide. *Diabetes.* 2004;53(6):1429-35. PubMed PMID: 15161745.
10. Shearer J, Fueger PT, Rottman JN, Bracy DP, Binas B, Wasserman DH. Heart-type fatty acid-binding protein reciprocally regulates glucose and fatty acid utilization during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(2):E292-7. doi: 10.1152/ajpendo.00287.2004. PubMed PMID: 15454399.
11. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P, Foulfelle F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(24):14767-71. PubMed PMID: 9614076.
12. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8(11):1288-95. doi: 10.1038/nm788. PubMed PMID: 12368907.
13. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16309-13. doi: 10.1073/pnas.222657499. PubMed PMID: 12456889; PubMed Central PMCID: PMC138607.
14. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation.* 2001;103(8):1057-63. PubMed PMID: 11222466.
15. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2009;89(3):1025-78. doi: 10.1152/physrev.00011.2008. PubMed PMID: 19584320.
16. White A, Mancini S, Cat A, Montezano A, Salt I, Toyuz R. AMPK activators modulate pro-inflammatory responses in human adipocytes. In: McCabe C, editor. Society for Endocrinology BES 2015; 02 November 2015 - 04 November 2015; Edinburgh, UK2015.
17. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, et al. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science.* 2009;326(5951):437-40. doi: 10.1126/science.1172156. PubMed PMID: 19833968; PubMed Central PMCID: PMC2819106.
18. Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, et al. AMPK inhibition in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45(4):276-95. Epub 2010/06/05. doi: 10.3109/10409238.2010.488215. PubMed PMID: 20522000; PubMed Central PMCID: PMC3132561.
19. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol.* 2008;181(12):8633-41. Epub 2008/12/04. PubMed PMID: 19050283; PubMed Central PMCID: PMC2756051.
20. Blagih J, Coulombe F, Vincent Emma E, Dupuy F, Galicia-Vázquez G, Yurchenko E, et al. The Energy Sensor AMPK Regulates T Cell Metabolic Adaptation and Effector Responses In Vivo. *Immunity.* 2015;42(1):41-54. doi: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.030.
21. Li W, Saud SM, Young MR, Chen G, Hua B. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget.* 2015;6(10):7365-78. Epub 2015/03/27. doi: 10.18632/oncotarget.3629. PubMed PMID: 25812084; PubMed Central PMCID: PMC4480686.
22. Faubert B, Vincent EE, Poffenberger MC, Jones RG. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: many faces of a metabolic regulator. *Cancer letters.* 2015;356(2 Pt A):165-70. doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.018. PubMed PMID: 24486219.
23. O'Rourke RW. Obesity and cancer: at the crossroads of cellular metabolism and proliferation. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery.* 2014;10(6):1208-19. doi: 10.1016/j.soard.2014.08.012. PubMed PMID: 25264328; PubMed Central PMCID: PMC4267907.
24. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):563-75. doi: 10.1038/nrc2676. PubMed PMID: 19629071; PubMed Central PMCID: PMC2756045.
25. Turker Sener L, Albeniz G, Dinc B, Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med.* 2017;14(3):1866-70. Epub 2017/10/01. doi: 10.3892/etm.2017.4781. PubMed PMID: 28962095; PubMed Central PMCID: PMC5609197.
26. Garcia SN, Gutierrez L, McNulty A. Real-time cellular analysis as a novel approach for in vitro cytotoxicity testing of medical device extracts. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101(7):2097-106. Epub 2013/02/16. doi: 10.1002/jbm.a.34507. PubMed PMID: 23412941.
27. Hadad SM, Hardie DG, Appleyard V, Thompson AM. Effects of metformin on breast cancer cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico.* 2014;16(8):746-52. doi: 10.1007/s12094-013-1144-8. PubMed PMID: 24338509.
28. Bhaw-Luximon A, Jhurry D. Metformin in pancreatic cancer treatment: from clinical trials through basic research to biomarker quantification. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2016;142(10):2159-71. doi: 10.1007/s00432-016-2178-4. PubMed PMID: 27160287.
29. Jhaveri TZ, Woo J, Shang X, Park BH, Gabrielson E. AMP-activated kinase (AMPK) regulates activity of HER2 and EGFR in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(17):14754-65. doi: 10.18632/oncotarget.4474. PubMed PMID: 26143491; PubMed Central PMCID: PMC4558113.
30. Monteverde T, Muthalagu N, Port J, Murphy DJ. Evidence of cancer-promoting roles for AMPK and related kinases. *The FEBS journal.* 2015;282(24):4658-71. doi: 10.1111/febs.13534. PubMed PMID: 26426570.
31. Li C, Liu VW, Chiu PM, Chan DW, Ngan HY. Over-expressions of AMPK subunits in ovarian carcinomas with significant clinical impli-

- cations. *BMC cancer*. 2012;12:357. doi: 10.1186/1471-2407-12-357. PubMed PMID: 22897928; PubMed Central PMCID: PMC3518102.
- 32.** Chen CL, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, et al. NANOg Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell metabolism*. 2016;23(1):206-19. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.004. PubMed PMID: 26724859; PubMed Central PMCID: PMC4715587.
- 33.** Jeon SM, Hay N. The double-edged sword of AMPK signaling in cancer and its therapeutic implications. *Archives of pharmacol research*. 2015;38(3):346-57. doi: 10.1007/s12272-015-0549-z. PubMed PMID: 25575627.
- 34.** Jeon SM, Hay N. The dark face of AMPK as an essential tumor promoter. *Cellular logistics*. 2012;2(4):197-202. doi: 10.4161/cl.22651. PubMed PMID: 23676995; PubMed Central PMCID: PMC3607621.
- 35.** Hardie DG. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Current opinion in cell biology*. 2015;33:1-7. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.004. PubMed PMID: 25259783.
- 36.** Bonini MG, Gantner BN. The multifaceted activities of AMPK in tumor progression--why the "one size fits all" definition does not fit at all? *IUBMB life*. 2013;65(11):889-96. doi: 10.1002/iub.1213. PubMed PMID: 24265196.
- 37.** Laderoute KR, Calaoagan JM, Chao WR, Dinh D, Denko N, Duellman S, et al. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) supports the growth of aggressive experimental human breast cancer tumors. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(33):22850-64. doi: 10.1074/jbc.M114.576371. PubMed PMID: 24993821; PubMed Central PMCID: PMC4132788.
- 38.** El-Masry OS, Brown BL, Dobson PR. Effects of activation of AMPK on human breast cancer cell lines with different genetic backgrounds. *Oncology letters*. 2012;3(1):224-8. doi: 10.3892/ol.2011.458. PubMed PMID: 22740885; PubMed Central PMCID: PMC3362498.
- 39.** Bai A, Ma AG, Yong M, Weiss CR, Ma Y, Guan Q, et al. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis. *Biochemical pharmacology*. 2010;80(11):1708-17. Epub 2010/08/28. doi: 10.1016/j.bcp.2010.08.009. PubMed PMID: 20797389.
- 40.** Prantner D, Perkins DJ, Vogel SN. AMP-activated Kinase (AMPK) Promotes Innate Immunity and Antiviral Defense through Modulation of Stimulator of Interferon Genes (STING) Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(1):292-304. doi: 10.1074/jbc.M116.763268.