ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TEMEL TIP BİLİMLERİ / BASİC SCIENCES

DOI: 10.4274/atfm.galenos.2019.40316
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2019;72(1):39-48

Meme Kanseri ve Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde Serum Starvasyonu ve Hipoksik Ortam Koşullarının Metabolik Yolak Protein Ekspresyonlarına Etkisinin İncelenmesi

Evaluation of the Effects of Serum Starvation and Hypoxic Conditions on Metabolic Pathway Protein Expressions in Breast and Hepatocellular Cancers

Gürcan Günaydın, Mustafa Emre Gedik

Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Adenozin monofosfat (AMP) aktive edici protein kinaz (AMPK), hücrenin çeşitli metabolik stres durumlarında aktive olarak hücredeki enerji homeostazını sağlayan önemli bir serin/treonin protein kinazdır. Besin azlığı ve hipoksi gibi stres koşullarında organizmadaki enerji miktarının düşük olduğu veya enerji tüketiminin yüksek olduğu durumlarda hücresel AMP miktarı artmakta ve AMPK aktivasyonu ile birlikte yağ asidi oksidasyonu ve glikolizis gibi katabolik reaksiyonlar indüklenmektedir. Kanser hücrelerinin tümör mikro çevresinde en çok maruz kaldığı durumların oksijen ve besin yetersizliği olduğu raporlanmıştır. Bu çalışmada, kanser hücrelerinin çeşitli stres koşullarında AMPK regülasyonu sayesinde bu stres koşullarına karşı geliştirdiği epitelyal-mezenkimal-dönüşüm epitelial mezenkimal geçiş ve metastaz gibi adaptasyon mekanizmaları ile sağkalım avantajı sağlamasının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Meme kanseri (SKBR-3, MDA-MB-453) ve hepatosellüler karsinom (HepG2, Huh-7) hücre hatlarının serum starvasyon koşulunda p-AMPK, total AMPK; hipoksik ortam koşullarında HIF-1α, E-kadherin, p-AMPK ve total AMPK ekspresyonları Western-blot yöntemi ile tespit edilmiştir. Stres koşullarının kanser hücrelerinde metabolik yolak ve invazyonla ilişkili protein regülasyonlarına etkisi incelenmiştir. Bu sayede, *in vivo* tümör mikroçevresi stres koşullarının simülasyonu aracılığıyla bu stres faktörlerinin *in vitro* deneysel koşullardaki etkileri araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmadan elde edilen bulgular, starvasyon ve hipoksi koşullarının hem kanser hücresi metabolik regülasyonu hem de tümör progresyonu üzerinde belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı etki yaratabileceğini göstermektedir. AMPK gen ekspresyonu yüksek olan hücrelerde (Huh7, SKBR-3), hücresel stres ile birlikte AMPK'nin regüle olduğu ve bu regülasyonun hücreye adaptasyon avantajı sağladı sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları, kanser hücre stres mekanizmalarına ve AMPK'ye yönelik terapötik stratejilerin belirlenebilmesine katkı sağlamakta ve ileride yapılacak *in vivo* araştırmalar için temel oluşturarak literatüre katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ampk, Hipoksi, Hücresel Stres, Kanser Metabolizması, Tümör Immünolojisi

Abstract

Objectives: Adenosine monophosphate (AMP) activating-protein-kinase (AMPK) is a crucial serine/threonine protein kinase that is activated in cellular metabolic stress conditions to maintain cellular energy-homeostasis. Under conditions of stress such as starvation and hypoxia, when the amount of energy in the organism is low or energy consumption is increased, the amount of cellular AMP increases and catabolic reactions such as fatty acid oxidation and glycolysis are induced due to AMPK activation. The most common conditions that cancer cells face in tumor-microenvironment were reported to be nutrient deficiency and lack of oxygen. This study aims to investigate whether cancer cells bear survival advantages with mechanisms of adaptation such as epithelial-mesenchymal-transition and metastasis by the regulation of AMPK under various stress conditions.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Gürcan Günaydın
Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Tel.: +90 536 886 41 42 E-posta: gurcangunaydin@hacettepe.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-6751-2217

Geliş Tarihi/Received: 28.01.2019 **Kabul Tarihi/Accepted:** 12.04.2019

©Telif Hakkı 2019 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.

Materials and Methods: p-AMPK, total-AMPK protein expression levels of breast (SKBR-3, MDA-MB-453) and hepatocellular cancer (HepG2, Huh-7) cell lines under conditions of serum starvation were determined by Western-blot method. In addition, HIF-1α, E-cadherin, p-AMPK and total-AMPK protein expression levels under conditions of hypoxia were also determined by Western-blot method. The effects of stress conditions on regulation of proteins associated with metabolic pathway and invasion in cancer cells were investigated. As a result, the *in vitro* effects of stress factors which are observed in tumor-microenvironment *in vivo* were experimentally investigated by this simulation approach.

Results: Our findings demonstrate that conditions of starvation and hypoxia may show prominent and statistically significant effects on both cancer cell metabolic regulation and tumor progression. AMPK was shown to be regulated as a result of cellular stress in cancer cells (Huh7, SKBR3) with high AMPK gene expression. Such a regulation seems to provide an adaptive advantage to those cells.

Conclusion: Our results will contribute to determining therapeutic strategies targeting cancer cell stress mechanisms and AMPK. In addition, the results will pave the way for future *in vivo* studies; thus, will contribute to the literature.

Key Words: AMPK, Hypoxia, Cellular Stress, Cancer Metabolism, Tumor Immunology

Giriş

Anabolik biyokimyasal reaksiyonlar, hücrede en fazla enerji tüketen mekanizmalardır. Protein sentezi, hücrede başlıca enerji kaybı nedenidir. Besin ve oksijen azlığı gibi olumsuz koşullar altında hücrenin hayatta kalabilmesi için yüksek seviyedeki bu tüketimin sınırlandırılması ve enerji kaybını en aza indirilmesi gereklidir (1-3). Adenozin monofosfat (AMP), aktive edici protein kinaz (AMPK), hücrenin birçok metabolik stres durumlarında aktive olarak hücredeki enerji homeostazını düzenleyen kritik bir serin/treonin protein kinazdır (4). Bu protein kinaz, enerji homeostazını sağlayan bir besin ve enerji sensörü niteliğine sahiptir (5). Hücre içinde enerji seviyesi azaldığında aktive olarak ATP üretimini arttırır. Besin azlığı ve hipoksik mikroçevre gibi stres koşullarında, organizmadaki enerji miktarının düşük olduğu veya enerji tüketiminin artrmış olduğu durumlarda hücresel AMP miktarı artmaktadır. Artan AMP aracılı AMPK aktivasyonu ile birlikte yağ asidi oksidasyonu ve glikolizis gibi katabolik reaksiyonlar indüklenmektedir. Bunun sonucu olarak da başlıca protein, yağ asidi ve kolesterol sentezi gibi anabolik reaksiyonlar baskılanmaktadır (6-8). Böylece, hücresel büyüme sinyalinin blokasyonu ve translasyonel uzamanın durdurulması sağlanmakta ve de hücrenin enerji depolaması sağlanmaktadır. AMPK'nin baskılanması sonucu direnç mekanizmalarının kırılması aracılığıyla kanser hücrelerinin ilaca karşı duyarlı hale gelebildiği rapor edilmiştir (9).

Oksijen azlığının yaşandığı durumlarda, hücrenin strese girmesiyle birlikte endoplazmik retikulumda (ER) katlanmayan protein miktarı artmaktadır (10). ER'de oluşan bu stres durumunun kontrol altına alınabilmesi amacıyla, protein sentezi inhibe olmakta ve şaperonların ekspresyonlarıyla birlikte katlanmayan protein miktarı kontrol altına alınmaktadır (11). AMPK, bu aşamada önemli bir regülatuvar protein görevi görmektedir. Protein sentezi aşamasının baskılanabilmesi amacıyla AMPK aktive olmaktadır (12). Starvasyon ve yüksek karbonhidrat diyeti durumları sonrasında yapılan egzersizlerin kaslardaki etkisinin incelendiği bir çalışmada, starvasyon koşulunda yağ asidi oksidasyonunun arttığı ve kaslardaki protein degredasyonunun karbonhidratlı diyet sonrası yapılan egzersiz koşuluna oranla arttığı belirtilmektedir (13). Hipoksik koşul, düşük pH, DNA hasarı ve starvasyon gibi stres koşullarının yanı sıra düşük sıcaklık durumunda da diğer stres koşullarına benzer olarak, hücre içi ER stresinin indüklediği Ca^{+2} iyon salınımı artmakta, ve AMPK aracılı protein sentezi baskılanmaktadır (14). Glukoz bağlanma afinitesinde ve glukoz parçalanmasındaki artış, buna bağlı olarak oksidatif fosforilasyonun azalması, hipoksik (oksijen azlığı) alanların artışı, çevresel asidoz, proteotoksik düzeyin artışı, metabolik ve oksidatif düzenin değişmesi gibi metabolik farklılıklar, kanser hücrelerinin sağkalımı için gerek duyduğu önemli adaptif değişikliklerdir (11,15,16). Hücrenin çoğalması için gerek duyduğu enerjinin var olmadığı veya hipoksik ortam koşulları gibi hücresel stresin olduğu durumlarda, hücrenin metabolik faaliyetlerinin yavaşladığı belirtilmektedir (2,16). Bu sayede, kanser hücresinin anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal dönüşüm, invazyon ve metastaz gibi adaptasyon mekanizmaları ile sağkalım avantajı sağladığı öne sürülmektedir (17,18).

Pirkmajer ve Chibalin'in yapmış oldukları çalışmada (19), sirkadyen ritim, endokrinoloji ve metabolik çalışmalar gibi moleküler teknik uygulamalarında, hücrelerin bazal hücresel aktivitesini azaltabilmek ve hücre döngüsünü G_0 fazına sokabilmek amacıyla sıklıkla kullanılan serum stravasyon aşamasının, hücrenin fenotipik karakteri ve metabolik yolak aktivasyon düzeyi başta olmak üzere birçok stimulusunu değiştirdiğini göstermektedirler.

Bu çalışma ile meme kanseri (SKBR-3, MDA-MB-453) ve hepatosellüler karsinom (HepG2, Huh-7) hücre dizilerinin serum starvasyon koşulunda p-AMPK, total AMPK, hipoksik ortam koşullarında HIF-1α, E-kadherin, p-AMPK ve total AMPK protein ekspresyonları tespit edilmiştir. Bu amaçla belirtilen hücreler, serum starvasyonu (serumsuz besiyeri ortamı) ve hipoksik (hipoksi çemberi) stres koşullarına maruz bırakılmıştır. Bu uygulamalar sonucunda elde edilen protein lizatları ile hedef proteinlerin ekspresyonları Western blot yöntemi ile tespit edilmiştir ve elde edilen sonuçlar kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, *in vivo* tümörler ile ilişkili stres koşullarının kanser hücre dizilerinin

metabolik yolak ve invazyonla ilişkili protein regülasyonlarına etkisi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışma kapsamında kullanılan meme kanseri (SKBR-3, MDA-MB-453) ve hepatosellüler kanser (HepG2, Huh-7) 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 RPMI-1640 (MDA-MB-453, HepG2) ve DMEM (SKBR-3, Huh-7) besiyerinde çoğaltılarak CO_2'li etüvde 37 ^oC'da inkübe edilmiştir.

Hipoksik ve Normoksik Ortam Koşullarının Simülasyonu

Hücre dizileri üzerinde normoksik ve hipoksik koşullar altında oluşacak etkileri belirlemek amacıyla hücreler normal inkübasyon koşullarında (%21 O_2, %5 CO_2 ve %74 N_2) veya hipoksik (%5 O_2, %5 CO_2 ve %90 N_2) ortam koşulları altında 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Hipoksik ortam koşulları, "hipoksi chamber" (Billups Rothenberg, Inc.) içerisinde gerçekleştirilmiştir (20). Kısaca, hücre kültürü plaklarına hücrelerin eklenmesinden sonra hazırlanmış olan plateler, "hipoksi chamber"ı içerisine konulmuştur. Devamında, "hipoksi chamber"ının kelepçesi aracılığıyla kapak hava sızdırmaz şekilde sıkıştırılmıştır. Daha sonra, (%5 O_2, %5 CO_2, %90 N_2) gaz karışımı 20 L/dk miktarında 5 dakika süreyle "hipoksi chamber" içerisine doldurulmuştur. Bu aşamadan sonra "hipoksi chamber", 37 ^oC etüvde inkübe edilmiştir. Hücre plakları ortamında bulunan oksijen miktarının kesin eliminasyonu amacıyla deneyin başlangıcından 1 saat sonra "hipoksi chamber" içerisine tekrardan aynı gaz karışımı verilmiştir. Bu sayede, *in vivo* tümör mikroçevresinin karakteristik özelliklerinden olan hipoksinin, *in vitro* olarak simüle edilmesi sağlanmıştır.

Protein Lizatlarının Elde Edilmesi & Protein Kantitasyonu

Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması aşamasından sonra 6 kuyulu plakların her birine $2x10^5$-$1x10^6$ hücre eklenmiştir. Hücrelerin kuyu zeminlerine tutunması için 37 ^oC'de %5 CO_2'li etüvde 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Yirmi dört saat sonra kuyu içerisinde bulunan tam besiyerleri çekilmiştir. Bu aşamadan sonra, serum starvasyonu koşulu uygulanacak grup için serumsuz besiyeri eklenmiştir. Kontrol ve hipoksi grupları için ise tam besiyeri eklenmiştir. Serum starvasyon işlemi 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sürelerince ayrı ayrı uygulanmıştır. Diğer stres koşulu için bu aşamadan sonra, "hipoksi chamber" içerisinde hipoksik ortam inkübasyonu 24 saatlik süre boyunca gerçekleştirilmiştir. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonunda, besiyerleri çekilmiştir. Daha sonra, lizis tamponu ile plak içerisinde bulunan hücreler lizis edilmiştir ve hücre lizatları elde edilmiştir. Western- blot deneyinde kullanılacak olan protein lizatlarının, protein miktarlarının tespiti amacıyla protein kantitasyonu yapılmıştır. Protein kantitasyonundan sonra lizatlar 95 ^oC'ye getirilmiş olan kuru ısıtma bloğu içerisinde 5 dakika bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Her koşul için deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

Western Blot

Western blot yöntemi kullanılarak, uygulanan stres koşullarında insan meme kanseri ve hepatosellüler karsinom hücrelerinde p-AMPK, AMPK, HIF-1α ve E-kadherin protein ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Kısaca, protein denatürasyonu aşamasından sonra, lizat içerisinde bulunan farklı ağırlığa (kDa) sahip proteinlerin SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile yürütülerek ayrışması sağlanmıştır. Bu aşama tamamlandıktan sonra, jel içerisinde ağırlıklarına göre ayrışan proteinlerin, jelden PVDF membrana transferi sağlanmıştır. Transfer aşamasından sonra membranın, %5 BSA TBST solüsyonu içerisinde blokasyonu gerçekleştirilmiştir. Blokasyon işlemi bittikten sonra 1xPBS-T ile membran yıkanmıştır. Bu sayede BSA kalıntıları membran yüzeyinden temizlenmiştir. Bu işlemden sonra membran, primer antikor ile muamele edilmiştir. Denatüre olmuş proteinlerin tek bir determinantını yüksek afinite ve özgüllükte tanıyan monoklonal antikorlar, hedeflediğimiz proteinlerin tayini için kullanılmıştır. Kontrol proteini olarak β-aktin ve GAPDH kullanılmıştır. Primer antikor inkübasyonundan sonra primer antikorun görüntülenebilmesi için Horseradish Peroksidaz (HRP) konjuge primer antikorun üretildiği organizmaya karşı üretilmiş sekonder antikor ile inkübasyon aşamasına geçilmiştir. Son olarak sekonder antikorun bağlanmış olduğu proteinlerin kemiluminesans ışıma yapabilmesi için, sekonder antikora konjuge HRP'de bulunan peroksidaz enziminin substratı olan luminol içeren Enhanced chemiluminescence (ECL) solüsyonu kullanılmıştır ve kemilüminesans görüntüleme ile elde edilen bantların dansitometrik yoğunlukları tespit edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin analizi için "IBM SPSS Statistics 23" programı kullanılmıştır. İstatistiksel analiz amacıyla "Student's t-test" uygulanmıştır. Yapılan testin sonucunda $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde Serum Starvasyonu Sonucu Oluşturulan Hücresel Stresin AMPK Regülasyonuna Etkisi

Hücrelerin 6 kuyulu plaklara ekimi sonrası, tüm hücrelerin kuyu tabanına tutunmaları ve adaptasyonu için 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Devamında, serum starvasyonu uygulaması için hücrelere serumsuz besiyeri ile 1, 3, 6, 12

ve 24 saatlik inkübasyonlar ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Kontrol hücrelerinin, serumlu tam besiyeri ile inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

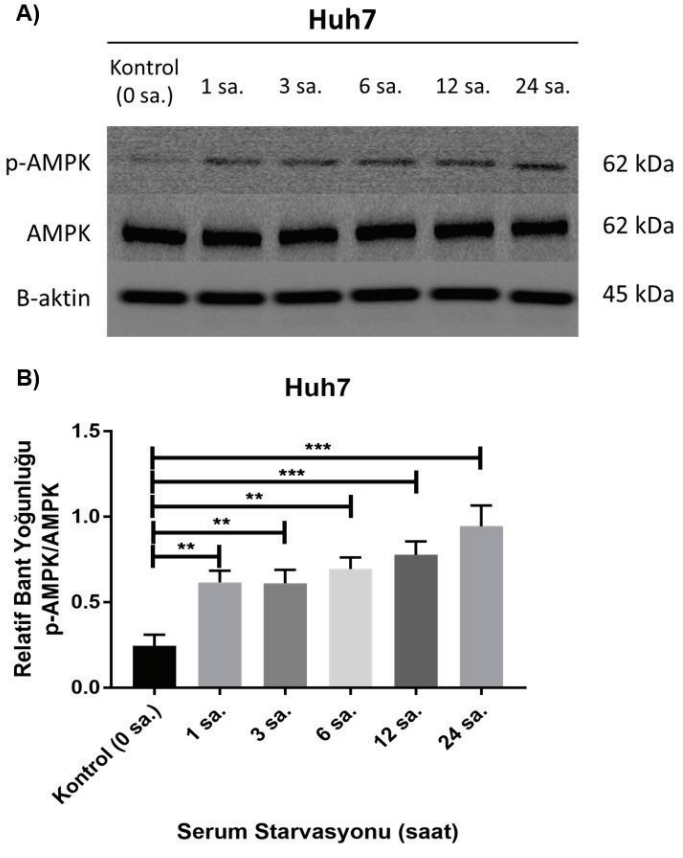
Huh7 ve HepG2 hepatosellüler karsinom hücre dizilerine belirtilen saatler süresince serum starvasyonu uygulaması gerçekleştirildikten sonra farklı saatlerde serum starvasyonuna maruz kalan hücrelerden elde edilen protein lizatlarında total AMPK ve p-AMPK protein düzeyleri incelenmiştir. Kontrol proteini olarak β-aktin kullanılmıştır.

Serum starvasyonu sonucu oluşturulan hücresel stres sebebiyle, Huh7 hücrelerinin AMPK fosforilasyonu zamana bağlı olarak artmaktadır (Şekil 1A). Artan sürelerde uygulanan serum starvasyonu sonucu fosfo-AMPK (p-AMPK) düzeyi kontrol hücre grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 1B). HepG2 hücre dizisi kontrol grubu ile serum starvasyonu uygulanan gruplar karşılaştırıldığında 1. ve 3. saatlerde kademeli olarak fosfo-AMPK düzeyinde artış olduğu, fakat bu regülasyonun 6. saatten itibaren bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 2A). HepG2 hücrelerinde görülen fosfo-AMPK düzeylerindeki değişiklikler, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 2B).

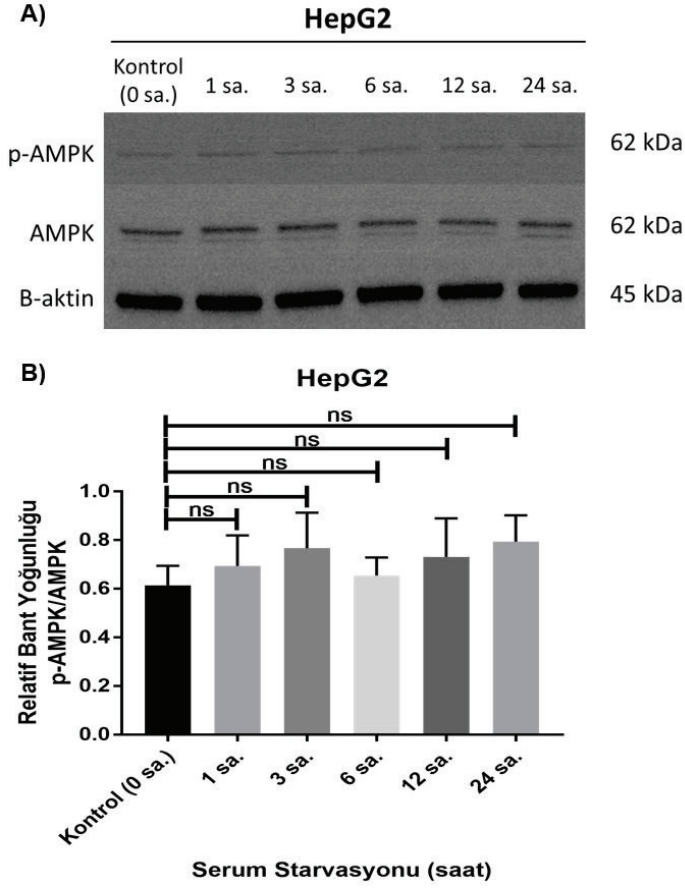
Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Serum Starvasyonu Sonucu Oluşturulan Hücresel Stresin AMPK Regülasyonuna Etkisi

MDA-MB-453 ve SKBR-3 meme kanseri hücre dizilerine belirtilen saatler süresince serum starvasyonu uygulaması gerçekleştirilmiştir. Farklı saatlerde serum starvasyonuna maruz kalan hücrelerden elde edilen protein lizatlarında AMPK ve p-AMPK protein düzeyleri incelenmiştir.

Serum starvasyonu sonucu oluşturulan hücresel stres sebebiyle, MDA-MB-453 hücrelerinin AMPK fosforilasyonunun 3. ve 12. saatlerde kontrol grubuna oranla arttığı, diğer saatlerde ise kontrol grubu düzeylerinde olduğu görülmektedir (Şekil 3A). Ancak bu regülasyonun, kontrol hücre grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (Şekil 3B).



Şekil 1: Huh7 hepatosellüler karsinom hücre dizisinde serum starvasyonu sonucu oluşturulan hücresel stresin AMPK regülasyonuna etkisi. A) 0, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlik serum starvasyonu uygulanmış Huh7 hücrelerinin p-AMPK (fosfo-AMPK), AMPK ve β-aktin proteinleri bant görüntüleri. B) Huh7 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi **: p<0,01, ***: p<0,001



Şekil 2: HepG2 hepatosellüler karsinom hücre dizisinde serum starvasyonu sonucu oluşturulan hücresel stresin AMPK regülasyonuna etkisi. A) 0, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlik serum starvasyonu uygulanmış HepG2 hücrelerinin p-AMPK, AMPK ve β-aktin proteinleri bant görüntüleri. B) HepG2 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi. n.s.: istatistiksel olarak anlamlı değil

SKBR-3 hücre dizisinde ise, kontrol grubu ile serum starvasyonu uygulanan gruplar karşılaştırıldığında zamana bağlı olarak fosfo-AMPK düzeyinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4A ve 4B).

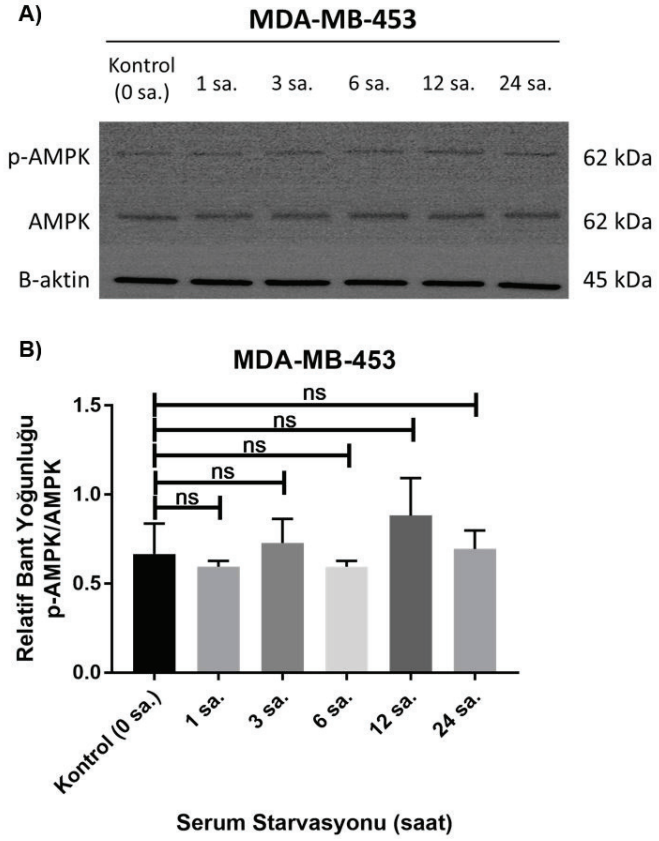
Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde Hipoksik Ortam Aracılı Oluşturulan Hücresel Stresin AMPK ve Yolak Proteinleri Regülasyonlarına Etkisi

Hücrelerin 6 kuyulu plaklara ekimi sonrası, tüm hücrelerin kuyu tabanına tutunmaları ve adaptasyonu için 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Devamında, hücre plakları "hiposki chamber" içerisine konulmuştur. Ortamı düşük oksijen düzeyine getirmek (hipoksik) amacıyla, "hiposki chamber" içerisine 4 dakika süresince (%5 O_2, %5 CO_2, %94 N_2) gaz dolumu yapılmıştır. Devamında, hücreler 24 saat süresince "hiposki chamber" içerisinde (etüv içinde) inkübe edilmiştir. Kontrol hücreleri ise aynı etüv içerisinde "hiposki chamber" dışında normoksik (%21 O_2, %5 CO_2, %74 N_2) ortamda inkübe edilmiştir.

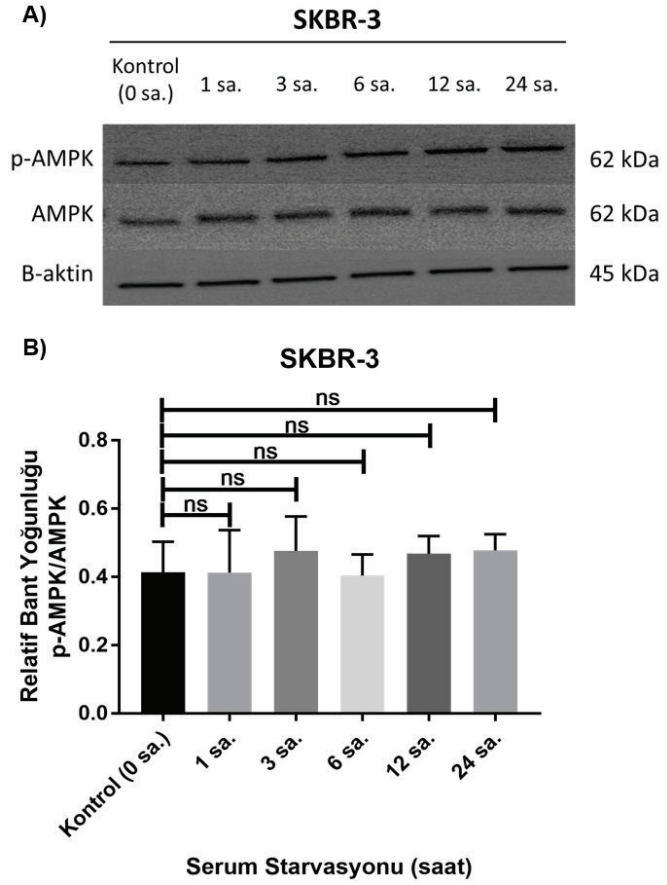
Huh7 ve HepG2 hepatosellüler karsinom hücre dizilerinin 24 saat hipoksik ortamda inkübasyonu sonucu elde edilen protein lizatlarında AMPK ve p-AMPK protein düzeyleri incelenmiştir. Kontrol grubu proteini olarak GAPDH kullanılmıştır.

Hipoksik ortam sonucu oluşturulan hücresel stres sebebiyle, Huh7 hücrelerinde AMPK fosforilasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 5A). Normoksik ortamdaki hücre grubu ile hipoksik ortamdaki hücre grubu karşılaştırıldığında fosfo-AMPK düzeyi hipoksik ortamda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 5B). Hipoksik ortam koşulunda normoksik ortam koşuluna oranla HIF-1α protein ekspresyonu artmaktadır (Şekil 5A). Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 5C). Elde edilen veriler sonucu, ortamda oksijen düzeyindeki hassas değişikliğin Huh7 hücrelerinde AMPK regülasyonunu etkilediği görülmektedir. Ek olarak, bu hassas değişim sonucunda E-kadherin protein ekspresyonu hipoksik ortam koşulunda azalmaktadır (Şekil 5A). E-kadherin protein ekspresyonundaki bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5D).

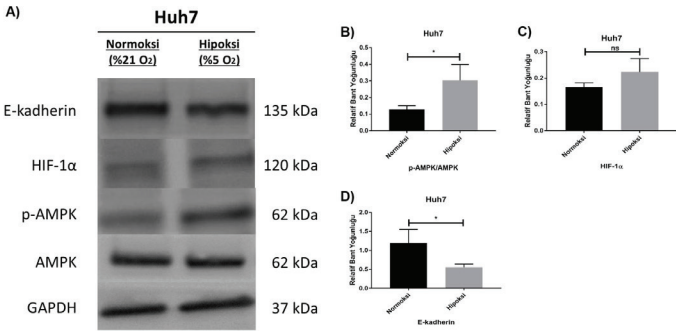
HepG2 hücre dizisinde ise, hipoksik ortamda AMPK fosforilasyonunun arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak



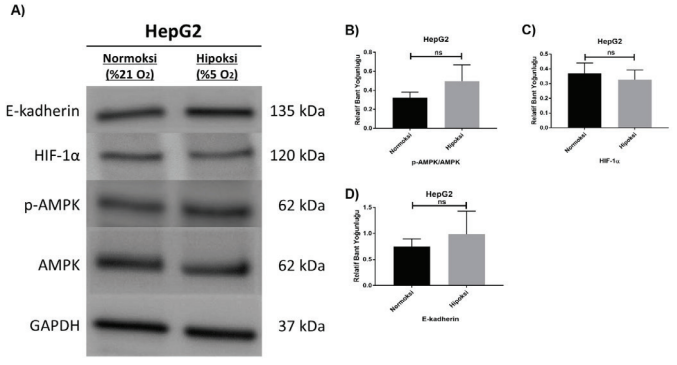
Şekil 3: MDA-MB-453 meme kanseri hücre dizisinde serum starvasyonu sonucu oluşturulan hücresel stresin AMPK regülasyonuna etkisi. A) 0, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlik serum starvasyonu uygulanmış MDA-MB-453 hücrelerinin p-AMPK, AMPK ve β-aktin proteinleri bant görüntüleri. B) MDA-MB-453 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi. n.s.: istatistiksel olarak anlamlı değil



Şekil 4: SKBR-3 meme kanseri hücre dizisinde serum starvasyonu sonucu oluşturulan hücresel stresin AMPK regülasyonuna etkisi. A) 0, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatlik serum starvasyonu uygulanmış SKBR-3 hücrelerinin p-AMPK, AMPK ve β-aktin proteinleri bant görüntüleri. B) SKBR-3 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi. n.s.: istatistiksel olarak anlamlı değil



Şekil 5: Huh7 hepatosellüler karsinom hücre dizisinde hipoksik ortam aracılı oluşturulan hücresel stresin AMPK ve yolak proteinleri regülasyonlarına etkisi. A) 24 saatlik hipoksik ortam inkübasyonu sonucu Huh7 hücrelerinin E-kadherin, HIF-1α, p-AMPK, AMPK ve GAPDH proteinleri bant görüntüleri. B) Huh7 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi. C) Huh7 hücrelerinin normalize edilmiş HIF-1α protein yoğunluğu analizi. D) Huh7 hücrelerinin normalize edilmiş E-kadherin protein yoğunluğu analizi. *:p<0,05, n.s.: istatistiksel olarak anlamlı değil

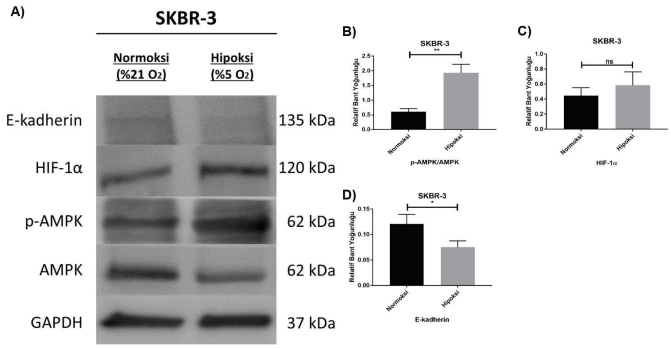


Şekil 6: HepG2 hepatosellüler karsinom hücre dizisinde hipoksik ortam aracılı oluşturulan hücresel stresin AMPK ve yolak proteinleri regülasyonlarına etkisi. A) 24 saatlik hipoksik ortam inkübasyonu sonucu HepG2 hücrelerinin E-kadherin, HIF-1α, p-AMPK, AMPK ve GAPDH proteinleri bant görüntüleri. B) HepG2 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi. C) HepG2 hücrelerinin normalize edilmiş HIF-1α protein yoğunluğu analizi. D) HepG2 hücrelerinin normalize edilmiş E-kadherin protein yoğunluğu analizi. n.s.: istatistiksel olarak anlamlı değil

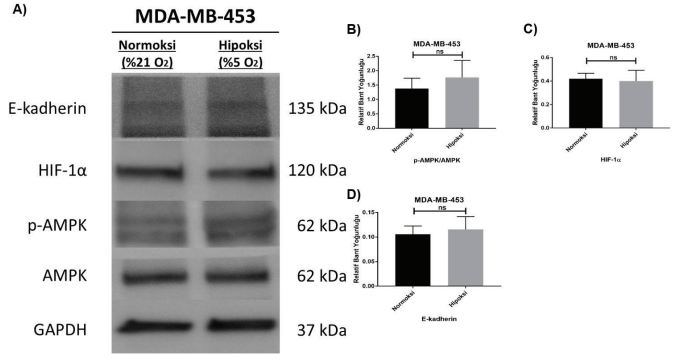
anlamlı olmadığı görülmektedir (Şekil 6A ve 6B). HIF-1α protein ekspresyonunun HepG2 hücrelerinde değişmediği ve E-kadherin protein ekspresyonunun ise bir miktar artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 6A). Ancak, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 6C ve 6D).

Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Hipoksik Ortam Aracılı Oluşturulan Hücresel Stresin AMPK ve Yolak Proteinleri Regülasyonlarına Etkisi

Hipoksik ortam sonucu oluşturulan hücresel stres sebebiyle, SKBR-3 hücrelerinde AMPK fosforilasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 7A). Normoksik ortamdaki hücre grubu ile hipoksik ortamdaki hücre grubu karşılaştırıldığında fosfo-AMPK düzeyi hipoksik ortamda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde



Şekil 7: SKBR-3 meme kanseri hücre dizisinde hipoksik ortam aracılı oluşturulan hücresel stresin AMPK ve yolak proteinleri regülasyonlarına etkisi. A) 24 saatlik hipoksik ortam inkübasyonu sonucu SKBR-3 hücrelerinin E-kadherin, HIF-1α, p-AMPK, AMPK ve GAPDH proteinleri bant görüntüleri. B) SKBR-3 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi. C) SKBR-3 hücrelerinin normalize edilmiş HIF-1α protein yoğunluğu analizi. D) SKBR-3 hücrelerinin normalize edilmiş E-kadherin protein yoğunluğu analizi. **: p<0,01, *: p<0,05, n.s.: istatistiksel olarak anlamlı değil



Şekil 8: Meme kanseri hücre dizilerinde hipoksik ortam aracılı oluşturulan hücresel stresin AMPK ve yolak proteinleri regülasyonlarına etkisi. A) 24 saatlik hipoksik ortam inkübasyonu sonucu MDA-MB-453 hücrelerinin E-kadherin, HIF-1α, p-AMPK, AMPK ve GAPDH proteinleri bant görüntüleri. B) MDA-MB-453 hücrelerinin normalize edilmiş p-AMPK protein yoğunluğu analizi. C) MDA-MB-453 hücrelerinin normalize edilmiş HIF-1α protein yoğunluğu analizi. D) MDA-MB-453 hücrelerinin normalize edilmiş E-kadherin protein yoğunluğu analizi. n.s.: istatistiksel olarak anlamlı değil

artmıştır (Şekil 7B). Hipoksik ortam koşulunda normoksik ortam koşuluna oranla HIF-1α protein ekspresyonu artmaktadır (Şekil 7A). Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 7C). Aynı zamanda E-kadherin protein ekspresyonu hipoksik ortam koşulunda azalmaktadır (Şekil 7A). E-kadherin protein ekspresyonundaki bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7D).

MDA-MB-453 hücre dizisinde ise, hipoksik ortamda AMPK fosforilasyonunun arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir (Şekil 8A ve 8B). Hipoksik koşullar altında HIF-1α protein ekspresyonunun MDA-MB-453 hücrelerinde değişmediği ve E-kadherin protein ekspresyonunda

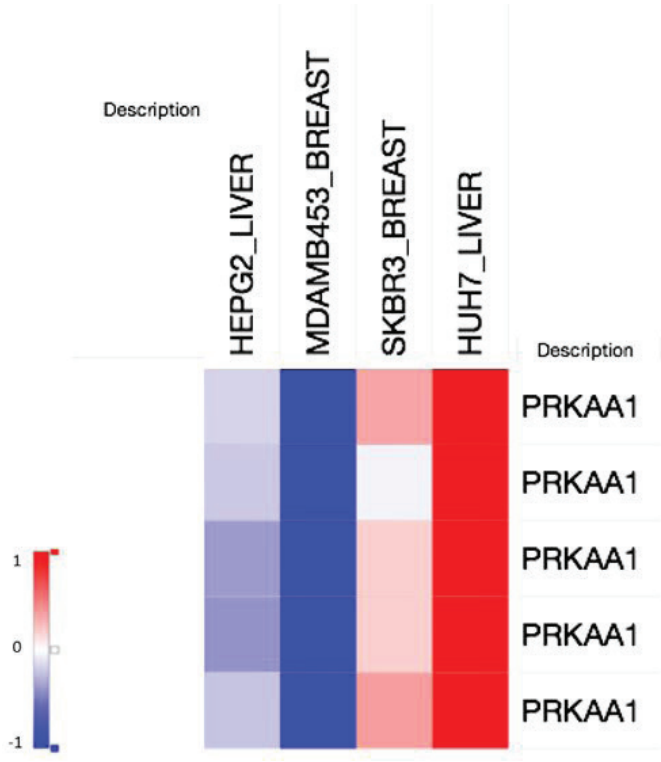
minimal bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 8A). Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 8C ve 8D).

Tartışma

Literatürde yer alan metabolizma çalışmalarında deneysel stres koşullarının metabolik aktivasyon mekanizmalarına yönelik etkileri net olarak bilinmemektedir. Bu çalışma ile meme kanseri ve hepatosellüler kanser hücre dizilerinde serum starvasyonu ve hipoksi koşullarının AMPK aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve literatürde eksik olan bu kısma katkı sağlanmıştır. Özellikle Western blot çalışmalarında deneysel çalışma öncesi flask içerisinde bulunan kümülatif hücrelerin protein ekspresyon düzeylerini stabilize ve senkronize etmek amacıyla sıklıkla uygulanan serum starvasyon basamağının, hücrenin metabolik regülasyonuna etkisi ilk defa incelenmiştir.

Kanser hücrelerindeki sinyal kaskadı; köken aldığı dokuya, hücredeki mutasyon veya gen ekspresyon paternine göre çeşitlilik gösterebilmektedir (21,22). AMPK başta olmak üzere çeşitli metabolik yolak proteinleri kanser hücrelerinde deregüle olmaktadır (23). Meme kanseri ve hepatosellüler kanser hücre dizileriyle gerçekleştirilen bu çalışmada, Huh-7 hepatosellüler karsinom hücrelerinin, farklı saatlerde uygulanan serum starvasyonu sonucu oluşan hücresel stresten belirgin düzeyde etkilenerek, AMPK protein ekpsreyonunu upregüle ettiği tespit edilmiştir. Bu durum, tahmin edilebileceği üzere Huh7 hücrelerinin starvasyona direnç amacıyla hücre içi enerji metabolizmalarını yeniden programlama kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, bir diğer hücresel stres koşulu olan düşük oksijen seviyesine (hipoksik ortam) 24 saat süre ile maruz kalan kanser hücreleri arasından hem Huh-7 hem de SKBR-3 hücrelerinde AMPK protein ekspresyonunun upregülasyonu gözlemlenmiştir. Cancer Cell Line Encylopedia (CCLE) veri tabanı aracılığıyla dört hücre dizisinin AMPK gen ekspresyonu karşılaştırıldığında, Huh-7 ve SKBR-3 hücre dizilerinin diğer kanser hücre dizilerine kıyasla bazal AMPK gen ekspresyon düzeyinin fazla olduğu görülmektedir (24) (Şekil 9). Bu durum, Huh-7 ve SKBR-3 hücre dizilerinde AMPK aracılı sinyal yolağı aktivasyonunun hücre proliferasyonu ve sağkalımında majör etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır (25,26). Bu nedenle, bizim sonuçlarımızda gördüğümüz üzere, hipoksinin fosfo-AMPK protein ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisinin başlıca Huh7 ve SKBR-3 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olması oldukça akla yatkındır.

Aynı zamanda, Huh-7 ve SKBR-3 hücrelerinde HIF-1α protein ekspresyonunun arttığı ve E-kadherin protein ekspresyonlarının da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir. Kanser hücrelerinde E-kadherin kaybının migrasyonu ve invazyonu arttırdığı rapor edilmiştir. Bu nedenle



Şekil 9: Cancer Cell Line Encylopedia (CCLE) veri tabanında HepG2, Huh-7, MDA-MB-453 ve SKBR-3 hücre dizileri AMPK gen (PRKAA1) ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. ["Sıcaklık haritası (Heatmap)"nda kırmızı renk yüksek ekspresyonu, mavi renk düşük ekspresyonu temsil etmektedir.]

E-kadherin kaybı, metastaz için potansiyel bir belirteç olarak öne sürülmektedir (27). Benzer şekilde, E-kadherin kaybının, epitelial mezenkimal geçişi (EMT) ile ilişkili olduğu da bilinmektedir (28,29). Dahası, E-kadherin kaybının tümör progresyonunda kritik bir aşama olduğu öne sürülmüştür (30). Tüm bu bilgiler ışığında bizim sonuçlarımız dikkate alındığında, hipoksik ortam koşullarında Huh7 ve SKBR-3 hücrelerinin AMPK regülasyonu aracılığıyla EMT dönüşümünü indüklediği görülmektedir (31,32). Bunun sonucu olarak da hipoksik koşullar altında Huh7 ve SKBR-3 kanser hücrelerinde progresyondan ve daha malign bir fenotipten söz edilebilir.

Bu çalışmada, meme kanseri (SKBR-3, MDA-MB-453) ve hepatosellüler karsinom (HepG2, Huh-7) hücre dizilerinin serum starvasyonunda p-AMPK, total AMPK düzeyleri ve hipoksik ortam koşullarında p-AMPK, total AMPK, HIF-1α ve E-kadherin protein ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. İki farklı dokuda kanserler olmak üzere toplamda dört farklı tip hücrede, hücresel stresin metabolik yolak ana regülatör proteini olan AMPK üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, AMPK gen ekspresyonu yüksek olan hücre dizilerinde (Huh7 ve SKBR-3; Şekil 9), hücresel stres ile birlikte AMPK'nin regüle olduğu ve bu regülasyonun hücreye adaptasyon avantajı sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. Hücrenin lehine olan bu adaptif mekanizma sayesinde, EMT

dönüşümünün indüklendiği görülmekte ve hücrenin agresif fenotip kazandığı düşünülmektedir. Çalışmadan elde edilen veriler ışığında, hücresel stres koşullarının, hücrenin metabolik regülasyonunda önemli rol oynayan AMPK ve diğer metabolik yolak proteinlerinin ekspresyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacına yönelik uygun model oluşturulmasına katkı sağlanmıştır. Özellikle Huh7 ve SKBR-3 kanser hücrelerinde, hücreyi strese sokacak mekanizmaların sonucunda kanser hücre malign fenotipinin ve agresifliğinin artabileceği görülmüştür. Tüm bu sonuçlar, AMPK aracılı sinyal yolağı yüksek düzeyde aktif olan kanser türlerinde, metabolik yolağın hedeflenmesinin kritik öneme sahip olabileceğini göstermektedir. Bu durum da, AMPK inhibitörlerinin anti-tümöral etkisi olabileceğine ve kanser tedavisinde umut vaat eden terapötikler arasında yer alabileceğine işaret etmektedir. Farklı tip kanser hücreleri ile yapılan bu çalışmada, stres koşullarının farklı etkilerinin görülmesi, *in vitro* koşullarda hücre tipinin moleküler profiline bağlı olabileceği gibi *in vivo* koşullarda tümör mikroçevresindeki değişken koşullara bağlı olarak da değerlendirilebilir.

Yakın zamanlı bir çalışmanın sonuçlarına göre, hipoksik tümör mikroçevresi, tümör hücrelerinde kanser kök hücresi fenotipini indükleyerek malign progresyonu ve tedavi direncini destekleyebilmektedir (33). Gerçekten de tümör progresyonu, tümör hücreleri ile tümör mikroçevresinin etkileşimine kritik şekilde bağımlıdır (34,35). Tümör mikroçevresi heterojen bir yapıya sahiptir ve başlıca ekstraselüler matriksten, stromal hücrelerden, projenitör hücrelerden, endotel hücrelerden ve de immün hücrelerden oluşmaktadır (36). Hipoksik stres; makrofajları, myeloid kökenli supresör hücreleri ve regülatuvar T hücreleri ilgilendiren immünosupresif yolakları etkileyebilmekte ve tümör direnci sağlayabilmektedir. Hipoksi ayrıca, sitotoksik T hücre yanıtlarını da etkilemektedir. Yine hipoksi nedeniyle kanser hücrelerinde indüklenen otofaji, doğal öldürücü (NK) hücre aracılı anti-tümör immün yanıtlara karşı intrensek bir direnç mekanizması olarak işlev görmektedir (37). Hipoksinin hem kanser hücredeki intrensek mekanizmalar üzerindeki, hem tümör progresyonu üzerindeki, hem de immün supresyon üzerindeki kritik etkileri göz önüne alındığında; hipoksinin terapötik olarak hedeflenmesinin, kombine immünoterapi uygulamaları için de önemli katkı sağlayabileceği düşünülebilir. Ayrıca, hipoksik koşullar altında önemli bir hücre homeostaz regülatuvarı olan AMPK'nin immün sistemdeki önemi göz önüne alındığında da, hipoksinin hedeflenmesine benzer şekilde AMPK'ye yönelik yaklaşımların da anti-tümör immün yanıtlar için ne kadar büyük önem taşıyabileceği tahmin edilebilir. Başlıca T lenfosit aracılı adaptif immün yanıtlarda, AMPK-aracılı metabolik regülasyonun kritik olduğu rapor edilmiştir (38). Buna ilaveten, AMPK agonistlerinin doğal ve adaptif immün yanıtları baskılayabildiği de bilinmektedir (39). Literatürde yer alan bu bilgiler ve bizim çalışmamızın sonuçları dikkate alındığında, kanser tedavisinde hücresel strese neden olan hipoksi gibi mikroçevre koşullarının ve/veya AMPK'nın hedeflenmesinin, kanserin "hallmark" özellikleri arasında yer alan kanser metabolizması ve anti-tümör immün yanıtlar (40) üzerinde kritik bir düzenleyici potansiyeli olduğu öne sürülebilir.

Sonuç

Bu çalışmada, *in vivo* kanser dokularında sıklıkla gözlenen starvasyon ve hipoksi koşullarının kanser hücre metabolizması ve invazyonla ilişkili proteinlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri *in vitro* incelenmiştir. Serum starvasyonunun etkilerinin kinetik olarak incelenebilmesi amacıyla 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 4 farklı kanser dizisi, serum starvasyonuna maruz bırakılmıştır. Hipoksik ortam koşullarının simüle edilmesi amacıyla da "hipoksi chamber" kullanılarak %5 O_2, %5 CO_2, %90 N_2 gaz karışımı içeren ortam koşulları yaratılmıştır. Kanser metabolizması homeostazında kritik öneme sahip olan fosfo-AMPK, starvasyona maruz bırakılan Huh7 hücrelerinde zaman bağlı kinetik bir şekilde anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Hipoksik strese maruz bırakılan hem Huh7 hem de SKBR-3 hücrelerinde de yine anlamlı düzeyde fosfo-AMPK artışı izlenmiştir. Hem starvasyona hem de hipoksiye verilen bu yanıt, hücrenin azalan enerji miktarını kompanse etmek için kullandığı bir regülatuvar mekanizmayı ortaya koyabilir. Ayrıca, hipoksik ortam koşullarına maruz kalan Huh7 ve SKBR-3 hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunda anlamlı azalma izlenmiştir. Kanser hücrelerinde E-kadherin azalması, literatürde, artan EMT, progresyon, invazyon ve metasataz ile ilişkilendirilmiştir. Meme ve hepatosellüler kökenli dört farklı kanser hücresinden elde edilen bu bulgular, kanser heterojenitesine de dikkat çekmektedir. Aslında, CCLE veri tabanı aracılığıyla dört hücre dizisinin AMPK gen ekspresyonu karşılaştırıldığında, Huh-7 ve SKBR-3 hücre dizilerinin diğer kanser hücre dizilerine kıyasla bazal AMPK gen ekspresyon düzeyinin fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, Huh-7 ve SKBR-3 hücre dizilerinde AMPK aracılı sinyal yolağı aktivasyonunun hücre üzerinde belirgin etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır. Bu nedenle, kanser metabolizmasını hedef alan anti-kanser tedavi stratejilerinin farklı kanserlerde dikkatle uygulanması gerekmektedir. Ayrıca, kanser tedavisinde hipoksi ve/veya AMPK hedefli yaklaşımların anti-tümör immün yanıtlar üzerinde de önemli bir düzenleyici potansiyeli olduğu da unutulmamalıdır. Bu çalışma ile kanser hücre stres mekanizmalarına ve AMPK'ye yönelik terapötik stratejilerin belirlenebilmesine katkı sağlanmıştır. Daha sonra yapılacak çalışmalarda hipoksiye ve AMPK'ye yönelik terapötik yaklaşımların etkilerinin değerlendirilmesi, bu çalışmanın sonuçlarına değer katacaktır.

Etik

Etik Kurul ve Hasta Onayı: Bu çalışma, ticari hücre hatları üzerinde yapılmıştır. Gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar, etik kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: G.G., M.E.G., Dizayn: G.G., M.E.G., Veri Toplama veya İşleme: G.G., M.E.G., Analiz veya Yorumlama: G.G., M.E.G., Literatür Arama: G.G., M.E.G., Yazan: G.G., M.E.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Proud CG. Regulation and roles of elongation factor 2 kinase. Biochem Soc Trans. 2015;43:328-332.
2. Carling D. AMPK signalling in health and disease. Curr Opin Cell Biol. 2017;45:31-37.
3. Frezza C, Zheng L, Tennant DA, et al. Metabolic profiling of hypoxic cells revealed a catabolic signature required for cell survival. PLoS One. 2011;6:e24411.
4. Russo GL, Russo M, Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. Biochem Pharmacol. 2013;86:339-350.
5. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:251-262.
6. Sanli T, Steinberg GR, Singh G, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism: a novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway. Cancer Biol Ther. 2014;15:156-169.
7. Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. FEBS J. 2016;283:2987-3001.
8. Manning BD. Adaptation to starvation: translating a matter of life or death. Cancer Cell. 2013;23:713-715.
9. Dasgupta B, Chhipa RR. Evolving Lessons on the Complex Role of AMPK in Normal Physiology and Cancer. Trends Pharmacol Sci. 2016;37:192-206.
10. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:89-102.
11. Dejeans N, Manié S, Hetz C, et al. Addicted to secrete - novel concepts and targets in cancer therapy. Trends Mol Med. 2014;20:242-250.
12. Terai K, Hiramoto Y, Masaki M, et al. AMP-activated protein kinase protects cardiomyocytes against hypoxic injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress. Mol Cell Biol. 2005;25:9554-9575.
13. Van Proeyen K, De Bock K, Hespel P. Training in the fasted state facilitates re-activation of eEF2 activity during recovery from endurance exercise. Eur J Appl Physiol. 2011;111:1297-1305.
14. Knight JR, Bastide A, Roobol A, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the cold stress response by slowing translation elongation. Biochem J. 2015;465:227-238.
15. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 2006;160:1-40.
16. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 2010;49:1603-1616.
17. Yang J, Zhang X, Zhang Y, et al. HIF-2α promotes epithelial-mesenchymal transition through regulating Twist2 binding to the promoter of E-cadherin in pancreatic cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35:26.
18. Zhang W, Shi X, Peng Y, et al. HIF-1α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. PLoS One. 2015;10:e0129603.
19. Pirkmajer S, Chibalin AV. Serum starvation: caveat emptor. Am J Physiol Cell Physiol. 2011;301:C272-9.
20. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. J Vis Exp. 2011;(54).
21. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5.
22. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med. 2012 Mar 8;366:883-892.
23. Giancotti FG. Deregulation of cell signaling in cancer. FEBS Lett. 2014 Aug 19;588:2558-2570.
24. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. Nature. 2012;483:603-607.
25. Laderoute KR, Calaoagan JM, Chao WR, et al. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) supports the growth of aggressive experimental human breast cancer tumors. J Biol Chem. 2014;289:22850-22864.
26. Li W, Saud SM, Young MR, et al. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. Oncotarget. 2015;6:7365-7378.
27. Techasen A, Loilome W, Namwat N, et al. Loss of E-cadherin promotes migration and invasion of cholangiocarcinoma cells and serves as a potential marker of metastasis. Tumour Biol. 2014;35:8645-8652.
28. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. Prog Mol Biol Transl Sci. 2013;116:317-336.
29. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009;119:1420-1428.
30. Carrizo M. Loss of E-Cadherin Expression and Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) as Key Steps in Tumor Progression. J Cancer Prev Curr Res. 2017;7.
31. Saxena M, Balaji SA, Deshpande N, et al. AMP-activated protein kinase promotes epithelial-mesenchymal transition in cancer cells through Twist1 upregulation. J Cell Sci. 2018;131.
32. Li N, Huang D, Lu N, et al. Role of the LKB1/AMPK pathway in tumor invasion and metastasis of cancer cells (Review). Oncol Rep. 2015;34:2821-2826.
33. Kim H, Lin Q, Glazer PM, et al. The hypoxic tumor microenvironment in vivo selects the cancer stem cell fate of breast cancer cells. Breast Cancer Res. 2018;20:16.

34. Wu M, Swartz MA. Modeling tumor microenvironments in vitro. J Biomech Eng. 2014;136:021011.
35. Salvatore V, Teti G, Focaroli S, et al. The tumor microenvironment promotes cancer progression and cell migration. Oncotarget. 2017;8:9608-9616.
36. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nat Med. 2018;24:541-550.
37. Noman MZ, Hasmim M, Messai Y, et al. Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. Am J Physiol Cell Physiol. 2015;309:C569-79.
38. Blagih J, Coulombe F, Vincent EE, et al. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. Immunity. 2015;42:41-54.
39. Bai A, Ma AG, Yong M, et al. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis. Biochem Pharmacol. 2010;80:1708-1717.
40. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144:646-674.