



T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

UVEA MELANOMU HÜCRE DİZİLERİNDE AMPK
MODÜLASYONUNUN HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Dr. Özge DELİKTAŞ

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2020



T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**UVEA MELANOMU HÜCRE DİZİLERİNDE AMPK
MODÜLASYONUNUN HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Dr. Özge DELİKTAŞ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hayyam KIRATLI

**ANKARA
2020**

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki çaba ve emeklerinden ötürü; engin bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hayyam KIRATLI'ya, çalışmanın her aşamasında değerli katkı ve eleştirileriyle yol gösteren, destek olan Sayın Doç. Dr. Gürcan GÜNAYDIN'a, yardım ve destekleri için Sayın Dr. Öğr. Üyesi İrem KOÇ'a, tez deneylerim sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Sayın Uzm. Biol. Mustafa Emre GEDİK'e, bu tez çalışması ile noktaladığım uzmanlık eğitimimde bana emeği geçen tüm Hacettepe Göz ailesine ve her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Deliktaş Ö., Uvea melanomu hücre dizilerinde AMPK modülasyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara 2020. Bu çalışma ile, AMPK (AMP Aktive Edici Protein Kinaz) aktivasyonu ve inhibisyonu sonucunda uvea melanomu hücre dizilerinin hücre proliferasyonu yanıtı incelenerek AMPK hedefine yönelik doğru stratejinin karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Uvea melanomu en sık görülen intraoküler primer malign tümördür. AMPK, sağlıklı hücrenin kanser hücrelerine dönüşümünde ve tümör gelişiminde metabolik adaptasyonu sağlayarak önemli rol oynamaktadır. AMPK farklı koşullarda tümör supresör veya protümoral etki gösterebilmektedir. Çalışmamızda MEL, OMM2.5, 92.1 ve MP46 uvea melanomu hücre dizileri farklı dozlarda AMPK aktivatör (A-769662) ve inhibitör (Dorsomorfin) ajanları ile ayrı olarak inkübe edilmiştir. MTT hücre proliferasyon deneylerinde hücre dizilerinin 24 saatlik proliferasyon hızları sırasıyla en hızlı proliferasyon olan 92.1 olmak üzere MP46, OMM2.5, MEL270 şeklinde bulunmuştur. Hücrelerin proliferasyon hızları ve farklı ilaç gruplarına verdikleri proliferasyon yanıtları arasında ilişki gözlenmemiştir. Hücre dizilerinin AMPK düzenleyici ajanlara verdiği yanıt 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonrasında XTT hücre proliferasyon deneyi yapılarak saptanmıştır. Tüm hücre dizilerinin (92.1 hücre dizisi, <50 µM AMPK aktivatörü dışında) AMPK aktivatörüne verdiği yanıt aynı hücre dizisinin ilaç eklenmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda azalma olduğu gözlenmiştir. Aynı hücre dizisinde hücre proliferasyonundaki azalma miktarı ve doz artışı arasında bir ilişki gözlenmemiştir. MP46 hücre dizisinde AMPK aktivatörünün 50 µM üzerindeki uygulamalarında artan ilaç dozlarında hücre proliferasyonunun daha fazla olduğu saptanmıştır. Tüm hücre dizilerinin 5 µM üzerindeki AMPK inhibitörünün artan dozlarda uygulanmasına verdiği yanıt, doz arttıkça proliferasyonun daha da azalması olarak gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Uvea melanomu, AMPK, hücre proliferasyonu

ABSTRACT

Deliktaş Ö., The effect of AMPK modulation on cell proliferation in uveal melanoma cell lines, Hacettepe University School of Medicine, Ophthalmology Department, Thesis in Ophthalmology, Ankara 2020. The aim of this study is to comparatively determine the accurate strategy regarding AMPK targeting by analyzing the cell proliferation response of uveal melanoma cell lines to AMPK activation and/or inhibition. Uveal melanoma is the most common primary intraocular malignant tumor. AMPK plays an important role in the transformation of a healthy cell into a tumor cell and tumor progression by providing metabolic adaptation. AMPK can have a tumor suppressor or a protooncogenic impact under different circumstances. In our study, uveal melanoma cell lines MEL270, OMM2.5, 92.1 and MP46, were incubated separately with varying doses of AMPK activator (A-769662) or inhibitor (Dorsomorphin) agents. MTT cell proliferation assays, the 24-hour rates of proliferation were determined and 92.1 cells showed the highest proliferation rate (92.1, MP46, OMM2.5, MEL270 in the decreasing order). There was no correlation between the cell proliferation rates and the proliferation responses to the different drug groups. The responses of cell lines to these AMPK modulating agents were determined by XTT cell proliferation assays after a 48-hour incubation. There was a decrease in cell proliferation response in all cell lines incubated with AMPK activator, compared to the control group of the corresponding cell lines which were not exposed to any agents. There was no correlation between the amount of decrease in cell proliferation and dosage increment in any of the cell lines. In MP46 cell line, the cell proliferation was found to be higher as a result of the treatment of AMPK activator in increasing doses over 50 μ M. The response of all cell lines to the treatment of AMPK inhibitor was observed significantly, as cell proliferations declined further with the increasing doses over 5 μ M.

Keywords: Uveal melanoma, AMPK, cell proliferation

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
GRAFİKLER	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Uvea Melanomu	5
2.2. 5' AMP Aktive Edici Protein Kinaz (AMPK)	5
2.2.1. AMPK Fosforilasyonunun Regülasyonu	6
2.2.2. AMPK-Karbonhidrat, Lipit ve Protein Metabolizması	6
2.2.3. AMPK- Hücre Gelişimi, Otofaji ve Apoptozis	6
2.2.4. AMPK'ın Fizyolojik Regülasyonu ve Hastalıklarda Disregülasyonu	6
2.2.4.1. AMPK-Egzersiz	7
2.2.4.2. AMPK- Sirkadyen Ritm	7
2.2.4.3. AMPK- İnflamatuar ve Endokrin Regülasyon	8
2.2.4.4. AMPK- Karsinogenez	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1. Gereçler	11
3.2. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları	11
3.3. Mikoplazma Testi	12
3.4. MTT Hücre Proliferasyonu Deneyi	12
3.5. XTT Hücre Proliferasyonu Deneyi	13
3.6. Dorsomorfin (Compound C) ve A-769662 İlaç Dozlarının Belirlenmesi	14

4. BULGULAR	17
4.1. Hücre Hatlarının Mikoplazma Kontaminasyonunun Belirlenmesi	17
4.2. Hücre Hatlarının 24 Saatlik Proliferasyon Hızları	17
4.3. Hücre Hatlarının 48 Saatlik Proliferasyon Hızları	18
4.4. AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi	20
4.4.1. 92.1 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi	20
4.4.2. MP46 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi	22
4.4.3. OMM2.5 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi	24
4.4.4. MEL270 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi	26
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇLAR	34
7. KAYNAKLAR	35

KISALTMALAR

AICAR:	5-Aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid
AMP:	5' Adenozin Mono Fosfat
AMPK:	AMP Aktive Edici Protein Kinaz
CaMKKβ:	Kalsium/Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz Kinaz
CBS:	Sistasyonin β Sentaz
CRY1:	Kriptokrom Sirkadyen Düzenleyici 1
EF2:	Uzama Faktörü 2
eNOS:	Endotel Hücrelerinde Nitrik Oksit Sentaz
GLUT4:	Glukoz Taşıyıcı 4
IL-6:	İnterlökin-6
IC50:	İnhibisyon Konsantrasyonu
LKB1:	Karaciğer Kinaz B1
LPS:	Lipopolisakkaritler
mTORC:	Memelilerde Rapamisin Hedef Kompleksi
OD:	Optik Dansite
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SIRT1:	Sirtüin 1
TAK1:	TGF- β Aktif Kinaz-1
TGF-β:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β
TNF-α:	Tümör Nekroz Faktörü
TSC2:	Tüberoskleroz Kompleks 2
ULK1:	Unc-51 Benzeri Kinaz 1

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Jel elektroforez sonuçları	17
Şekil 4.2. 92.1 hücre dizisinin 96 kuyucuklu plakta XTT hücre proliferasyon deneyi	20
Şekil 4.3. 92.1 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü	21
Şekil 4.4. MP46 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü	23
Şekil 4.5. OMM2.5 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü	25
Şekil 4.6. MEL270 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü	27

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1. Proje Kapsamında Kullanılan Gereçler	10
Tablo 3.2. Literatürdeki çalışmalarda kullanılan AMPK aktivatörü dozları	15
Tablo 3.3. Literatürdeki çalışmalarda kullanılan AMPK inhibitörü dozları	15
Tablo 3.4. Çalışmamızda kullanılan A-769662 ve Dorsomorfin dozları ve DMSO içerikleri	16
Tablo 4.1. OMM2.5, MEL270, MP46, 92.1 hücre dizilerinin farklı hücre sayılarında OD değerleri	18
Tablo 4.2. 92.1 hücre dizilerinin farklı hücre sayılarında XTT ve MTT proliferasyon deneylerinde OD değerleri	19
Tablo 4.3. 92.1 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	21
Tablo 4.4. 92.1 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	21
Tablo 4.5. MP46 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	23
Tablo 4.6. MP46 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	23
Tablo 4.7. OMM2.5 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	25
Tablo 4.8. OMM2.5 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	25
Tablo 4.9. MEL270 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	27
Tablo 4.10. MEL270 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri	27

GRAFİKLER

Grafik	Sayfa
Grafik 4.1. OMM2.5, MEL270, MP46, 92.1 hücre dizilerinin hücre sayılarına göre OD değişimi	18
Grafik 4.2. 92.1 hücre dizilerinin hücre sayılarına göre XTT ve MTT hücre proliferasyon deneylerinde OD değişimi	19
Grafik 4.3. 92.1 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi	22
Grafik 4.4. MP46 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi	24
Grafik 4.5. OMM2.5 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi	26
Grafik 4.6. MEL270 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi	28

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Uvea melanomu en sık görülen intraoküler primer malign tümördür (1-3). Yıllık insidansı milyonda 5-8 olarak bildirilmiştir (3-5). Bazı klinik, histopatolojik ve genetik faktörler uvea melanomunun prognozunda belirleyicidir (6, 7). Uvea melanomu tedavisinde tümör boyutu ve lokalizasyonuna göre konservatif ya da radikal tedavi uygulanmaktadır. Tümörün fovea ve optik diske olan mesafesi ile ilişkili olarak konservatif tedavi sonrası görme korunmaktadır. Son yıllarda konservatif tedavi ön planda uygulanmaktadır. Konservatif tedavi sonrası lokal rekürens oranları %5'in altındadır. Büyük çaplı, kalın, komplike olmuş ve ekstraoküler yayılımı olan tümörlere radikal tedavi (gözün anatomik olarak yerinde kalmadığı tedaviler) uygulanmaktadır (8, 9). Uygun tedaviye rağmen hastaların yaklaşık yarısı metastatik hastalığa bağlı ölmektedir. Yaşam süresi, metastaz oranları konservatif tedavi ve radikal tedavide değişmemektedir (10, 11).

Metastaz hematogen yolla en sık karaciğer (%93), akciğer (%24) ve kemiklere (%16) olmaktadır. Karaciğer metastazı sonrası ortalama yaşam süresi 4-6 aydır. Metastaz gelişen hastaların %15 'i 1 yıllık yaşam süresine ulaşmaktadır. Son 30 yılda uvea melanomu hastalarının yaşam süresinde iyileşme olmamıştır. Metastatik hastalıkta etkin bir tedavi yönteminin olmayışı yüksek riskli hastaların erken tespitinin hastalık yönetimi açısından önemini ortaya koymaktadır (12-17). Son yıllarda çalışmalar genetik prognostik belirteçler ve gen spesifik tedavilere yoğunlaşmıştır. Genetik ve epigenetik değişimleri içeren çok aşamalı bir süreç olan uvea melanomu gelişimi ve progresyonundaki patogenezin moleküler düzeyde anlaşılması tedavi geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (18).

AMPK (AMP Aktive Edici Protein Kinaz) hücrenin çeşitli metabolik stres durumlarında aktive olarak hücredeki enerji homeostazını sağlayan önemli bir serin/treonin protein kinazdır. Besin eksikliği, hipoksi gibi organizmadaki enerji miktarının düşük olduğu veya enerji tüketiminin yüksek olduğu stres koşullarında; AMPK aktivasyonu ile birlikte yağ asidi oksidasyonu ve glikolizis gibi katabolik reaksiyonlar artmakta, yağ asidi, kolesterol ve protein sentezi gibi anabolik reaksiyonlar baskılanmaktadır (19).

Hücrenin maruz kaldığı stresin karsinogenezde önemli olduğu düşünülmektedir. Sağlıklı hücreler kanser hücrelerine dönüşme sürecinde onkogen aktivasyonu, hipoksi, besin eksikliği, radyoterapi ve kemoterapi gibi strese maruz kalırlar. Stres altında hücrenin büyümesi ve hayatta kalabilmesi için enerji homeostazını sağlaması gerekir. AMPK enerji ve oksidoredüksiyon homeostazında temel düzenleyicidir. AMPK diyabette, kalp kası bozukluklarında, enflamatuvar hastalıklarda ve viral enfeksiyonlarda olduğu gibi birçok kanser türünde de deregüle olmaktadır (20, 21).

Yapılan çalışmalara göre AMPK'ın kanserle ilişkisi iki yönlüdür. AMPK farklı koşullarda tümör supresör veya protümoral etki gösterebilmektedir. LKB1, TSC2, P53 gibi birçok proteinin fosforile edilerek düzenlenmesi ile AMPK'ın hücre bölünmesini durdurarak tümör supresör özellikler göstermektedir (22). AMPK diğer hücreler gibi tümör hücrelerinin de hipoksi, besin eksikliği gibi stres koşullarında hayatta kalmasını sağladığını destekleyen çalışmalar mevcuttur. Çalışmalardaki bu çelişkili durumun tümörün moleküler profiline ve mikroçevre koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir (23, 24).

Çalışmamızda farklı moleküler profillerdeki MEL270, OMM2.5, 92.1 ve MP46 uvea melanomu hücre hatları AMPK inhibitör ve aktivatör ajanları ile ayrı olarak inkübe edilmiştir. İlaç inkübasyonları sonucu hücre proliferasyonu analiz edilerek ve grup içi gözlenen değişimler kendi aralarında ve kendi grubunda ilaç inkübe edilmemiş kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Bu çalışma ile uvea melanomunda AMPK regülasyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uvea Melanomu

Uvea melanomu intraoküler en sık görülen primer malign tümördür. İris, siliyer cisim ve koroideada yer alan melanositlerden kaynaklanır. Oküler melanomlar tüm melanomların %3'ünü oluşturmaktadır. Oküler melanomların %85'ini uvea melanomu, %10'unu kapak/orbita melanomu, %5'ini konjonktiva melanomu oluşturur (1-3). Uvea melanomu ortalama tanı yaşı 60 olmak üzere 30 yaş altında nadir görülmektedir. Yıllık insidansı milyonda 5-8 olarak bildirilmiştir (3-5).

Beyaz ırk, açık ten rengi, açık renk iris, uveal nevüs, oküler ve okülodermal melanositoz, displastik nevüs sendromu uvea melanomu gelişme riskini artıran faktörlerdir (25-28). Uvea melanomlu hastaların %0.6'sında ailesel uvea melanomu saptanmıştır. İnkomplet geçişli otozomal dominant kalıtımla aktarılan ailesel uvea melanomu hastalarında *BAP1* mutasyonu ve sekonder kanser riskinin arttığı tespit edilmiştir. (29-31)

Uvea melanomu hastalarında monozomi 3, kromozom 8q kazanımı, *GNAQ*, *GNA11*, *EIF1AX*, *SF3B1* ve *BAP1* mutasyonu gibi genetik değişiklikler tespit edilmiştir. Uvea melanomu gen ekspresyon profilinin prognozda önemli rol oynadığı görülmüştür. Uvea melanomu hastaları gen ekspresyon profiline göre düşük ve yüksek metastaz riskine sahip iki sınıfa ayrılmıştır. Sınıf-1A tümörlerde %2, sınıf-1B tümörlerde %21, sınıf-2 tümörlerde %72 oranında metastaz tespit edilmiştir (32-38).

Klinik ve histopatolojik faktörler uvea melanomunda bilinen prognostik faktörlerdir. Klinik parametrelerden tümör kalınlığı, tümör çapı, siliyer cisim tutulumu ve ekstraoküler yayılım prognozunu etkilemektedir. *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) tümör evrelemesinde aynı klinik parametreler kullanılmaktadır (38). Tümör, kalınlığı ve çapına göre küçük (yüksekliği ≤ 3 mm, en büyük çapı < 10 mm), orta (yüksekliği $> 3-8$ mm, en büyük çapı $10-15$ mm) ve büyük (yüksekliği > 8 mm, en büyük çapı > 15 mm) olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Siliyer cisim tutulumu ve sklera dışı yayılım kötü prognozla ilişkilidir (39, 40). Histopatolojik olarak uvea melanomu iğsi hücreli, epitelooid hücreli ve karışık hücreli melanom olmak üzere 3 sınıfa ayrılmaktadır. Hücre tipleri prognozu etkileyen önemli faktörlerdendir. Mitoz

sayısı, lenfosit infiltrasyonu, pigmentasyon derecesi, vasküler patern oluşumu ve nekroz oranı histopatolojik diğer prognostik faktörlerdir (6, 7, 41-44).

Uvea melanomu tedavisinde tümör boyutu ve lokalizasyonuna göre fotodinamik tedavi, transpupiller termoterapi (TTT), plak brakiterapi, yüklü partikül radyoterapi, fraksiyone stereotaktik radyoterapi, lokal rezeksiyon ve radikal tedavi (enükleasyon, ekzenterasyon) uygulanmaktadır. Konservatif tedavide görme ve gözü korumak amaçlanmaktadır. Tümörün fovea ve optik diske olan mesafesi ile ilişkili olarak konservatif tedavi sonrası görme korunmaktadır. Son yıllarda konservatif tedavi ön planda uygulanmaktadır. Konservatif tedavi sonrası lokal rekürens oranları %5'in altındadır. Büyük çaplı, kalın, komplike olmuş ve ekstraoküler yayılımı olan tümörlere radikal tedavi uygulanmaktadır (8, 9). Uygun tedaviye rağmen hastaların yaklaşık yarısı metastatik hastalığa bağlı ölmektedir. Yaşam süresi, metastaz oranları konservatif tedavi ve radikal tedavide değişmemektedir (10, 11).

Metastaz hematogen yolla en sık karaciğer (%93), akciğer (%24) ve kemiklere (%16) olmaktadır. Karaciğer metastazı sonrası ortalama yaşam süresi 4-6 aydır. Hastaların %15 'i 1 yıllık yaşam süresine ulaşmaktadır. Diğer organ metastazlarında 19-28 aylık sağ kalımlar raporlanmıştır (12-14). Son 30 yılda uvea melanomu hastalarının yaşam süresinde iyileşme olmamıştır. Metastatik hastalıkta etkin bir tedavi yönteminin olmayışı yüksek riskli hastaların erken tespitinin hastalık yönetimi açısından önemini ortaya koymaktadır (13, 15-17). Son yıllarda çalışmalar genetik prognostik belirteçler ve gen spesifik tedavilere yoğunlaşmıştır. Genetik ve epigenetik değişimleri içeren çok aşamalı bir süreç olan uvea melanomu gelişimi ve progresyonundaki patogenezin moleküler düzeyde anlaşılması tedavi geliştirilmesine katkı sağlayacaktır (18).

2.2. AMP Aktive Edici Protein Kinaz (AMPK)

Hücreler gerekli enerji ihtiyacını besin kaynaklarının ulaşılabilirliğine göre metabolizmalarını adapte ederek karşılamaktadır. Hücrenin enerji homeostazını oluşturan bu süreç serin/treonin kinaz olan AMPK'nın regülasyonu ile sağlanmaktadır (19). AMPK α , β ve γ olmak üzere 3 alt birimden oluşan heterotrimerik bir yapıdadır. α ($\alpha1$ ve $\alpha2$), β ($\beta1$ ve $\beta2$) ve γ ($\gamma1$, $\gamma2$ ve $\gamma3$) alt birimlerinden değişik kompozisyonlarda birleşerek farklı substratlara spesifik, farklı görevleri ve yerleşimi

olan AMPK'lar oluşturulur. Omurgalılarda 12 farklı AMPK alt birimi kombinasyonu bilinmektedir. AMPK, γ alt birimindeki CBS (sistasyonin β sentaz) alanına bağlanan adenin nükleotitleri aracılığı ile hücredeki ATP düzeyi ve ATP'nin ADP ve AMP'ye oranını algılamaktadır (45, 46). AMPK stres ve hipoksi gibi düşük enerji koşullarında görevli enzimleri fosforilleyerek ATP üretiminin artmasını ve ATP tüketiminin azalmasını sağlamaktadır (21, 47, 48).

2.2.1 AMPK Fosforilasyonunun Regülasyonu

AMPK tüm hücrelerin enerji dengesini arz ve talepleri değerlendirerek yönetir. Bu süreçte AMPK aktivasyonu α alt birimindeki treonin-172'nin LKB1, CaMKK β ve TAK1 aracılığıyla fosforilasyonu ile düzenlenmektedir. Treonin-172 dışında α ve β alt biriminde birçok fosforillenme bölgesi mevcuttur, bunlar da AMPK regülasyonunda rol almaktadır. AMPK aktive olduktan sonra anahtar rol oynayan enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek metabolizmanın ve gen ekspresyonunun kontrolünü sağlar (47, 49, 50).

2.2.2 AMPK-Karbonhidrat, Lipit ve Protein Metabolizması

Karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde, enerji ihtiyacının arttığı durumlarda AMPK aktive olur. Devamında glukozun hücre içine alımı ve glikoliz hızı artar. AMPK aktivasyonu sağlayan AICAR ya da metformin ile yapılan deneylerde insülin duyarlı hücrelerde GLUT4 ekspresyonunun, glukozun hücre içine alımının arttığı bu mekanizma ile insülin direncinin azaltıldığı saptanmıştır. AS160 ve TBC1D1 moleküllerinin AMPK tarafından fosforillenmesi GLUT4'ün hücre membranına translokasyonunu ve GLUT4 aracılı insüline bağlı glukoz alımını artırmaktadır (51). Hücre içine alınan glukoz AMPK tarafından fosforillenerek aktive edilen fosfofruktokinaz-2 başta olmak üzere glikoliz enzimlerinin aktive olması ile enerji ihtiyacının karşılanmasında kullanılır. AMPK aktive olduğunda glikojen sentazı fosforile ederek inhibisyonunu sağlar ve glikojen fosforilazı aktive eder. Bu durumun kas dokuda glikojen deposunu azaltması beklenir. Fakat hücrenin glukoz ihtiyacı hızla yerine konduğunda ve glukoz-6 fosfat miktarı arttığında glikojen sentaz enzimi aktive olabilir (52, 53). AMPK aktivasyonu ile glukoneogenez için gerekli enzimlerin transkripsiyonunu baskılayarak hepatik glukoz üretimi azaltır (21).

1987 yılında Carling ve arkadaşları tarafından yağ asidi ve kolesterol metabolizması araştırmalarında anahtar düzenleyici olarak AMPK keşfedilmiştir. Lipit metabolizması açlık durumunda hücredeki ATP ve glukoz miktarının azalmasıyla enerji kaynağı olarak önemli hale gelir. AMPK'ın asetil-CoA karboksilaz enzimini fosforillemesi ile insülin bağımlı hücrelerde yağ asidi alımı ve yağ asidi oksidasyonu artar, karaciğerde lipogenez azalır. AMPK'ın aktifleşmesi ile yağ asidi ve kolesterol sentezi için gerekli enzimler fosforillenerek inhibe edilir. Karaciğer ve yağ dokuda yağ asidi, kolesterol sentezi azaltılır (54-56).

Protein sentezi hücre içi enerjinin harcandığı önemli anabolik reaksiyonlardan biridir. Hücre metabolik stres ve enerji ihtiyacının arttığı durumlarda enerji homeostazını sağlamak için AMPK'ı aktive eder. AMPK mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), EF2 (*elongation factor 2*) gibi çeşitli yolak proteinlerini fosforile ederek protein sentezini inhibe eder (57, 58).

2.2.3. AMPK- Hücre Gelişimi, Otofaji ve Apoptozis

AMPK'ın aktive olması hücre bölünmesinde G1/S fazında geçişini durdurur. Bu etkinin tümör supresör özelliği olan p53, p21 ve p27'nin AMPK tarafından fosforillenmesi ile sağlandığı d ş n lmektedir. Ayrıca AMPK mRNA stabilizasyonu sağlayan proteinlerin ve RNA bağlayıcı diğer proteinlerin sitoplazma ve çekirdekteki dağılımlarını etkileyerek hücre bölünmesini inhibe eder (59-61).

Besin gereksinimi karşılanmayan, stres altındaki hücre bütünlüğünü koruyabilmek için otofajiyi kullanır. AMPK, ULK1 (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*) ve mTOR ile etkileşerek otofaji mekanizmasını düzenlemektedir (62). AMPK'ın aktivasyonunun p27 gibi hücre döngüsünde önemli rol oynayan faktörler üzerine olan etkisi ve protein sentezini inhibisyonu, hücrenin otofaji ve apoptoz dengesi için önemli rol oynamaktadır (21, 63)

2.2.4. AMPK'ın Fizyolojik Regülasyonu ve Hastalıklarda Disregülasyonu

2.2.4.1. AMPK-Egzersiz

Egzersizin kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser ve depresyonun önlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Egzersiz sırasında hücrelerde ATP döngüsü

100 kata kadar artmaktadır. AMP/ATP oranının artması AMPK aktivasyonuna neden olur. AMPK'ın aktive olması ile anabolik reaksiyonlar baskılanır, katabolik reaksiyonlar hızlandırılarak hücrenin gerekli enerjiyi kazanması sağlanır (21, 64). Hücrenin artan metabolizması için ihtiyaç duyulan substratların sağlanması, atıkların bölgeden uzaklaştırılması için kan akımının artması gerekir. Aktive AMPK endotel hücrelerinde nitrik oksit sentazı (eNOS) aktive ederek kan akım hızının düzenlenmesine yardımcı olur (65, 66).

Yıllardır egzersizin hücrelerde mitokondri içeriği ve kapasitesini arttırdığı bilinmektedir. AMPK ile etkileşime girerek mitokondri biyogenezi kontrol edilir, gerekli transkripsiyon faktörleri ve koaktivatörlerin düzenlenmesi sağlanır (67).

2.2.4.2. AMPK- Sirkadyen Ritm

Sirkadyen ritm gece ve gündüz döngüsünde ışığa organizmanın verdiği davranışsal ve fizyolojik yanıtın düzenlenmesini sağlar. Beyinde ışığa bağımlı yanıt düzenlenirken periferel dokularda besin alımına göre sirkadyen ritmin düzenlendiği düşünülmektedir. Besin alımı ile aktive olan AMPK kriptom-1 (CRY-1)'i fosforile ederek sirkadyen ritm düzenlenmesinde görev alır (68).

2.2.4.3. AMPK- İnflamatuar ve Endokrin Regülasyon

Aşırı beslenme ve obezite insülin rezistansı, diyabet ve kanser için önemli risk faktörlerindedir. Besin alımının artması ile hücre içinde glukoz ve yağ asitleri artar, NAD/NADH oranı azalır. Bunun sonucunda SIRT1/LKB1 yolağı inhibe edilir, bu süreç AMPK fosforilasyonu önlenmesi ve inhibe olmasıyla sonuçlanır. Kalori kısıtlamasının bu süreci tersine çevirerek AMPK'ın aktive olmasını; insülin rezistansı, diyabet ve kanser riskinin azalmasını sağladığı düşünülmektedir. Yaşla azalan AMPK aktivasyonuna karşı egzersiz ve kalori kısıtlaması yaşlanma karşıtı olarak kullanılabilir (69-71).

Obezite kronik inflamasyonu artırarak da insülin rezistansı, diyabet ve kanser riskini artırmaktadır. Makrofaj ve adipoz dokuda artan yağ asitleri *toll like reseptör-4* (TLR-4) ile proinflamatuvar cevap oluşumuna ve insülin rezistansına neden olur (72). TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler, AMPK'ın aktivasyonunu baskılar; IL-10, TGF- β gibi antiinflamatuvar sitokinler, AMPK aktivasyonunu artırır. AMPK

inhibisyonu hücrede inflamatuvar cevabın (TNF α , IL-6 ve IL-1 üretimi artar) artışıyla, AMPK aktivasyonu hücrede inflamatuvar cevabın azalmasıyla (antiinflamatuvar olan IL-10 üretimi artar) sonuçlanır. Özetle AMPK başlayan antiinflamatuvar ya da inflamatuvar süreci daha da kuvvetlendirecek şekilde cevap verir (73).

Aktive T hücrelerin immün yanıt oluşturabilmesi, artan metabolizma ihtiyacının karşılanması (hücrenin metabolik kontrolü) AMPK aktivasyonu aracılı mRNA translyasyonu ve mitokondriyal cevapla sağlanır. Bu nedenle T hücre yanıtları için AMPK kritik bir önem taşımaktadır (74).

Makrofaj ve adipositler leptin, adiponektin, visfatin, retinol bağlayıcı protein-4 ve rezistin gibi adipokin olarak adlandırılan hormon ve sitokinler salgılamaktadır. Adipokinlerin organizmada oluşturduğu değişiklikler AMPK aracılı olarak sağlanır. Adipokinlerin ve diğer iştah düzenleyici hormonların hipotalamusta açlık ve enerji tüketimi dengesinin düzenlenmesinde AMPK aracılı etki ettiği düşünülmektedir. (75).

2.2.4.3. AMPK- Karsinogenez

Hücrenin maruz kaldığı stresin karsinogenezde önemli olduğu düşünülmektedir. Sağlıklı hücreler kanser hücrelerine dönüşme sürecinde onkogen aktivasyonu, hipoksi, besin eksikliği, radyoterapi ve kemoterapi gibi strese maruz kalırlar. Stres altında hücrenin büyümesi ve hayatta kalabilmesi için enerji homeostazını sağlaması gerekir. AMPK hücrenin enerji homeostazının yönetimini yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmasını düzenleyerek sağlar. AMPK enerji ve oksidoredüksiyon homeostazında temel düzenleyicidir (20).

Yapılan çalışmalara göre AMPK'ın kanserle ilişkisi iki yönlüdür. Farklı koşullarda tümör supresör veya tümör gelişimini destekleyen etki gösterebilmektedir. Çalışmalardaki bu çelişkili durumun tümörün moleküler profiline ve mikroçevre koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir (23, 24).

Metforminin etki mekanizmalarından biri AMPK aktivasyonudur, kullanımının kanser riskini azalttığı düşünülmektedir (76). Peutz-Jeghers sendromu AMPK aktivasyonunda kritik rolü olan LKB1'de otozomal dominant olarak aktarılan mutasyon sonucu oluşur. Peutz-Jeghers sendromunun kanser prevalansını artırdığı bilinmektedir (21). AMPK tümör supresör LKB1, TSC2 tarafından fosforile edilerek aktive olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan rapamisinin hedeflediği mTOR,

LKB1-AMPK yolağı tarafından inhhibe edilmektedir (58). AMPK p53'ün regölasyonu, transkripsiyon faktörleri ve koaktivatörlerin aktivasyonunu etkileyerek hücre siklusuna yön vermekte, hücrelerinin bölünme sürecini durdurabilmektedir (60). AMPK aktivitesi inflamasyonu ve anti tümör immün yanıtları düzenleyerek tümör gelişimini önleyebilir. AMPK aktivasyonu ile HIF-1 α azalarak Wargburg etkisinin baskılanması ile tümör hücrelerinin hayatta kalması önlenmiş olur. Bunlar göz önüne alındığında çeşitli yolak proteinlerinin fosforile edilerek düzenlenmesi ile AMPK'ın hücre bölünmesini durdurarak tümör supresör özellikler gösterdiği söylenebilir (22).

AMPK'ın tümör supresör birçok özelliğine rağmen AMPK mutasyonu Kanser Genom Atlas projesi datalarında nadir görölmektedir. AMPK diğer hücreler gibi tümör hücrelerinin de hipoksi, besin eksikliği gibi stres koşullarında hayatta kalmasını sağladığını, ilaç direnci ve metastazda önemli rol oynadığını destekleyen çalışmalar mevcuttur. AMPK'ın otofaji indüksiyonu, yağ asidi oksidasyonunu artırması ve hücredeki NADPH artışı ile oksidoredüksiyon dengesine yardımcı olması metabolik strese olan cevabına katkı sağlayarak tümör gelişimine destek olmaktadır. AMPK aktivasyonu ayrıca metastaz ve tümör büyümesine yardımcı olan matrix ayrılmasını artırarak protümöral etki gösterir (23, 24).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 01/10/2019 tarih ve GO 19/974 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır

3.1. Gereçler

Tablo 3.1. Proje Kapsamında Kullanılan Gereçler

Ekipman Türü, Modeli	Bulunduğu Kurum/Kuruluş	Projede Kullanım Amacı
+4°C dolap (<i>Alarko</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Kitlerin ve solüsyonların saklanması
-20°C dolap (<i>Bosch</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Kitlerin ve solüsyonların saklanması
Dikey Akım Kabini (<i>Heraeus</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Partikülden arındırılmış steril ortamda deneylerin yapılması için
Inverted Mikroskop (<i>Olympus</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Hücrelerin incelenmesi
İnkübatör (CO ₂ 'li) (<i>Heraeus Instruments</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Hücrelerin proliferasyonu için uygun ortamın sağlanması
Lam (26x76mm) (<i>Marienfeld</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Hücre sayım aracı
Lamel (24x60mm) (<i>Marienfeld</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Hücre sayım aracı
Manyetik Karıştırıcı (<i>Stuart Scientific</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	DMF/SDS hazırlama aşamasında karıştırıcı

Otomatik pipetler (<i>Eppendorf</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Pipetaj işlemleri
Spektrofotometre (<i>SpectraMax</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Hücre proliferasyonu kantitasyonu
Terazi	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Maddelerin kütle ölçümü
Ultrasantrifüj (<i>Thermo Scientific</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Solüsyonların ve hücrelerin ayrıştırılması
Vorteks, (<i>Vortex- Genie</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Tüp içeriğinin karıştırılması
Yatay çalkalayıcı (<i>Edmund Bühler</i>)	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Kimyasalların karıştırılması
Kodak Gel Logic Görüntüleme sistemi	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Mikoplazma jel görüntülemesi
Yatay jel elektroforez sistemi	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Jel elektroforez sistemi
Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyon Cihazı	Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı	Mikoplazma PCR'ı için

3.2. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları

Çalışma kapsamında uvea melanomu hücre hatları olan MEL270, OMM2.5, 92.1 ve MP46 kullanıldı. [Leiden Üniversitesi, Prof. Dr. Martine Jager'in labotaruvarından temin edilmiştir.] MEL270, OMM2.5 ve 92.1 hücre hatları %10 FBS, 2 mM L-Glutamin, %2 Penisilin/streptomisin ilave edilmiş RPMI-1640 (Dutch Modified), MP46 hücre hattı ise %20 FBS, 3 mM L-Glutamin, %2 Penisilin/streptomisin ilave edilmiş IMDM besiyerlerinde çoğaltılarak CO₂ etüvde 37 °C 'da inkübe edildi. Her 3 günde bir besi yeri değiştirildi, tek tabaka halinde büyüyen

hücreler haftada bir defa tripsinizasyon yapılarak pasajlandı. Hücre kültürü çalışmalarımız için dikey akım kabini (*laminar flow*) kullanıldı.

3.3. Mikoplazma Testi

Hücre kültüründe kullanılacak hücre dizilerinin, hücre içi bakteri (mikoplazma) kontaminasyonunu test etmek için, flask içerisindeki yoğunluğu %75-80 düzeylerine ulaşmış MEL 270, OMM2.5, 92.1 ve MP46 hücre hatlarına ait 1'er ml besiyeri alınarak 1,5 ml'lik deney tüpü içerisine konuldu. Aldığımız örnek +4 °C'da 2000 rpm'de 90 saniye santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası oluşan süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve pelet atıldı. Alınan süpernatant 14000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Bu işlemden sonra süpernatant pipet ile çekilerek atıldı. Tüpün alt kısmında oluşan pelet 25 µl mikoplazma tampon solüsyonu içerisinde süspansiyon hale getirildi. Süspansiyon 95 °C'ye getirilmiş kuru blok üzerinde 3 dakika inkübe edildi.

Bu aşamadan sonra Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) geçildi. Polimeraz zincir reaksiyonu EZ-PCR Mikoplazma kitinde (*Biological Industries-İsrail*) önerilen miktarlarda örnek tüp, pozitif kontrol tüpü ve negatif kontrol tüpü olarak hazırlandı. 5µl test örneği, 10µl reaksiyon karışımı, 35µl distile su PCR tüpüne eklendi. 40µl mineral yağı ile kaplanarak reaksiyon karışımının buharlaşması önlenildi. DNA termal dönüştürücüye tüpler yerleştirilip uygun zaman ve sıcaklık parametreleri (94°C 30 saniye, 60°C 120 saniye, 72°C 60 saniye-5 dakika) ayarlanarak PCR çalıştırıldı. 20µl PCR örneği jel elektroforeze yerleştirildi. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda tüplerin içerisindeki ürünler %2'lik agaroz jele yüklendi. Yüklenen ürünler agaroz jelde yürütülerek elektroforezde amplifiye ürün ve büyüklüğü saptandı. 1µl pozitif kontrol örneği PCR etkinliğini test etmek için kullanıldı.

3.4. MTT Hücre Proliferasyonu Deneyi

Hücre canlılığı ve proliferasyonunun ölçülmesi *in vitro* deneylerdeki hücre popülasyonunun dış etkenlere verdiği yanıtın değerlendirilmesinin temelini oluşturur. Tetrazolyum tuzlarının indirgenmesi hücre proliferasyonunu incelemek için güvenilir bir yol olarak kabul edilmektedir. Sarı tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromid) metabolik olarak aktif hücreler tarafından dehidrogenaz

enzimleriyle NADH ve NADPH oluşturularak indirgenmektedir. Elde edilen hücre içi mor formazan çözünebilir ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. MTT hücre proliferasyon deneyi hücre miktarını ölçmektedir. MTT düşük hücre yoğunluğunda düşük absorbans değerleri vermektedir. Her hücre tipi için hücre sayısı ile üretilen sinyal arasında ayrı doğrusal ilişki kurularak hücre proliferasyonu oranındaki değişikliklerin doğru bir şekilde ölçülmesi sağlanır.

MTT için hücre sayımının yapılması: Flask içerisindeki hücrelerin mikroskop altında canlılığı ve yoğunluğu kontrol edildikten sonra dikey akım kabininde besiyeri uzaklaştırıldı. 3 ml PBS ile hücreler yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 3 ml %0.05 tripsin-EDTA eklendi. 4-6 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin flask tabanından ayrıldığı görüldükten sonra 7ml besiyeri eklenerek karışım cam pipet yardımı ile santrifüj tüpüne aktarıldı. 2000 devir/dakika hızda 6 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pelletten uzaklaştırıldı. Pellet 5ml besiyeri eklenerek tekrar karıştırıldı. 15 µL tripan mavisi ile elde edilen süspansiyondan 15 µL karıştırıldı, bekletilmeden Neubauer sayım lamına uygulandı. Işık mikroskobu altında, Neubauer sayım lamını oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç üzerlerindeki parlak ve renksiz olan yaşayan hücreler soldan sağa ve yukarıdan aşağıya gidilerek sayıldı. Yaşayan hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra (hücre sayısı x 10000x2/4) hücre süspansiyonu besi yeri ile seyreltilerek planlanan sayıda hücre ekimine hazır hale getirildi.

MEL 270, OMM2.5, 92.1 ve MP46 hücre hatları için 4 farklı 96 kuyucuklu steril plak hazırlandı. 96 kuyucuklu steril plaklara 2000'den 20000'e artan sayılarda (her sütunda 3 kuyucuk eşit sayıda hücre eklenmiş, 3 kuyucuk hücresiz kontrol grubu oluşturacak şekilde) hücre ekildi. 37°C CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyon yapıldı. Her kuyucuğa 25 µL MTT solüsyonu eklendi. 4 saat inkübasyondan sonra mor formazan görünür hale gelince her kuyucuğa 75 µL MTT çözücü DMSO (dimetil sülfoksit) eklendi. 24 saat inkübasyondan sonra spektrofotometrede (570 nm) absorbans kaydı yapıldı.

3.5. XTT Hücre Proliferasyonu Deneyi

MTT ve XTT hücre canlılığı ve proliferasyonunun ölçülmesi için kullanılan benzer çalışma prensiplerine sahip metotlardır. MTT çözünmeyen formazan içerdiği için 4 saat sonra eklenmesi gereken bir çözücüye ihtiyaç duyar. XTT çözünebilir boya

içerir. Çözücüye ihtiyaç duymaması ve daha kısa sürede daha az basamaklı protokole sahip olması nedeniyle tercih edildi.

XTT (*Biological Industries İsrail*) metabolik aktif hücrelerin tetrazolyum tuzlarını turuncu renkli formazana indirgenmesi prensibi ile çalışmaktadır. Üretici kılavuzlarına göre, XTT eklendikten sonra 2-24 saatlik inkübasyon süresi önerilmektedir. Metabolik aktif hücre sayısı, aktif mitokondriyel enzim miktarı, boya konsantrasyonunun artması spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir.

96 kuyucuklu steril plaklara 50µl besiyeri içerisinde hücre süspansiyonu eklendi. Hücresiz kontrol kuyucukları da hazırlandı. 37°C CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyon yapıldı. -20 °C'da saklanan reaktif çözelti ve aktivasyon çözeltisi 37°C lik su banyosunda berraklaşınca kadar çözüldü. 0.1 ml aktivasyon çözeltisi 5ml XTT reaktif çözeltisi eklenerek reaksiyon çözeltisi oluşturuldu. Her kuyucuğa 50 µL XTT reaksiyon çözeltisi eklendi. Boyanın homojen dağılımı için yatay karıştırıcı yardımı ile karıştırıldı. 4 saat inkübasyondan sonra spektrofotometrede (465 nm) absorbans kaydı yapıldı.

3.6. Dorsomorfin (Compound C) ve A-769662 İlaç Dozlarının Belirlenmesi

AMPK aktivatörü olarak A-769662 (*Abcam, İngiltere*), AMPK inhibitörü olarak Dorsomorfin (Compound C) (*Abcam, İngiltere*) kullanılmıştır. A-769662 etkili, tersinir bir AMPK aktivatörüdür. AMP'yi taklit ederek, AMPK'ı hem allosterik olarak hem de AMPK defosforilasyonunu inhibe ederek aktive etmektedir. Dorsomorfin ise etkili ve tersinir bir AMPK inhibitörüdür.

A-769662 100mM konsantrasyonda DMSO içinde hazırlandı. Dorsomorfin 10mM konsantrasyonda DMSO içinde 55°C su banyosunda ısıtılarak hazırlandı. Protokolde önerildiği gibi 50000 µM A-769662 ve Dorsomorfin hazırlandıktan sonra -20°C'da muhafaza edildi. İlaç ekleneceği zaman sıcaklığın dengelenmesi için oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

Tablo 3.2. Literatürdeki çalışmalarda kullanılan AMPK aktivatörü dozları

A-769662		
Hücre hattı	Konsantrasyon	Aktivite Türü
L6 İskelet Kası Hücresi(77)	250 μ M	AMPK sinyal yolağı aktivasyonu
MDA-MB231 (meme kanseri) (78)	400 μ M	Apoptozis indüksiyonu
Mezenkimal Kök Hücre (79)	10 μ M	AMPK aktivasyonu
Mezenkimal Kök Hücre (79)	100 μ M	Proliferasyonun azalması
AICAR		
Uvea Melanomu (80)	1-2-4mM	Proliferasyonun azalması
AICAR 1-2 mM konsantrasyondaki etkisinin sağlanabilmesi için A-769662 100 μ M -200 μ M konsantrasyonda olması gerektiği belirtilmiştir (81)		

Tablo 3.3. Literatürdeki çalışmalarda kullanılan AMPK inhibitörü dozları

Dorsomorfin		
Hücre hattı	Konsantrasyon	Aktivite Türü
WM983A, SK-Mel-5 ve MALME-3M (melanom hücresi) (82)	20 μ M	Proteozomal degradasyon
U251 (gliom hücresi) (83)	10 μ M	Otofajinin azalması
HCT116, DLD-1, SW480, KM12C (kolorektal CA hücresi)(84)	10 μ M	Proliferasyonun azalması

Literatürdeki çalışmalar incelediğinde A-769662 ve Dorsomorfin dozlarının ve bu dozlardaki DMSO içeriklerinin Tablo 3.4'te belirtilen dozlarda uygulanması kararlaştırıldı.

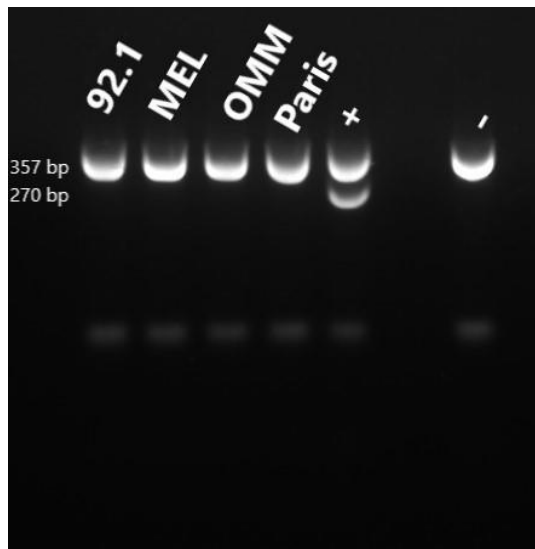
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan A-769662 ve Dorsomorfin dozları ve DMSO içerikleri

A-769662	DMSO % (A-769662)	Dorsomorfin	DMSO % (Dorsomorfin)
200 µM	0,4	20 µM	0.4
143 µM	0.29	14.3 µM	0.29
102 µM	0.2	10.2 µM	0.2
72.9 µM	0.15	7.29 µM	0.15
52.1 µM	0.1	5.21 µM	0.1
37.2 µM	0.07	3.72 µM	0.07
26.6 µM	0.05	2.66 µM	0.05
19 µM	0.04	1.9 µM	0.04
13.6 µM	0.03	1.36 µM	0.03

4. BULGULAR

4.1. Hücre Hatlarının Mikoplazma Kontaminasyonunun Belirlenmesi

Mikoplazma DNA fragmenti 270 bp'de, deney içi kontrol fragmenti 357 bp'de bant vermektedir. Deney içi kontrol bantı her bir örneğin PCR reaksiyonunun etkinliğini onaylamak amacıyla oluşmaktadır. 357 bp'de tek bant olması deneyin düzgün çalıştığını ve mikoplazma negatif olduğunu, pozitif kontrol örnekte olduğu gibi 270 ve 357 bp olmak üzere çift bantın varlığı deneyin düzgün çalıştığını ve mikoplazma pozitif olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, 92.1, MEL 270, OMM2.5 ve MP46 hücre dizilerinde sadece 357 bp'de bant görülmesi hücrelerde herhangi bir mikoplazma kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.



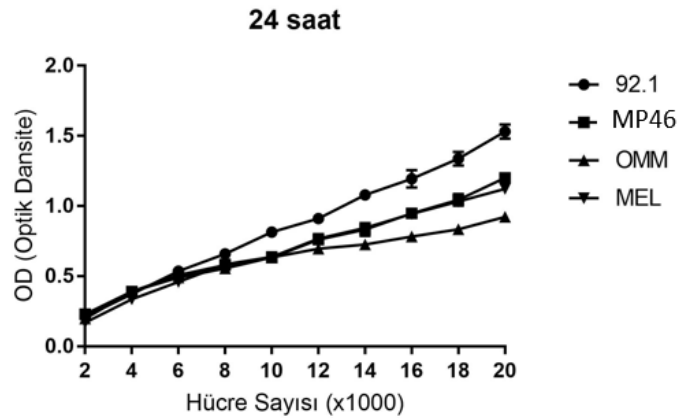
Şekil 4.1. Jel elektroforez sonuçları

4.2. Hücre Hatlarının 24 Saatlik Proliferasyon Hızları

MTT proliferasyon deneyinde plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile ölçülen OD (*optical density*) değerinin optimal olarak sonuçlanması için MEL 270, OMM2.5, 92.1 ve MP46 hücre hatlarından kuyucuklara yerleştirilecek hücre sayısının belirlenmesi amacıyla yapıldı. 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, 14000, 16000, 18000, 20000 hücre aynı sayıdaki 3 hücre hattı ve 3 kontrol kuyucuğu aynı sütunda olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara yerleştirildi. Plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile hücre hatlarının OD değerleri tespit edildi (n=3).

Tablo 4.1. OMM2.5, MEL270, MP46, 92.1 hücre dizilerinin farklı hücre sayılarında OD değerleri

Hücre Sayısı	2000	4000	6000	8000	10000	12000	14000	16000	18000	20000
OMM2.5 (OD)	0.283	0.466	0.583	0.661	0.746	0.809	0.830	0.878	0.960	1.057
	0.288	0.489	0.592	0.639	0.717	0.772	0.796	0.869	0.886	0.995
	0.293	0.486	0.568	0.639	0.707	0.777	0.819	0.869	0.925	0.985
MEL270 (OD)	0.258	0.393	0.535	0.635	0.695	0.830	0.938	1.009	1.088	1.228
	0.237	0.420	0.522	0.676	0.719	0.859	0.912	1.019	1.123	1.168
	0.233	0.408	0.537	0.659	0.719	0.834	0.903	1.023	1.107	1.190
MP46 (OD)	0.546	0.712	0.847	0.916	0.983	1.114	1.199	1.284	1.405	1.542
	0.525	0.710	0.817	0.882	0.941	1.045	1.120	1.252	1.343	1.514
	0.556	0.690	0.802	0.883	0.913	1.064	1.120	1.250	1.326	1.487
92.1 (OD)	0.292	0.429	0.603	0.723	0.847	0.975	1.147	1.195	1.457	1.545
	0.280	0.451	0.607	0.732	0.903	0.981	1.129	1.314	1.359	1.644
	0.266	0.445	0.602	0.728	0.899	0.980	1.279	1.279	1.404	1.607



Grafik 4.1. OMM2.5, MEL270, MP46, 92.1 hücre dizilerinin hücre sayılarına göre OD değişimi

4.3. Hücre Hatlarının 48 Saatlik Proliferasyon Hızları

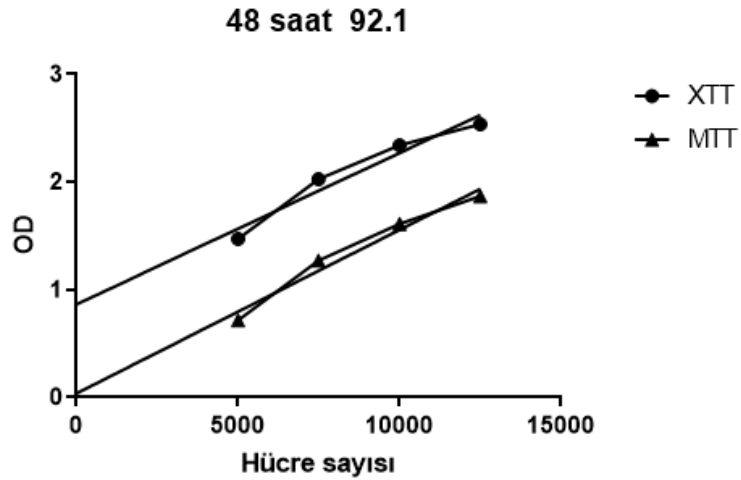
MTT ve XTT hücre canlılığı ve proliferasyonunun ölçülmesi için kullanılan benzer çalışma prensiplerine sahip metotlardır. MTT çözünmeyen formazan içerdiği için 4 saat sonra eklenmesi gereken bir çözücüye ihtiyaç duyar. XTT çözünebilir boya içerir. Çözücüye ihtiyaç duymaması ve daha kısa sürede daha az basamaklı protokole sahip olması nedeniyle bu aşamadan sonraki proliferasyon deneylerinin XTT ile

tamamlanmasına ve hücre inkübasyon süresinin 48 saate yükseltilmesine karar verildi.

XTT proliferasyon deneyinde plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile ölçülen OD değerinin optimal olarak sonuçlanması amacıyla MEL270, OMM2.5, 92.1 ve MP46 hücre hatlarından kuyucuklara yerleştirilecek hücre sayısının belirlenmesi amacıyla yapıldı. 96 kuyucuklu plaklara 92.1 hücre dizisine ait 5000, 7500, 10000, 12500 aynı sayıdaki 3 hücre hattı ve 1 kontrol kuyucuğu aynı sütunda olacak şekilde 2 adet 96 kuyucuklu plaklara yerleştirildi. Plaklardan biri MTT proliferasyon deneyi uygulanarak plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile hücre hatlarının OD değerleri tespit edildi. Diğer plakta XTT proliferasyon deneyi uygulanarak plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile hücre hatlarının OD değerleri tespit edildi.

Tablo 4.2. 92.1 hücre dizilerinin farklı hücre sayılarında XTT ve MTT proliferasyon deneylerinde OD değerleri

Hücre Sayısı	5000	7500	10000	12500
92.1 (MTT) OD	0.719	1.240	1.613	1.904
	0.711	1.310	1.608	1.832
92.1 (XTT) OD	1.433	2.004	2.384	2.609
	1.507	2.004	2.300	2.465



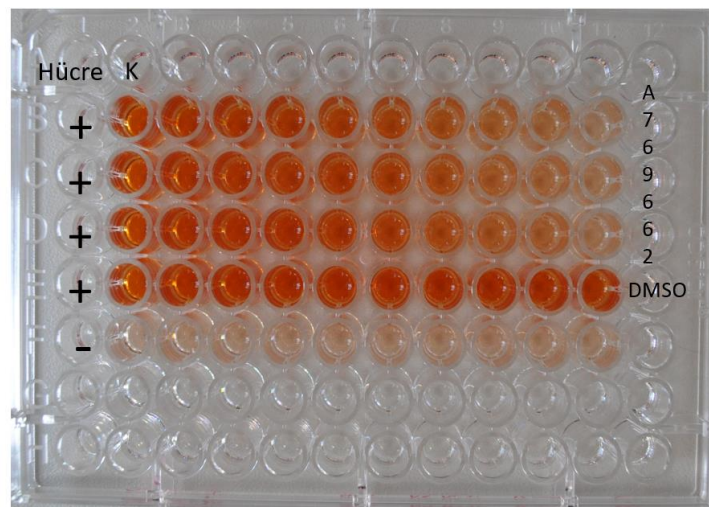
Grafik 4.2. 92.1 hücre dizilerinin hücre sayılarına göre XTT ve MTT hücre proliferasyon deneylerinde OD değişimi

92.1 hücre dizisi için XTT ve MTT hücre proliferasyon deneyi sonuçları karşılaştırıldı. AMPK modülasyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin inceleneceği 48 saatlik XTT deneyinde ilaç eklenmemiş kontrol kuyucuğunda plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile ölçülen hücre hatlarının OD sonucunun yaklaşık 1 A.U. (*absorbance units*) değerinde olması hedeflendi. Bu hedefe ulaşabilmek için her kuyucuğa 92.1 hücre hattından 3000, MP46 ve OMM2.5 hücre hattından 4000, MEL270 hücre hattından 5000 hücre ekilmesi planlandı.

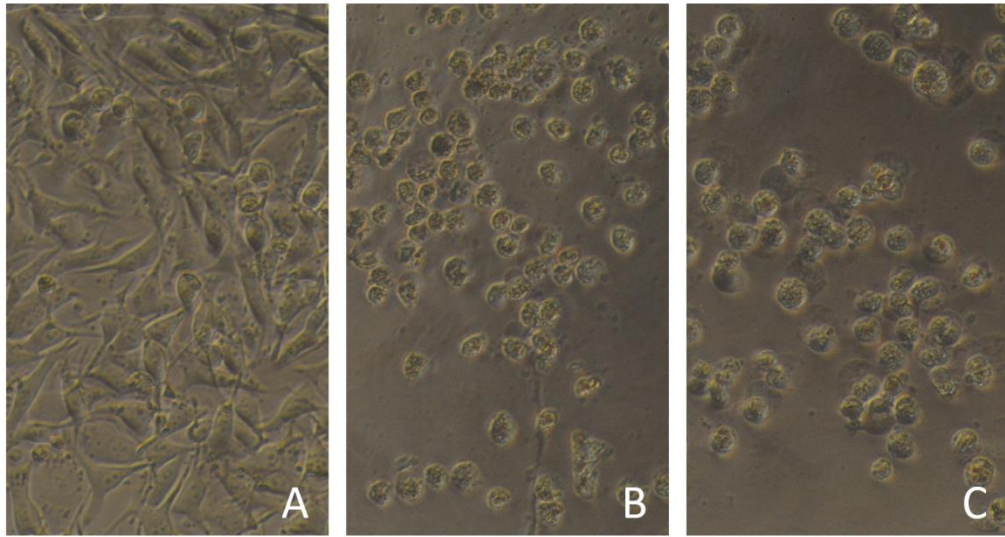
4.4. AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi

4.4.1. 92.1 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi

92.1 hücre hattı hücrelerine AMPK aktivatörü (A-769662) ve AMPK inhibitörünün (Dorsomorfin) hücre proliferasyonu düzeyinde etkisinin gözlenmesi amaçlanarak XTT hücre proliferasyon deneyi gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu steril plaklara aynı sütunda A-769662 (n=3), A-769662 için gerekli olan DMSO miktarı (n=1) 3000 hücre üzerine eklendi. A-769662 dozu Tablo 4.3'te belirtilen dozlarda hazırlandı. Referans ölçüm için hücresiz bir kuyu hazırlandı. XTT proliferasyon deneyi uygulanarak plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile hücrelerin OD değerleri tespit edildi. Dorsomorfin için de Tablo 4.4'te belirtilen dozlarda aynı şekilde 96 kuyucuklu bir plak hazırlanarak XTT proliferasyon deneyi uygulandı.



Şekil 4.2. 92.1 hücre dizisinin 96 kuyucuklu plakta XTT hücre proliferasyon deneyi (+): hücre var, (-): hücre yok, K: kontrol



Şekil 4.3. 92.1 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü incelendiğinde belirtilen ilaç dozlarında hücrelerin normal morfolojilerini kaybettikleri gözlemlendi.

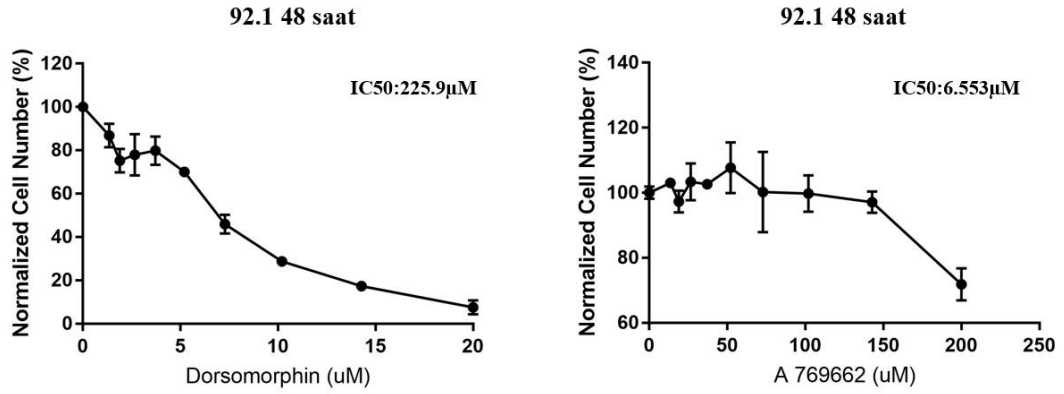
A. 92.1 kontrol grubu **B.** 200 μ M A-769662 **C.** 20 μ M Dorsomorfin hücrelerin belirtilen ilaç dozu uygulaması sonucu morfolojilerini kaybettikleri parlak alan mikroskopisi ile gözlemlenmiştir.

Tablo 4.3. 92.1 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

A-769662 (μ M)	Kontrol	13.6	19	26.6	37.2	52.1	72.9	102	143	200
92.1 (OD)	1.221	1.265	1.282	1.291	1.255	1.413	1.541	1.283	1.175	1.007
	1.229	1.255	1.197	1.156	1.260	1.245	1.269	1.192	1.125	0.884
	1.265	1.233	1.234	1.223	1.242	1.419	1.241	1.333	1.203	0.914

Tablo 4.4. 92.1 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

Dorsomorfin (μ M)	Kontrol	1.36	1.9	2.66	3.72	5.21	7.29	10.2	14.3	20
92.1 (OD)	1.302	1.110	0.977	0.922	0.784	0.676	0.621	0.387	0.230	0.057
	1.268	1.040	0.984	0.832	0.865	0.703	0.600	0.386	0.248	0.148
	1.205	1.180	1.109	1.059	0.924	0.697	0.518	0.350	0.283	0.110

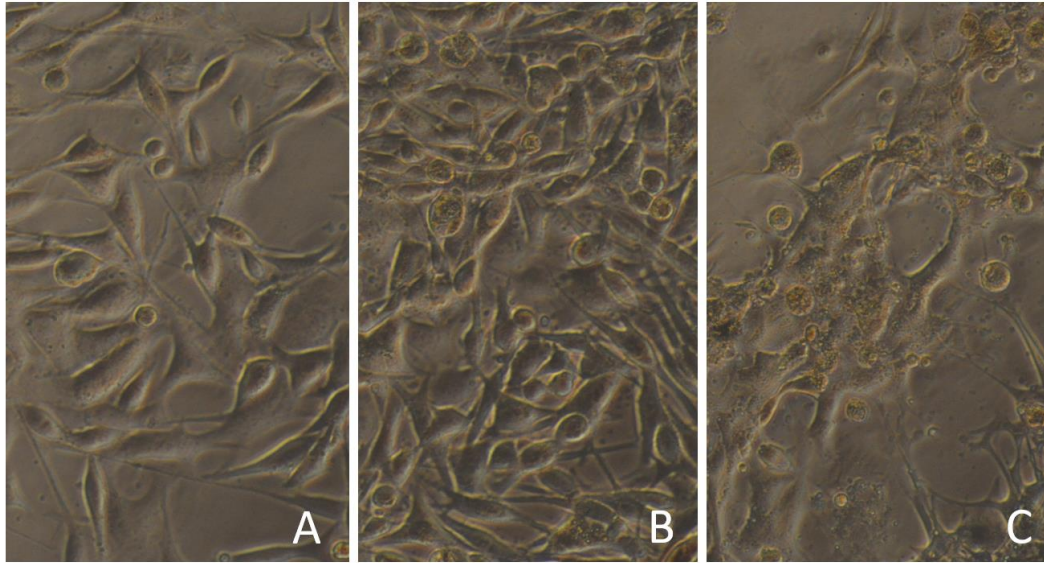


Grafik 4.3. 92.1 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi

IC50 değerleri nonlinear regresyon modeli analizi sonucu elde edilmiştir.

4.4.2. MP46 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi

MP46 hücre hattı hücrelerine AMPK aktivatörü (A-769662) ve AMPK inhibitörünün (Dorsomorfin) hücre proliferasyonu düzeyinde etkisinin gözlenmesi amaçlanarak XTT hücre proliferasyon deneyi gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu steril plaklara aynı sütunda A-769662 (n=3), A-769662 için gerekli olan DMSO miktarı (n=1) 4000 hücre üzerine eklendi. A-769662 dozu Tablo 4.5'te belirtilen dozlarda hazırlandı. Referans ölçüm için hücresiz bir kuyu hazırlandı. XTT proliferasyon deneyi uygulanarak plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile hücrelerin OD değerleri tespit edildi. Dorsomorfin için de Tablo 4.6'da belirtilen dozlarda aynı şekilde 96 kuyucuklu bir plak hazırlanarak XTT proliferasyon deneyi uygulandı.



Şekil 4.4. MP46 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü

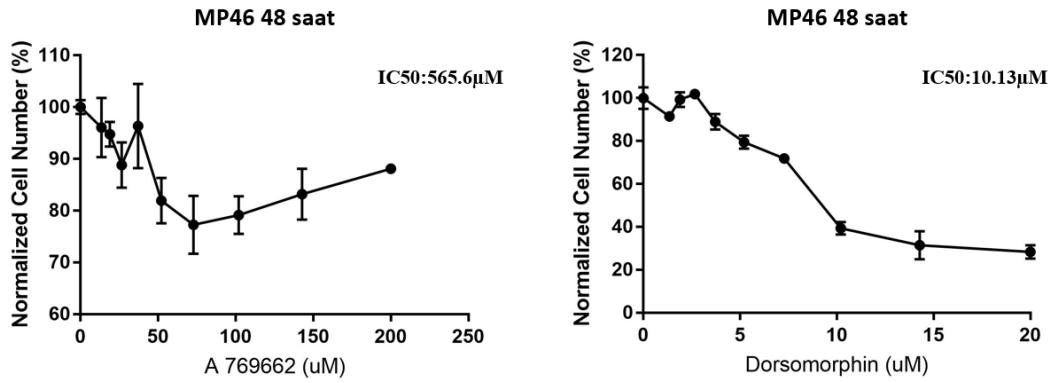
A. MP46 kontrol grubu **B.** %0.4 DMSO **C.** 20 μ M Dorsomorfin hücrelerin belirtilen ilaç dozu uygulaması sonucu normal morfolojilerini kaybettikleri parlak alan mikroskopisi ile gözlemlenmiştir.

Tablo 4.5. MP46 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

A-769662 (μ M)	Kontrol	13.6	19	26.6	37.2	52.1	72.9	102	143	200
MP46	1.141	1.026	1.012	0.935	1.031	0.918	0.803	0.763	0.833	0.752
	1.145	1.067	0.967	0.975	0.872	0.826	0.826	0.819	0.751	0.767
	1.117	0.948	0.972	0.883	0.981	0.889	0.901	0.833	0.835	0.754

Tablo 4.6. MP46 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

Dorsomorfin (μ M)	Kontrol	1.36	1.9	2.66	3.72	5.21	7.29	10.2	14.3	20
MP46	1.022	1.017	1.015	1.030	0.859	0.746	0.625	0.482	0.271	0.261
	1.130	1.005	0.953	1.009	0.898	0.781	0.620	0.446	0.236	0.277
	1.067	0.981	1.007	0.992	0.933	0.806	0.622	0.417	0.353	0.322

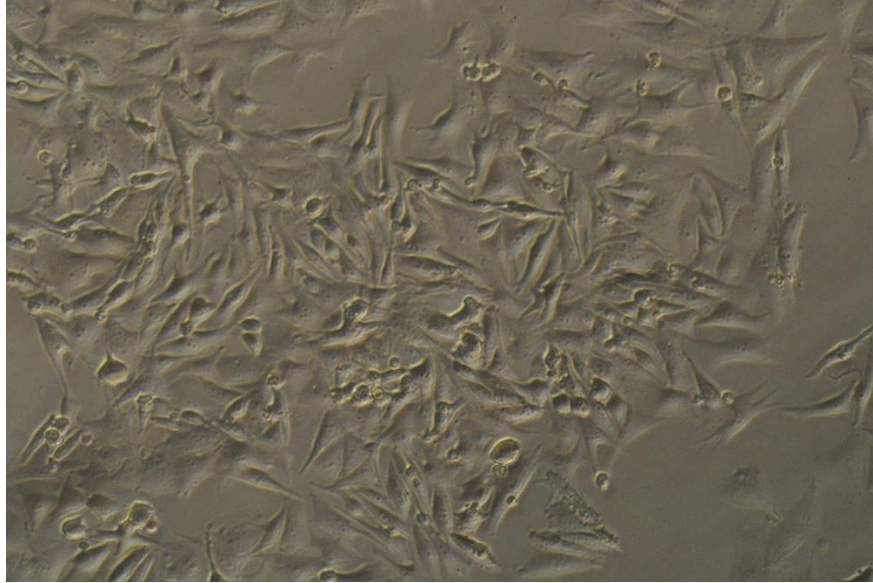


Grafik 4.4. MP46 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi

IC50 değerleri nonlinear regresyon modeli analizi sonucu elde edilmiştir.

4.4.3. OMM2.5 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi

OMM2.5 hücre hattı hücrelerine AMPK aktivatörü (A-769662) ve AMPK inhibitörünün (Dorsomorfin) hücre proliferasyonu düzeyinde etkisinin gözlenmesi amaçlanarak XTT hücre proliferasyon deneyi gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu steril plaklara aynı sütunda A-769662 (n=3), A-769662 için gerekli olan DMSO miktarı (n=1) 4000 hücre üzerine eklendi. A-769662 dozu Tablo 4.7’de belirtilen dozlarda hazırlandı. Referans ölçüm için hücresiz bir kuyu hazırlandı. XTT proliferasyon deneyi uygulanarak plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile hücrelerin OD değerleri tespit edildi. Dorsomorfin için de Tablo 4.8’de belirtilen dozlarda aynı şekilde 96 kuyucuklu bir plak hazırlanarak XTT proliferasyon deneyi uygulandı.



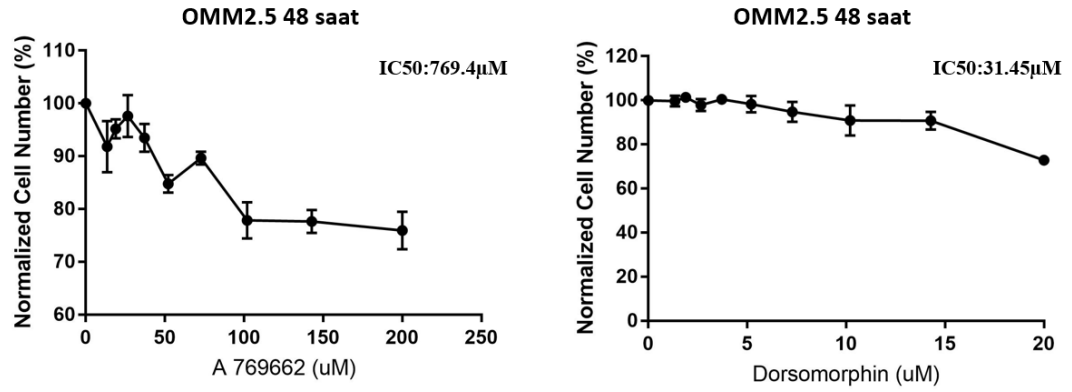
Şekil 4.5. OMM2.5 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü

Tablo 4.7. OMM2.5 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

A-769662 (μM)	Kontrol	13.6	19	26.6	37.2	52.1	72.9	102	143	200
OMM2.5	1.153	1.115	1.100	1.146	1.057	1.000	1.088	0.926	0.923	0.818
	1.163	1.093	1.142	1.073	1.035	0.962	0.984	0.933	0.876	0.751
	1.155	1.206	1.122	1.065	0.999	0.974	0.985	1.002	0.916	0.761

Tablo 4.8. OMM2.5 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

Dorsomorfin (μM)	Kontrol	1.36	1.9	2.66	3.72	5.21	7.29	10.2	14.3	20
OMM2.5	1.438	1.458	1.413	1.370	1.341	1.393	1.317	1.392	1.193	1.023
	1.458	1.429	1.414	1.420	1.352	1.326	1.268	1.265	1.283	1.023
	1.476	1.389	1.426	1.346	1.352	1.293	1.198	1.202	1.188	1.062

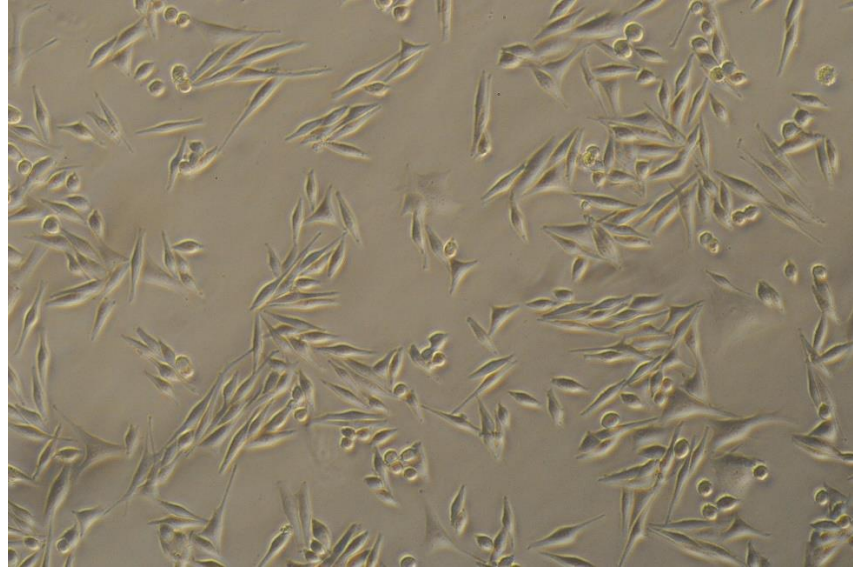


Grafik 4.5. OMM2.5 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi

IC50 değerleri nonlinear regresyon modeli analizi sonucu elde edilmiştir.

4.4.4. MEL270 Hücre Dizisinde AMPK Modülasyonunun Hücre Proliferasyonuna Etkisi

MEL270 hücre hattı hücrelerine AMPK aktivatörü (A-769662) ve AMPK inhibitörünün (Dorsomorfin) hücre proliferasyonu düzeyinde etkisinin gözlenmesi amaçlanarak XTT hücre proliferasyon deneyi gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu steril plaklara aynı sütunda A-769662 (n=3), A-769662 için gerekli olan DMSO miktarı (n=1) 5000 hücre üzerine eklendi. A-769662 dozu Tablo 4.9'daki gibi hazırlandı. Referans ölçüm için hücresiz bir kuyu hazırlandı. XTT proliferasyon deneyi uygulanarak plak okuyucu spektrofotometri cihazı ile hücrelerin OD değerleri tespit edildi. Dorsomorfin için de Tablo 4.10'da belirtilen dozlarda 96 kuyucuklu bir plak hazırlanarak XTT proliferasyon deneyi uygulandı.



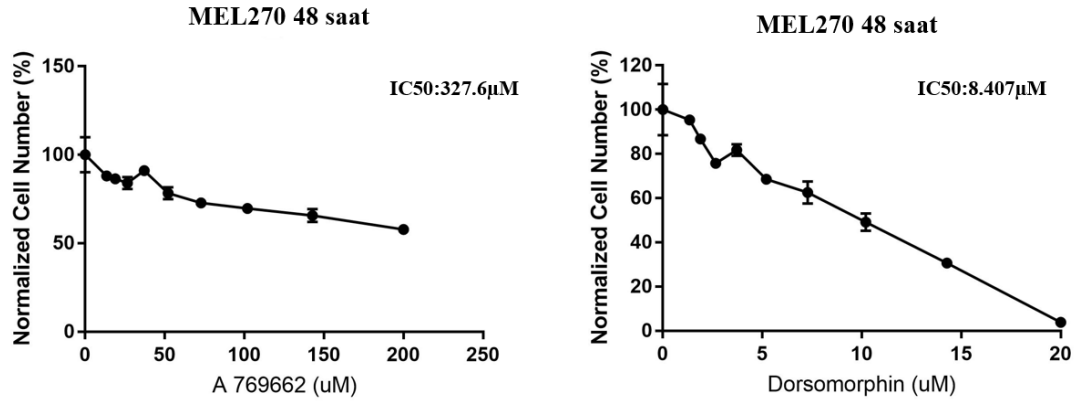
Şekil 4.6. MEL270 hücre dizisinin parlak alan mikroskopisi altındaki görüntüsü

Tablo 4.9. MEL270 hücre dizisinde farklı A-769662 dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

A-769662 (μM)	Kontrol	13.6	19	26.6	37.2	52.1	72.9	102	143	200
MEL270	0.929	0.775	0.705	0.746	0.738	0.638	0.618	0.565	0.570	0.488
	0.762	0.762	0.733	0.696	0.722	0.674	0.618	0.605	0.553	0.486
	0.872	0.779	0.741	0.695	0.727	0.696	0.645	0.580	0.615	0.484

Tablo 4.10. MEL270 hücre dizisinde farklı Dorsomorfin dozlarının 48 saat uygulanması sonucunda OD değerleri

Dorsomorfin (μM)	Kontrol	1.36	1.9	2.66	3.72	5.21	7.29	10.2	14.3	20
MEL270	0.890	0.936	0.860	0.801	0.830	0.748	0.681	0.442	0.285	0.036
	0.881	0.926	0.891	0.844	0.854	0.735	0.580	0.515	0.298	0.039
	0.897	0.900	0.850	0.816	0.802	0.721	0.629	0.498	0.290	0.045



Grafik 4.6. MEL270 hücre dizilerinin 48 saatlik farklı A-769662 ve Dorsomorfin dozlarında hücre proliferasyonu değişimi

IC50 değerleri nonlineer regresyon modeli analizi sonucu elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada farklı moleküler profillerdeki 92.1, MP46, OMM2.5 ve MEL270 uvea melanomu hücre hatlarına farklı dozlarda AMPK aktivatör ve inhibitör ajanları uygulanmıştır. AMPK hücrenin çeşitli metabolik stres durumlarında aktive olarak hücredeki enerji homeostazını sağlayan önemli bir proteindir (19). 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 artmakta, yağ asidi, kolesterol ve protein sentezi anabolik reaksiyonlar baskılanmaktadır (21). AMPK sağlıklı hücrenin kanser hücresine dönüşümünde ve tümör gelişiminde metabolik adaptasyonu sağlayarak önemli rol oynamaktadır. AMPK'ın karsinogenez üzerine olan etkisi iki yönlüdür (85). AMPK'ın önemli yollarda görevli birçok proteini fosforile ederek, immun regülasyona etki ederek hücre bölünmesini çeşitli aşamalarda durduran bir tümör supresör olarak değerlendirildiği birçok çalışma mevcuttur. Aynı zamanda AMPK'ın tümör hücresinin karşılaştığı strese karşı hücrenin enerji ve oksidoredüksiyon metabolizmasını düzenleyerek tümörün direncini artırabileceğini, metastaz ve ilaç direnç mekanizmalarında görev alabileceğini destekleyen çalışmalar da mevcuttur (85). Çalışmalardaki bu çelişkili durumun tümörün moleküler profiline ve mikroçevre koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir (23, 24).

Çalışmamızda farklı uvea melanomu hücre dizilerinin AMPK aktivatör ve inhibitör ajanların farklı dozlarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Gözlenen değişimler farklı ilaç dozlarında kendi aralarında ve kendi grubunda ilaç inkübe edilmemiş kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır.

Hücre dizilerinin 24 saatlik proliferasyon hızları sırasıyla en hızlı proliferen olan 92.1 olmak üzere MP46, OMM2.5, MEL270 şeklindedir. Hücrelerin proliferasyon hızları ve farklı ilaç gruplarına verdikleri proliferasyon yanıtları arasında ilişki gözlenmemiştir. Tüm hücre dizilerinin AMPK aktivatörüne cevabı (92.1 hücre dizisine eklenen 50 µM AMPK aktivatörü dışında) aynı hücre dizisinin ilaç eklenmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda azalma olduğu gözlenmiştir. Bu azalmanın AMPK'ın tümör supresör etkisini ortaya çıkaracak yolların aktive edilerek hücre bölünmesinin durdurulması sonucu geliştiği

düşünülebilir. Aynı hücre dizisinde hücre proliferasyonundaki azalma miktarı ve doz artışı arasında bir ilişki gözlenmemiştir. MP46 hücre dizisinin 50 μ M üzerindeki AMPK aktivatörünün artan dozlarda uygulanmasına proliferasyondaki azalma olarak verdiği yanıt diğer hücre dizilerinin aksine giderek azalmıştır. Bu durum hücre dizisinde yükselen ilaç dozlarına, tümör hücrelerinin direncini artıran farklı bir yolağın aktivasyonu ile cevap vermesiyle ilişkili olabilir. Gelecekte moleküler düzeyde aktive edilen yolakların incelenmesi ve daha uzun süreli ilaç uygulamalarıyla bu direncin diğer hücre dizilerinde gelişip gelişmeyeceği test edilebilir.

Tüm hücre dizilerinin 5 μ M üzerindeki AMPK inhibitörünün artan dozlarda uygulanmasına verdiği yanıt, doz arttıkça proliferasyonun daha da azalması olarak gözlenmiştir. AMPK'ın kanser hücresi metabolizması üzerindeki rolü düşünüldüğünde hücrenin proliferasyonu ve hayatta kalması için fonksiyonu oldukça önemlidir. OMM2.5 hariç hücre dizilerinin 20 μ M AMPK inhibitörüne cevabı aynı hücre dizisinin ilaç eklenmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda %50'nin üzerinde azalma olduğu gözlenmiştir. AMPK inhibitörünün tüm dozlarında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunun azalmasının nedeni hücrenin enerji homeostazının en önemli düzenleyicisi AMPK'ın inhibe edilmesi ile hücrenin canlılığı ve proliferasyonu için gerekli enerji dengesinin sağlanamaması olabilir.

OMM2.5, MEL270, MP46, 92.1 hücre dizilerinin daha önceki çalışmalarda bahsedilen klinik, genetik ve patolojik özellikleri incelenmiştir. OMM2.5 metastatik uvea melanomu hastasının metastaz doku örneğinden geliştirilmiştir. *BAP1* mutasyonu (+), 8q kazanımı (+)'dir. MEL270 koroidal nevüs ile takip altında uvea melanomu gelişmesi üzerine radyoterapi ile tedavi edilen (takiplerde lokal rekürens ve metastaz gelişmiş) hasta doku örneğinden geliştirilmiştir. Primer uvea melanomu hücre dizisidir. *GNAQ* mutasyonu (+), 8q kazanımı (+)'dir. MP46 hücre dizisinin *BAP1* mutasyonu (-), 8q kazanımı (+) olduğu tespit edilmiştir. 92.1 ekstaraoküler invazyonu ve metastazı olan hasta doku örneğinden geliştirilmiş, primer uvea melanomu hücre dizisidir. 8q kazanımı (+), *BAP1* mutasyonu (-), dizomi 3, *EIF1AX* mutasyonu (+) olduğu belirtilmiştir (87). Çalışmamızda OMM2.5 hücre dizilerinden metastaz dokusundan geliştirilmiş tek hücre dizisidir. Hücre dizileri arasında AMPK inhibitörüne en dirençli hücre dizisi olması arasında bir ilişki olabilir. Gelecekte

moleküler düzeyde yapılacak araştırmalarla AMPK'ın metastatik uvea melanomundaki ilaç direncinde rolü araştırılabilir.

Al-Moujahed ve arkadaşları MEL270, MEL202 ve 92.1 uvea melanomu hücre dizilerine AICAR (AMPK aktivatörü) uygulandığında hücre proliferasyonunun azaldığını tespit etmiştir. Hücre dizilerinde 4E-BP1'in (mTOR yolağı aktivasyonu ilişkili) azaldığı, siklin A1 ve siklin D1 in azaldığı (G1-S fazında bölünme sürecinin durdurulmasıyla ilişkilendirilmiştir) ve otofaji markerlarında belirgin bir değişiklik görülmediği belirtilmiştir. AMPK aktivatörünün hücre toksisitesinin düşük olduğu vurgulanmış, uvea melanomu tedavisinde AMPK aktivatörlerinin etkili olabileceği saptanmıştır. AICAR AMP benzeri etki göstererek selektif olmayan AMPK aktivasyonu sağlamaktadır. Bizim alışmamızda AMPK'ı yüksek spesifik özellikte allosterik olarak aktive eden A-769662 kullanılmıştır (80, 86).

Ambrosini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada GNAQ mutasyonu olan uveal melanom hücrelerinde MEK-AKT yolağı aracılığı ile AMPK regülasyonu hedef olarak kullanılmıştır. AMPK aktivasyonu ile otofaji aracılı hücre ölümü gerçekleşirken AMPK inhibe edildiğinde apoptozis aracılı hücre ölümü gözlenmiştir (87).

Sevim ve Kıratlı'nın yaptığı çalışmada düşük serum adiponektin düzeyi ve insülin direncinin uvea melanomu gelişimi ve agresif klinik seyri ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. Adiponektinin hücrede AMPK aktivasyonuna neden olduğu bu sayede insülin direncini azalttığı bilinmektedir. Düşük serum adiponektin düzeyi ve insülin direnci sonucunda AMPK aktivasyonu azalmıştır. AMPK'ın aktivasyonundaki azalma tümör supresör özelliğinin azalmasına neden olarak tümör başlangıcına ve daha agresif tümör hücreleri gelişmesine neden olmuş olabilir (88).

Kutanöz melanomda yapılan çalışmalarda BRAF V600E mutasyonu taşıyan tümör hücrelerinde LKB1'in ERK ve RSK aracılığı ile fosforile edilerek inaktif hale gelmesiyle AMPK inhibe edilir. AMPK'ın inhibisyonunun tümör progresyonuna neden olduğu düşünölmektedir. BRAF V600E mutasyonuna sahip hücrelerde LKB1'in defosforile edilmesi ile melanom hücrelerinde bölünmenin durdurulduğu saptanmıştır (89). LKB1'in AMPK dışındaki etkileri ve diğer kullanılan moleküller aracılığı ile hücrenin strese direncinin sağlanabilmesi bizim çalışmamızın aksine AMPK inhibisyonunun tümörigenezis lehine sonuçlanmasına neden olmuş olabilir.

Küçük hücreli akciğer kanseri hastalarının yaklaşık yarısında LKB1'i kodlayan genlerde mutasyon saptanmıştır. Hücrenin tümör gelişimine AMPK'ı aktive ederek yanıt verememesi nedeniyle hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Sigara kullanan hastalarda LKB1 mutasyonu ve düşük AMPK aktivitesi daha sık saptanmıştır. Hastaların AMPK aktivasyonunun yüksek olması iyi prognoz ve uzun sağkalımla ilişkilendirilmiştir (90, 91).

Astroitik tümörlerde yapılan hayvan çalışmasında AMPK aktivasyonu ile retinoblastom proteinin fosforile edilmesinin tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı saptanmıştır (92). Hepatoselüler ve meme kanseri hücre dizilerinde yapılan gerçek zamanlı hücre analizi ile düşük dozlarda AMPK aktivatörünün hücre proliferasyonunda artışa neden olduğu yüksek dozlarda bu etkinin tersine döndüğü tespit edilmiştir (93). AMPK aktivatörü glioblastom hücresinde lipogenezi durdurarak, kolon kanserinde NF-kB yolağı ile apoptozu indükleyerek, akut lenfoblastik lösemide p21 etkisini artırarak tümör gelişimini önlediği tespit edilmiştir (80). Çalışmalarda belirtildiği gibi AMPK'ın karsinogenez üzerinde etkisi iki yönlüdür, farklı kanser türlerinde farklı moleküler mekanizmalar üzerinden etki göstererek etki etmektedir. AMPK'ın karsinogenez üzerindeki etkileri moleküler düzeyde anlaşabildiği takdirde AMPK modülatörü ajanlar ile kanser hücrelerinin hedeflenebileceği ve bu sayede ortalama sağkalım artırılabilceği düşünülmektedir (93).

Uvea melanomu hücre dizileri sayısı çalışılan tüm merkezlerde sınırlıdır. Çalışmaların sonucunda çoğu uvea melanomu hücre dizisi geliştirme denemesi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Hücre dizisi elde edilebilen uvea melanomlarının klinik ve patolojik özellikleri hastalığın genel özelliklerinden farklı olduğu gözlenmiştir. Metastaz gelişen uvea melanomu hastalarında monozomi 3 ve *BAP1* mutasyonu sık görülmektedir. Uvea melanomu hücre dizilerinin metastaz geliştirmiş hasta örneklerinden hazırlanmış olsa bile karyotip analizinde dizomi 3 görülmesi, *GNAQ/GNA11* mutasyonu yokluğu hücre dizisi oluşturabilen hücre klonunun ancak bu özelliklere sahip hücreler arasından gelişebilmesi ile açıklanmıştır. Tüm bu kısıtlamalara rağmen uvea melanomu ile ilgili çalışmalarda kullanılmakta ve uvea melanomunu in vitro koşullarda yansıttığı düşünülmektedir (94).

Çalışmamızda 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucunda hücre proliferasyon analizi elde edilmiştir. Tümör hücrelerinin değişim ve farklı koşullara adaptasyonunun kuvvetli olduğu göz önüne alınarak daha uzun süreli ilaç inkübasyonu yapılması ilaç direncinin gözlenmesi açısından önemli olabilir. AMPK'ın immün sistemdeki önemi göz önüne alındığında, AMPK modülasyonunun anti-tümör immün yanıtlar için ne kadar kritik olduğu görülebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda farklı kanser türlerinde AMPK modülasyonunun farklı yolları etkileyerek protümöral ve antitümöral yanıtlara neden olduğu görülmüştür. Çalışmamızda hücre proliferasyonunun azalmasında etkili olan moleküler mekanizmaların incelenmemiş olması, immün yanıtların araştırılmaması ve ilaç inkübasyon süresinin değişimi ile gelişebilecek ilaç direncinin gözlenememesi çalışmanın kısıtlayıcılarıdır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, karsinogenez başlangıcı ve gelişiminde hücre metabolizmasında temel düzenleyici özelliklere sahip olduğu bilinen AMPK'nın modülasyonunun farklı uvea melanomu hücre dizilerinde hücre proliferasyonu ve sağkalımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. AMPK aktivatörü ve AMPK inhibitörü ile 48 saat inkübe edilen tüm hücre dizilerinde (92.1 <50 µM AMPK aktivatörü uygulaması dışında) hücre proliferasyonunda azalma gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda AMPK modülasyonunun karsinogenez üzerinde antitümöral ve protümöral olarak etki edebileceği vurgulanmış, henüz AMPK'nın karsinogenezdeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır (85). Bu durum kanser heterojenitesine dikkat çekmekte ve dolayısıyla kanser metabolizmasını hedef alan anti-kanser tedavi stratejilerinin farklı kanserlerde dikkatle uygulanması gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu çalışma ile uvea melanomunda AMPK'a yönelik anti-kanser stratejilerin belirlenebilmesine katkı sağlanmıştır. Takip eden çalışmalarda AMPK modülasyonunun moleküler düzeydeki etkilerinin kavranması ve *in vivo* etkilerinin değerlendirilmesi ile AMPK'nın uvea melanomu üzerindeki etkileri detaylandırılacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 1998;83(8):1664-78.
2. Singh N, Bergman L, Seregard S, Singh AD. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Clinical Ophthalmic Oncology: Springer*; 2014. p. 75-87.
3. Mahendraraj K, Lau CS, Lee I, Chamberlain RS. Trends in incidence, survival, and management of uveal melanoma: a population-based study of 7,516 patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database (1973–2012). *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2016;10:2113.
4. Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, Capocaccia R, Biggeri A, Crocetti E, et al. Incidence of uveal melanoma in Europe. *Ophthalmology*. 2007;114(12):2309-15. e2.
5. Singh AD, Topham A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973–1997. *Ophthalmology*. 2003;110(5):956-61.
6. McLean IW, Saraiva VS, Burnier Jr MN. Pathological and prognostic features of uveal melanomas. *Canadian journal of ophthalmology*. 2004;39(4):343-50.
7. Mudhar H, Sisley K, Rundle P, Singh A, Rennie I. A critical appraisal of the prognostic and predictive factors for uveal malignant melanoma. *Histopathology*. 2004;45(1):1-12.
8. Damato B. Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival? *British journal of cancer*. 2010;103(3):285-90.
9. Tarlan B, Kıratlı H. Uvea Melanomu; Tanı ve Tedavide Güncel Yaklaşımlar. *Turk J Ophthalmol*. 2016;46:123-37.
10. Seddon JM, Gragoudas ES, Egan KM, Glynn RJ, Howard S, Fante RG, et al. Relative survival rates after alternative therapies for uveal melanoma. *Ophthalmology*. 1990;97(6):769-77.
11. Hawkins B. The Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma: IV. Ten-year mortality findings and prognostic factors. COMS report number 24. *American journal of ophthalmology*. 2004;138(6):936-51.
12. Diener-West M, Reynolds SM, Agugliaro DJ, Caldwell R, Cumming K, Earle JD, et al. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)*. 2005;123(12):1639-43.
13. Gragoudas ES, Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, Walsh SM, Finn SM, et al. Survival of patients with metastases from uveal melanoma. *Ophthalmology*. 1991;98(3):383-90.

14. Singh AD, Borden EC. Metastatic uveal melanoma. *Ophthalmology clinics of North America*. 2005;18(1):143.
15. Koopmans AE, de Klein A, Naus NC, Kilic E. Diagnosis and Management of Uveal Melanoma. *Journal-Diagnosis and Management of Uveal Melanoma*. 2013.
16. Augsburger JJ, Corrêa ZM, Shaikh AH. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *American journal of ophthalmology*. 2009;148(1):119-27.
17. Kujala E, Mäkitie T, Kivelä T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(11):4651-9.
18. Violanti SS, Bononi I, Gallenga CE, Martini F, Tognon M, Perri P. New insights into molecular oncogenesis and therapy of uveal melanoma. *Cancers*. 2019;11(5):694.
19. Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochemical Journal*. 2007;403(1):139-48.
20. Wang Z, Wang N, Liu P, Xie X. AMPK and Cancer. *AMP-activated Protein Kinase*: Springer; 2016. p. 203-26.
21. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiological reviews*. 2009;89(3):1025-78.
22. Li W, Saud SM, Young MR, Chen G, Hua B. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget*. 2015;6(10):7365-78.
23. 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):165-70.
24. Jeon SM, Hay N. The double-edged sword of AMPK signaling in cancer and its therapeutic implications. *Arch Pharm Res*. 2015;38(3):346-57.
25. Weis E, Shah CP, Lajous M, Shields JA, Shields CL. The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis. *Archives of ophthalmology*. 2006;124(1):54-60.
26. Shah CP, Weis E, Lajous M, Shields JA, Shields CL. Intermittent and chronic ultraviolet light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology*. 2005;112(9):1599-607.
27. Shields CL, Kaliki S, Livesey M, Walker B, Garoon R, Bucci M, et al. Association of ocular and oculodermal melanocytosis with the rate of uveal melanoma metastasis: analysis of 7872 consecutive eyes. *Jama Ophthalmology*. 2013;131(8):993-1003.
28. Seddon JM, Gragoudas ES, Glynn RJ, Egan KM, Albert DM, Blitzer PH. Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma: a case-control study. *Archives of ophthalmology*. 1990;108(9):1274-80.
29. Canning C, Hungerford J. Familial uveal melanoma. *British journal of ophthalmology*. 1988;72(4):241-3.

30. Rai K, Pilarski R, Boru G, Rehman M, Saqr AH, Massengill JB, et al. Germline BAP1 alterations in familial uveal melanoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2017;56(2):168-74.
31. Singh AD, Shields CL, De Potter P, Shields JA, Trock B, Cater J, et al. Familial uveal melanoma: clinical observations on 56 patients. *Archives of Ophthalmology*. 1996;114(4):392-9.
32. Speicher MR, Prescher G, du Manoir S, Jauch A, Horsthemke B, Bornfeld N, et al. Chromosomal gains and losses in uveal melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer research*. 1994;54(14):3817-23.
33. Helgadottir H, Höiom V. The genetics of uveal melanoma: current insights. *The application of clinical genetics*. 2016;9:147.
34. Dogrusöz M, Jager MJ. Genetic prognostication in uveal melanoma. *Acta Ophthalmologica*. 2018;96(4):331-47.
35. Damato B, Duke C, Coupland SE, Hiscott P, Smith PA, Campbell I, et al. Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology*. 2007;114(10):1925-31. e1.
36. Shields CL, Ganguly A, Bianciotto CG, Turaka K, Tavallali A, Shields JA. Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. *Ophthalmology*. 2011;118(2):396-401.
37. Onken MD, Worley LA, Char DH, Augsburger JJ, Correa ZM, Nudleman E, et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1596-603.
38. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer research*. 2004;64(20):7205-9.
39. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients. *Ophthalmology*. 2013;120(10):2066-71.
40. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*. 2011;118(9):1881-5.
41. Albert D, Diener-West M, Robinson N, Grossniklaus H, Green W, Vine A, et al. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the collaborative ocular melanoma study COMS Report No. 6. *American journal of ophthalmology*. 1998;125(6):745-66.
42. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, Gamel JW. Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *American journal of ophthalmology*. 1983;96(4):502-9.
43. De Cruz Jr POL, Specht CS, McLean IW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer*. 1990;65(1):112-5.
44. Herwig MC, Grossniklaus HE. Pathology of Choroidal melanoma. *Retina: Elsevier*; 2013. p. 2254-66. e2.

45. Rajamohan F, Reyes AR, Frisbie RK, Hoth LR, Sahasrabudhe P, Magyar R, et al. Probing the enzyme kinetics, allosteric modulation and activation of α 1-and α 2-subunit-containing AMP-activated protein kinase (AMPK) heterotrimeric complexes by pharmacological and physiological activators. *Biochemical Journal*. 2016;473(5):581-92.
46. Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, et al. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2007;449(7161):496-500.
47. Jeon S-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(7):e245-e.
48. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(2):121.
49. Oakhill JS, Steel R, Chen Z-P, Scott JW, Ling N, Tam S, et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*. 2011;332(6036):1433-5.
50. Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, et al. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nature communications*. 2013;4(1):1-10.
51. Rowland AF, Fazakerley DJ, James DE. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic*. 2011;12(6):672-81.
52. Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes*. 1998;47(8):1369-73.
53. Iglesias MA, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW, Ye J-M. AMP-activated protein kinase activation by AICAR increases both muscle fatty acid and glucose uptake in white muscle of insulin-resistant rats in vivo. *Diabetes*. 2004;53(7):1649-54.
54. Angin Y, Beauloye C, Horman S, Bertrand L. Regulation of carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and protein metabolism by AMPK. *AMP-activated Protein Kinase: Springer*; 2016. p. 23-43.
55. Hardie D, Pan D. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochemical Society Transactions*. 2002;30(6):1064-70.
56. An Z, Wang H, Song P, Zhang M, Geng X, Zou M-H. Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes a ROLE FOR OXIDANT STRESS. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(37):26793-801.
57. Horman S, Browne GJ, Krause U, Patel JV, Vertommen D, Bertrand L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current biology*. 2002;12(16):1419-23.
58. Ng T, Leprivier G, Robertson M, Chow C, Martin M, Laderoute K, et al. The AMPK stress response pathway mediates anoikis resistance through inhibition of mTOR and suppression of protein synthesis. *Cell Death & Differentiation*. 2012;19(3):501-10.

59. Cerezo M, Tichet M, Abbe P, Ohanna M, Lehraiki A, Rouaud F, et al. Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(8):1605-15.
60. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell*. 2005;18(3):283-93.
61. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology*. 2011;13(9):1016-23.
62. Hardie DG. AMPK and autophagy get connected. *The EMBO journal*. 2011;30(4):634-5.
63. Liang J, Shao SH, Xu Z-X, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27 kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature cell biology*. 2007;9(2):218-24.
64. Narkar VA, Downes M, Ruth TY, Embler E, Wang Y-X, Banayo E, et al. AMPK and PPAR δ agonists are exercise mimetics. *Cell*. 2008;134(3):405-15.
65. Chen Z-P, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS letters*. 1999;443(3):285-9.
66. Chen Z-P, McConell GK, Michell BJ, Snow RJ, Canny BJ, Kemp BE. AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2000;279(5):E1202-E6.
67. Winder W, Holmes B, Rubink D, Jensen E, Chen M, Holloszy J. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 2000;88(6):2219-26.
68. 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.
69. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1 possible role in AMP-activated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(41):27628-35.
70. Saha AK, Xu XJ, Balon TW, Brandon A, Kraegen EW, Ruderman NB. Insulin resistance due to nutrient excess: is it a consequence of AMPK downregulation? *Cell Cycle*. 2011;10(20):3447-51.
71. Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing research reviews*. 2012;11(2):230-41.
72. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(11):3015-25.
73. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *The Journal of Immunology*. 2008;181(12):8633-41.

74. Blagih J, Coulombe F, Vincent EE, 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.
75. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404(6778):661-71.
76. Zhang Z-J, Zheng Z-J, Shi R, Su Q, Jiang Q, Kip KE. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(7):2347-53.
77. Treebak JT, Birk JB, Hansen BF, Olsen GS, Wojtaszewski JF. A-769662 activates AMPK β 1-containing complexes but induces glucose uptake through a PI3-kinase-dependent pathway in mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2009;297(4):C1041-C52.
78. García-García C, Fumarola C, Navaratnam N, Carling D, López-Rivas A. AMPK-independent down-regulation of cFLIP and sensitization to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activators. *Biochemical pharmacology*. 2010;79(6):853-63.
79. de Meester C, Timmermans AD, Balteau M, Ginion A, Roelants V, Noppe G, et al. Role of AMP-activated protein kinase in regulating hypoxic survival and proliferation of mesenchymal stem cells. *Cardiovascular research*. 2014;101(1):20-9.
80. Al-Moujahed A, Nicolaou F, Brodowska K, Papakostas TD, Marmalidou A, Ksander BR, et al. Uveal melanoma cell growth is inhibited by aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) partially through activation of AMP-dependent kinase. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(7):4175-85.
81. Liu X, Chhipa RR, Pooya S, Wortman M, Yachyshin S, Chow LM, et al. Discrete mechanisms of mTOR and cell cycle regulation by AMPK agonists independent of AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(4):E435-E44.
82. Borgdorff V, Rix U, Winter G, Gridling M, Müller A, Breitwieser F, et al. A chemical biology approach identifies AMPK as a modulator of melanoma oncogene MITF. *Oncogene*. 2014;33(19):2531-9.
83. Vucicevic L, Misirkic M, Kristina J, Vilimanovich U, Sudar E, Isenovic E, et al. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy*. 2011;7(1):40-50.
84. Yang WL, Perillo W, Liou D, Marambaud P, Wang P. AMPK inhibitor compound C suppresses cell proliferation by induction of apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells. *Journal of surgical oncology*. 2012;106(6):680-8.
85. Zadra G, Batista JL, Loda M. Dissecting the dual role of AMPK in cancer: from experimental to human studies. *Molecular cancer research*. 2015;13(7):1059-72.
86. Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(4):e224-e.
87. Ambrosini G, Musi E, Ho AL, de Stanchina E, Schwartz GK. Inhibition of mutant GNAQ signaling in uveal melanoma induces AMPK-dependent autophagic cell death. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(5):768-76.

88. Sevim DG, Kiratli H. Serum adiponectin, insulin resistance, and uveal melanoma: clinicopathological correlations. *Melanoma Research*. 2016;26(2):164-72.
89. Zheng B, Jeong JH, Asara JM, Yuan Y-Y, Granter SR, Chin L, et al. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular cell*. 2009;33(2):237-47.
90. Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, et al. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*. 2007;26(40):5911-8.
91. William W, Kim J-S, Liu D, Solis L, Behrens C, Lee J, et al. The impact of phosphorylated AMP-activated protein kinase expression on lung cancer survival. *Annals of oncology*. 2012;23(1):78-85.
92. Ríos M, Foretz M, Viollet B, Prieto A, Fraga M, Costoya JA, et al. AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors. *Cancer research*. 2013;73(8):2628-38.
93. Günaydın G, Gedik ME, Meme Kanseri ve Hepatosellüler Kanseri Hücre Dizilerinde AMPK Modülasyonunun Kanseri Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Gerçek-Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (xCelligence) Aracılığıyla İncelenmesi. *Bozok Tıp Dergisi*. 2018;8(4):95-103
94. Jager MJ, Magner JAB, Ksander BR, Dubovy SR. Uveal melanoma cell lines: where do they come from?(An American Ophthalmological Society Thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2016;114.