

**KOLOREKTAALVÄHI ENERGIAMETABOLISMIS ESINEVAD
GENEETILISED JA VALGULISED MUUTUSED**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Janne Jegorkina, 206149LAAB

Juhendaja: Leenu Reinsalu, doktorant-nooremteadur,
Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Keemilise Bioloogia Labor

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Janne Jegorkina

Allkirjastatud digitaalselt

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

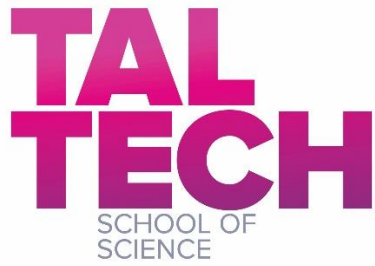
Juhendaja: Leenu Reinsalu

Allkirjastatud digitaalselt

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees:

[allkiri ja kuupäev]



THE OCCURRENCE OF GENETIC AND PROTEIN CHANGES IN THE ENERGY METABOLISM OF COLORECTAL CANCER

Bachelor thesis

Student: Janne Jegorkina, 206149LAAB

Supervisor: Leenu Reinsalu, PhD student – junior researcher,
National Institute of Chemical Physics and Biophysics, Chemical Biology Laboratory

Study program: Applied Chemistry and Gene Technology

Sisukord

Annotatsioon.....	6
Abstract	7
Lühendid.....	8
Sissejuhatus.....	9
1 Kirjanduse ülevaade	10
1.1 Vähhkasvaja põhiomadused.....	10
1.1.1 Kolorektaalvähk.....	10
1.2 Metaboolne reprogrammeerimine	11
1.2.1 Warburgi efekt	11
1.2.2 Oksüdatiivne fosforüülimine ja seos vähi tekkega.....	13
1.2.3 Metaboolne plastilisus	14
1.3 Energiatranspordi radade roll kasvajarakkudes.....	15
2 Töö eesmärgid.....	17
3 Eksperimentaalne osa	18
3.1 Kliiniline materjal.....	18
3.2 Geeniekspressiooni mõõtmine	18
3.2.1 RNA eraldus.....	18
3.2.2 cDNA süntees	18
3.2.3 Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon.....	19
3.3 Valgu taseme määramine	19
3.3.1 Valgu eraldus.....	19
3.3.2 Valgu kontsentratsiooni määramine.....	19
3.3.3 Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees	20
3.3.4 <i>Western blot</i> analüüs	20
3.4 Andmete analüüs	21
4 Tulemused ja arutelu.....	22
4.1 Patsientide kliinilised andmed	22
4.2 Energiametabolismiga seotud geenide ekspressioonitasemed.....	22
4.2.1 Glükolüüsiga seotud geenide ekspressioonitasemed	22
4.2.2 Energiatransporditeedega seotud geenide ekspressioonitasemed.....	24

4.3 Energiametabolismiga seotud valgu tasemed	25
4.3.1 Heksokinaasid.....	25
4.3.2 Adenülaatkinaasid.....	26
Kokkuvõte.....	28
Tänuavaldused	29
Kasutatud kirjandus.....	30

Annotatsioon

Kolorektaalvähk on üks enim diagnoositud ja surmasid põhjustavaid vähitüüpe. Kasvaja ravi on efektiivsem varasel avastamisel, kuid kahjuks leitakse kolorektaalvähk tihti alles siis, kui patsiendi kehas on tekkinud juba kasvaja siirded. Arvatakse, et vähi varasemaks avastamiseks või ka uute ravisihtmärkide leidmiseks võivad olla aluseks kasvajarakkudes toimuvad metaboolsed muutused. Vähirakkudel on omadus reguleerida ümber energia tootmise ja biosünteesiga seotud radasid, et toetada neile omast reguleerimatut jagunemist ja kasvu. Otto Warburg näitas juba 1920. aastatel, et vähirakud eelistavad isegi aeroobsetes tingimustes energia tootmiseks glükolüüsi. Tänapäevaks on teada, et vähi metaboolne fenotüüp sõltub erinevatest faktoritest, sealhulgas lokaliseerimisest.

Antud töös kasutati reaalse kvantitatiivset pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni ja *western blot* analüüsi, et võrrelda muutuseid metaboolsetes radades osalevate geenide ekspressioonis ning valkude tasemetes. Proovi materjalina kasutati post-operatiivset vähikudet ning tervet soolekudet.

Töö käigus leitud muutused geeniekspressioonis viitavad võimalikule osalisele glükoosi tarbimise suurenemisele vähirakkudes, kuid selgelt glükolüütilist fenotüüpi antud tulemuste põhjal väita ei saa. Kuigi kreatiinkinaaside ekspressioonitasemed langevad vähikoos, ei tõuse rakkudes selle kompenseerimiseks adenülaatkinaaside ekspressioon. Valgu tasemel ei näidatud proovi materjali heterogeensusest ja väikesest proovide arvust tulenevalt ühtegi statistiliselt olulist erinevust. Samuti ei leitud korrelatsiooni valgu tasemete ja klinikopatoloogiliste omaduste vahel.

Abstract

Colorectal cancer is one of the most commonly diagnosed and deadliest forms of cancer. Early detection significantly enhances the effectiveness of tumor treatment; however, unfortunately, colorectal cancer is frequently diagnosed only after it has already metastasized. It is believed that metabolic changes occurring within tumor cells could serve as a basis for the earlier detection of cancer or the discovery of novel therapeutic targets. Cancer cells have the ability to reprogram energy production and biosynthetic pathways enabling their uncontrolled proliferation and growth. Otto Warburg already demonstrated in the 1920s that cancer cells exhibit a preference for glycolysis even in the presence of oxygen. It is now known that the metabolic phenotype of cancer depends on various factors, including location.

This study employed real-time quantitative polymerase chain reaction and western blot analysis to compare changes in gene expression and protein levels associated with metabolic pathways. Postoperative tumor samples and healthy colon tissue were used as sample material.

The alterations in gene expression shown in the thesis indicate a potential increase in glucose consumption in cancer cells, although a definitive glycolytic phenotype cannot be determined based on these results. While the expression levels of creatine kinases decrease in the cancer tissue, there is no compensatory increase in the expression of adenylate kinases. At the protein level, no statistically significant differences were observed due to the heterogeneity of the sample material and the limited number of samples. Furthermore, no correlations were found between protein levels and clinicopathological features.

Lühendid

ADP – adensiindifosfaat

AK – adenülaatkinaas

AMP – adensiinmonofosfaat

ANT – adeniinnukleotiid translokaator

ATP – adensiintrifosfaat

cDNA – komplementaarne DNA

CI, CII, CIII, CIV – hingamisahela kompleksid I, II, III ja IV

CK – kreatiinkinaas

CoQ – koensüüm Q ehk ubikinoon

CRC – kolorektaalvähk

CytC – tsütokroom C

ETA – elektronide transpordiahel ehk mitokondriaalne hingamisahel

G-6-P – glükoos-6-fosfaat

GLUT – glükoosi transporter

HK – heksokinaas

MIM – mitokondri sisemembraan

MOM – mitokondri välismembraan

OXPPOS – oksüdatiivne fosforüleerimine

PCr - fosfokreatiin

PI – proteaasi inhibiitorid

qRT-PCR – reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon

RIPA lüüsi puhver – radioimmuunsadestamise lüüsi puhver

ROS – reaktsiivsed hapnikuühendid

RT – pöördtranskriptsioon

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees

TCA-tsükkel – tsitraaditsükkel ehk Krebse tsükkel

VDAC – pingest sõltuv anioonkanal

Sissejuhatus

Kolorektaalvähk ehk jämesoolevähk on maailmas kolmandal kohal pahaloomuliste kasvajate hulgas ning see haarab üha enam nooremaid inimesi. Enamasti areneb see soole limaskesta väljasopistustest ehk polüüpidest. Soolevähk on väga metastaatiline ja kemoresistentne, mistõttu on selle ravimiseks vaja leida uusi ravimeetodeid.

Vähkkasvajatele on omane kontrollimatu rakkude jagunemine. Selle tagamiseks peavad kasvajakud kohandama oma energiametabolismi, et kiirendada energia tootmist ja selle kasutamist rakus. Normaalsed rakud kasutavad glükolüüsi vaid anaeroobsetes tingimustes, kuid Warburgi efekti kohaselt eelistavad vähirakud glükolüüsi ka hapniku juuresolekul. Nüüdseks on leitud, et teatud vähitüüpides domineerib aeroobse glükolüüsi asemel oksüdatiivne fosforüülimine. Oluline on mõista metaboolse plastilsuse olemust, et leida uusi ravisihthärke. Seepärast oli antud töö eesmärk kirjeldada kolorektaali energiameetabolismi iseloomustades ja võrreldes mõõdetud geeni ja valgu ekspressiooni.

Töö teoreetilises osas kirjeldatakse kartsinoomi põhiomadusi ja kolorektaali histoloogilisi arenguvorme. Seejärel tutvustatakse metaboolset reprogrammeerimist. Seejuures pannakse rõhku Warburgi efekti mehhanismide omandamisele ja oksüdatiivse fosforüülimise tähtsusele vähirakkudes. Kirjeldatakse metaboolse plastilsuse esinemist ja selle tähtsust kasvaja invasiivsuse kujunemisel. Lisaks pööratakse tähelepanu energiatranspordi radades osalevate valkude funktsioonidele. Töö eksperimentaalses osas näidatakse energia tootmises ja energiatranspordis osalevate 10 geeni ekspressioonitasemeid, mida mõõdeti reaalse kvantitatiivse pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni meetodil, ning kuue valgu hulka, mida määrati *western blot*-iga. Saadud tulemusi võrreldakse kolorektaali vähis ja normaalses soolekoos.

Antud töö tulemuste põhjal võib arvata, et CRC rakkudes suureneb glükoosi kasutamine. Seda näitavad glükoosi metabolismis osalevate geenide ekspressioonitasemete tõus. Samas ei saa kindlalt väita, et soolevähis toimub metaboolne reprogrammeerimine, mis suunab energia tootmise selgelt glükolüüsi suunas. Paljudes tulemustes ei esine statistiliselt olulist erinevust, sest suure heterogeensusega kliinilise materjaliga töötamisel on vaja vaadelda suuremat proovide hulka. Seejuures ei leitud korrelatsioone proovide klinikopatoloogiliste omaduste ja valgutasemete heterogeensuse vahel.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Vähkkasvaja põhiomadused

Vähkkasvaja on kompleksne haigus, kus rakkudes on häiritud reguleerivad rajad, mis kontrollivad rakkude tavapärasest proliferatsioonist ja homöostaasi. Hanahan ja Weinberg on toonud välja 14 vähi põhiomadust, mis soodustavad rakkude kontrollimatut paljunemist (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011). Nendeks on proliferatiivse signaaliseerimise säilitamine, kasvusupressorite vältimine, rakusurmast hoidumine, replikatiivse surematuse võimaldamine, angiogeneesi soodustamine, siirete levimise käivitamine, genoomne ebastabiilsus, tuumori põhjustatud põletik, metabolismi ümberprogrammeerimine, immuunsüsteemi poolt hävitamisest hoidumine, fenotüübilise plastilisuse avamine, mutatsioonidest sõltumatu epigeneetiline ümberprogrammeerimine, polümorfseid mikrobioomid ning vananevad rakud. Antud töös keskendutakse kolorektaalvähi (CRC) metaboolse ümberprogrammeerimise uurimisele.

1.1.1 Kolorektaalvähk

CRC ehk jämesoolevähk on maailmas kolmas kõige levinum kasvaja ja teine vähiga seotud surma põhjustaja ning ennustuste kohaselt võib seda aastatega veel enam esineda (Sung et al., 2021). Tegemist on komplekshaigusega, millesse haigestumise tõenäosus jääb vahemikku 4% kuni 5%. Peamised riskitegurid on geneetilised, keskkondlikud ja elustiilist tingitud (Brenner et al., 2014; Mármol et al., 2017). Kui varasemalt esines kartsinoomi rohkem üle 50-aastastel patsientidel, siis üha enam on antud haigusest haaratud nooremad inimesed. Peamine mõjutaja on läänelik elustiil, kus süvendav roll on vähesel liikumisel ja liigselt töödeldud toidul (Hofseth et al., 2020). Kaugele arenenud CRC-d on keeruline ravida, sest see on enamike kombineeritud raviteraapiate suhtes resistentne. Üha enam usutakse, et manipuleerimine rakumetabolismiga võib olla uus toimiv mehhanism vähiravis (La Vecchia & Sebastián, 2020).

Enamasti areneb CRC soole limaskestast väljasopistusest ehk polüüpidest. Need jagunevad histoloogiliselt neoplastilisteks ja mitte-neoplastilisteks, mis võivad omakorda olla hüperplastilised, põletikulised ja hamartomatoossed. On leitud, et vähi tekke tõenäosus sõltub polüübi suurusest ja düsplaasia astmest, kusjuures ainult neoplastilised polüübid on võimelised arenema maligniteeteks ehk pahaloomulisteks (Shussman & Wexner, 2014). Ehkki kasvaja teke on tihedalt seotud paljude geneetiliste faktoritega, siis enamjaolt on arenemine juhuslik ja aeglane (Brosens et al., 2015).

1.2 Metaboolne reprogrammeerimine

Kasvajatele omase kontrollimatu rakkude proliferatsiooni ja kasvuga kaasneb suurenenud vajadus energia järele. Samas on vähirakud võrreldes normaalsete rakkudega ümbritsetud hoopis teistsuguse mikrokeskkonnaga, kus energia tootmiseks vajalike hapniku ja toitainete kättesaamine võib olla keeruline. Selleks, et tagada piisav energia hulk rakuliste protsesside läbiviimiseks, toimuvad vähirakkude energiametabolismis ümberkorraldused (De Berardinis & Chandel, 2016; Hanahan & Weinberg, 2011). Seda fenomeni nimetatakse metaboolseks reprogrammeerimiseks ning tänaseks on näidatud, et selline energia tootmise ümberreguleerimine on oluline nii kasvaja tekkel kui ka edasisel arenemisel. Muuhulgas võib metaboolne reprogrammeerimine toetada kasvaja invasiooni ja metastaseerumist teistesse kudedesse ja organitesse (Faubert et al., 2020; Yoshida, 2015) .

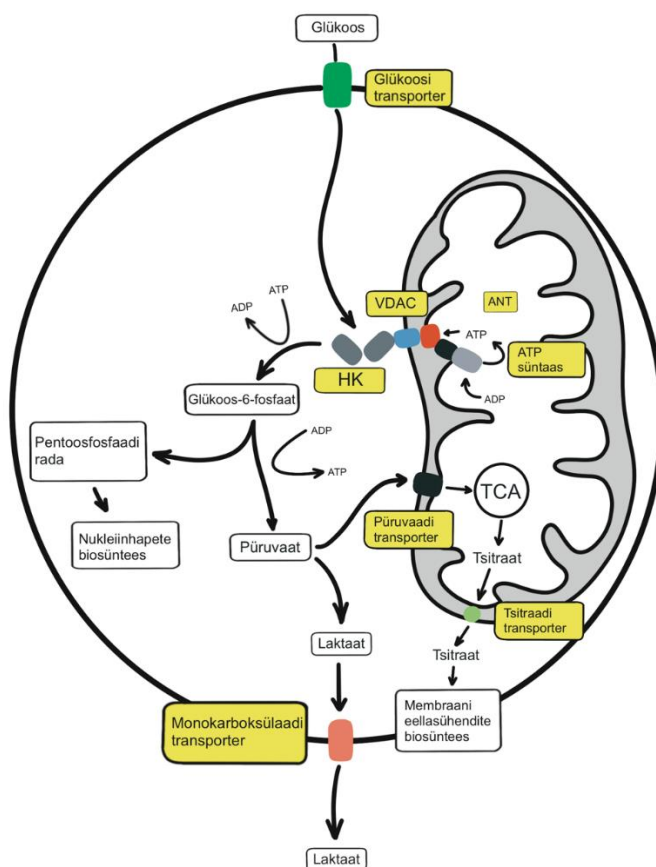
1.2.1 Warburgi efekt

Esimesena kirjeldas energiametabolismi muutuseid vähirakkudes Otto Warburg juba 1920. aastatel näidates, et vähirakkudes domineerib isegi hapniku olemasolul glükolüüs (Warburg et al., 1927). Aeroobsetes tingimustes liigub normaalsetes rakkudes tsütosoolis glükolüüsi käigus toodetud püruvaat mitokondritesse, kus oksüdatiivse fosforüülimise (OXPHOS) teel toodetakse ATP-d, ning vaid anaeroobsetes tingimustes lülituvad rakud ümber glükolüütilisele energia tootmisele. Warburgi efekti kohaselt ei liigu püruvaat edasi Krebsi tsükliks, vaid see muudetakse piimhappeks (Warburg, 1956; Warburg et al., 1927). Antud fenomeni nimetatakse aeroobseks glükolüüsiks ehk Warburgi efektiks. Kuigi aeroobse glükolüüsi teel saadav teoreetiline ATP saagis on umbes 18 korda väiksem kui OXPHOS-il saadava energia hulk, on sellisel ümber programmeerimisel ka omad eelised. Näiteks varustab suurenenud glükolüüsi aktiivsus kasvajakraku hulgaliselt oluliste vaheühenditega, mida rakk saab kasutada anaboolsetes reaktsioonides ning seeläbi kiirendada uute rakkude kokkupanekuks vajalike makromolekulide biosünteesi (Hsu & Sabatini, 2008).

Glükoosi metabolism algab selle transpordiga raku, mis toimub läbi glükoosi transporterite (GLUT). Inimorganismis esineb 14 erinevat homoloogset GLUT valku. Üha enam on näidatud, et GLUT1 ja GLUT3 isovormid on peamised osalised metabolismi muutlikkuses, kusjuures *GLUT1* kõrge ekspressioonitase on seotud enamike vähitüüpide halva elulemusega, sealhulgas ka soolevähiga (Ancey et al., 2018; Brown & Wahl, 1993; Cantuaria et al., 2000; Haber et al., 1998; Nishioka et al., 1992).

Tsütoosolis toimivas glükolüüsi rajas on esimesel kohal ensüümid heksokinaasid (HK), mis katalüüsivad raku sisenenud glükoosi fosforüleerimist glükoos-6-fosfaadiks (G-6-P) kasutades selleks ATP fosfaatgruppi (Joonis 1). Imetajate rakkudes leidub neli HK isovormi: HK1 ja HK2 asuvad peamiselt mitokondri välismembraanil (MOM), HK3 asub perinukleaarses ruumis ning HK4 raku tsütosoolis (Saroj P. Mathupala et al., 2009; Wilson, 2003). Pedersen ja Bustamante leidsid

1977. aastal, et Warburgi efekti soodustab üleekspressioneeritud HK2 seondumine pingest sõltuvalle anioonkanalile (VDAC) (Bustamante & Pedersen, 1977; Pedersen, 2007). Peamised põhjused, miks kasvaja võiks eelistada HK2 isovormi HK1-le, on suurem glükoosi afiinsus ja katalüütiline aktiivsus ning N-terminaalne hüdrofoobne domeen, mis on seotud VDAC-iga (Saroj P. Mathupala et al., 2009; Pedersen, 2007). HK2 seondub tavaliselt MOM-il VDAC1 isovormiga, et vältida inhibeerimist ensüümi reaktsiooniprodukti G-6-P eest (Pedersen, 2007; Reinsalu et al., 2021). VDAC1 on mitokondriaalne valk, mis reguleerib rakutsükli ja apoptoosi ning kontrollib Ca^{2+} homöostaasi, metaboliitide, ionide ja signaalmolekulide liikumist mitokondritesse ja välja (Shoshan-Barmatz et al., 2017). HK1 või HK2 seondumine VDAC1-ga annab vähirakule mitmeid eeliseid: kõrgema läbilaskvuse MOM-i adeniinnukleotiididele, suurendab aeroobset glükolüüsi, tagab suurema resistentsuse apoptoosile ja pakub kaitset oksüdatiivse stressi eest. VDAC ja HK vahelist interaktsiooni on takistatud näiteks 3-bromopüruvaadiga, mida on testitud vähivastase ravimina (Reinsalu et al., 2021; Shoshan-Barmatz et al., 2017).



Joonis 1. Glükoosi metabolism vähirakus. Glükoos transporditakse glükoosi transporterite vahendusel läbi plasmamembraani raku sisse, kus see fosforüeeritakse heksokinaas 2 (HK2) poolt, mis on seotud MOM-il asuva pingest sõltuva anioonkanaliga VDAC-iga. VDAC varustab HK2 reaktsiooniks vajaliku ATP-ga, mille adeniinnukleotiid translokaator (ANT) kannab esmalt läbi mitokondri sisemembraani. HK-de poolt katalüüsitud reaktsiooni tulemusel saadakse glükoos-6-fosfaat, mis jaguneb kahe metaboolse raja vahel. Üheks valikuks on pentoosfosfaadi rada, et sünteesida nukleiinhapete eellasühendid. Teine variant on selle muutmise püruvaadiks, mis võib siseneda mitokondrisesse või olla substraadiks laktaadi sünteesil. Laktaat transporditakse seejärel rakust välja läbi monokarboksülaadi transporterite (S. P. Mathupala et al., 2006).

Mitokondriaalse hingamise inhibeerimise tulemusel akumulereub püruvaat tsütosoolis, kus see muundatakse laktaat dehüdrogenaas A ja NADH abil laktaadiks. Rakust välja viidud piimhape aitab kasvajal võidelda organismi immuunsüsteemi rünnakutega (Heiden et al., 2009). Ekstratsellulaarne laktaat toob kaasa pH languse kasvaja mikrokeskkonnas, mis lõhub rakkude vahelisi sidemeid ja soodustab seeläbi kasvaja invasiooni ja metastaseerumist (Feron, 2009).

Warburg pakkus välja, et aeroobne glükolüüs on põhjustatud pöördumatutest muutustest kasvajakudede mitokondrites, millega kaasneb püsiv raku hingamise kahjustus (Warburg, 1956). Nüüdseks on teada, et mitmete kasvajate puhul toimib OXPHOS tavapäraselt (Hayashi et al., 1992; Lim et al., 2011; Viale et al., 2014). Metaboolse reprogrammeerimise alusel jaotuvad vähirakud kolme klassi, mida eristab suhe aeroobse glükolüüsi ja OXPHOS-i esinemise hulgas. Esiteks võib maligne rakk olla kõrgelt glükolüütiline, teiseks puuduliku OXPHOS-iga ja kolmandaks suurenenud OXPHOS-i hulgaga (Bellance et al., 2009; Käämbre et al., 2013). Ehkki CRC-s võib olla glükolüüsi tase kasvanud, siis varasemalt on näidatud, et enamiku ATP-st toodavad kasvajakud siiski mitokondrites OXPHOS-i teel (Kaldma et al., 2014).

1.2.2 Oksüdatiivne fosforüülimine ja seos vähi tekkega

Mitokondri on rakkudes energiat tootev organell, mis on ümbritsetud välismembraaniga (MOM) ja sisemembraaniga (MIM). Mitokondri peamine ülesanne on sünteesida OXPHOS-i käigus ATP-d, kuid lisaks osaleb see veel ka teistes olulistest raku protsessides nagu reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) ja biosünteesi eellasainete tootmises, rakkudevahelise signaliseerimise ja apoptootilise rakusurma reguleerimises ning tsütosoolse Ca^{2+} homöostaasi tagamises. Need eriilmelised funktsioonid muudavad mitokondri oluliseks rakustressi anduriks ning võimaldavad raku kohanemist keskkonnaga. Vähhkasvajates on ülesreguleeritud mitokondrite biogenees, mistõttu on nad võimelised kohanema hapniku- ja toitainevaese mikrokeskkonnaga ning ka vähivastaste ravimitega (Vyas et al., 2016; Wallace, 2012; Zong et al., 2016).

Mitokondriaalse energia tootmise võib jagada kaheks protsessiks. Neist esimene on tsitraaditsükkel (TCA) ehk Krebse tsükkel, mis toimub mitokondri maatriksis. Püruvaadist toodetakse atsetüülkoensüüm A, mis siseneb TCA-sse. Mitmeetapilise oksüdeerimise käigus tekivad elektronkandjad NADH ja FADH, mis alustavad OXPHOS-i. OXPHOS on mitokondriaalse energia tootmise teine samm, mille käigus muudetakse keemiline energia elektrokeemiliseks gradiendiks MIM-is asuva elektrontransportahela (ETA) komplekside kaudu. OXPHOS-i substraadid ja produktid transporditakse läbi MOM-i VDAC-i kaudu ning läbi MIM-i ANT kaudu. Protsessi käigus kasutatakse elektronide aktseptorina hapnikku, mis seejärel taandatakse veeks (Gautheron, 1984; Wallace, 2012).

ETA koosneb neljast valgukompleksist (CI-CIV) ja ATP süntaasist. Valgukomplekside vahel liiguvad kaks elektronkandjat: ubikinoon ehk koensüüm Q (CoQ) ja tsütokroom C (Cyt-C). CI ehk NADH-CoQ oksüdüreduktaas kannab elektronid NADH-lt CoQ-le. CII seob TCA-d ja OXPHOS-i katalüüsides

suktsinaadi oksüdeerumist fumaraadiks. CoQ viib CI-lt ja CII-lt saadud elektronid CIII-le. Cyt-C kannab elektronid CIII-lt CIV-le. Kusjuures CIII on mõlema mobiilse elemendi oksüdüreduktaas. CIV on Cyt-C oksüdaas, mis lõpetab elektronülekanne ETA-s, tootes hapnikust vett. Elektronide transport läbi CI, CIII ja CIV indutseerib prootonite pumpamist membraanide vahelisse alasse, tekitades prootongradiendi. ATP süntaas ehk kompleks V kasutab tekkinud prootongradiendi, et fosforüleerida adenosiindifosfaadist (ADP) ATP-d (Hatefi, 1985).

ETA kompleksid on olulised tuumori kasvus ja metastaseerumises (Tan et al., 2014). CI häiritud funktsioon võib soodustada mitmesuguste vähkkasvajate, nagu rinnavähi, kopsuvähi ja pankreasevähi teket (Dasgupta et al., 2012; Iommarini et al., 2013; Kassaei et al., 2006; Tseng et al., 2011). Katsed kilpnäärme onkotsüütiliste rakuliinidega on näidanud, et mtDNA mutatsioonid CI ja CIII subühikutes vähendavad komplekside ensümaatilist aktiivsust, soodustades vähirakkude proliferatsiooni ROS-sõltuvalt (Bonora et al., 2006). On leitud, et CRC kasvu võiks takistada metformiin, mis inhibeerib CI-d (Hosono et al., 2010). CII allareguleerimisega kaasneb suktsinaadi tõus, mis stabiliseerib hüpoksiaga indutseeritud faktori 1α -t (HIF- 1α), soodustades glükolüüsi kasutamist (Sciacovelli et al., 2013). Kuid näiteks CRC puhul ei ole täheldatud CII aktiivsuse kadu (Kaldma et al., 2014).

1.2.3 Metaboolne plastilisus

Senini on püütud kasvajatüüpe grupeerida selle põhjal, milline rada domineerib energia tootmisel. Nüüdseks on kirjeldatud uut vähirakkude omadust, mille järgi ei ole nende rakkude metaboolne fenotüüp hoopiski nii piiritletud. Selleks on metaboolne plastilisus ning see tähendab, et vähirakud on võimelised kohanduma end ümbritseva mikrokeskkonnaga ning kasutama erinevaid metaboolseid substraate vastavalt nende olemasolule (Fendt et al., 2020). Kasvajarakkude jagunemisel ja vähikoe kasvamisel tekivad selles erineva verevarustusega piirkonnad, millest tulenevalt varieerub toitainete ja hapniku kättesaadavus rakkude jaoks. Näiteks toodavad hüpoksilistes tingimustes olevad vähirakud energiat glükolüüsi teel, mille tulemusel eritatakse tsütosooli laktaati. Rakuvälist piimhapet saavad omakorda aeroobsed kasvajakud kasutada substraadina OXPHOS-iks (Feron, 2009). See ilmestab hästi vähirakkude heterogeensust ning omavahelist koostööd. Vähirakud võivad metaboolset plastilisust kasutada ka proliferatsiooni soodustamiseks. Näiteks transpordivad anaboolseid radasid kasutavad rakud TCA-tsükli toodetud tsitraadi mitokondrist välja, et sünteesida rasvhappeid ja kolesterooli, mis on vajalikud rakumembraani ehituses (Joonis 1) (S. P. Mathupala et al., 2006). Plastilisus väljendub selgelt kasvaja siirete korral. Maliigse CRC puhul on leitud, et maksa metastaasides eelistatakse aeroobset glükolüüsi, kuid primaarses tuumoris ja kopsu siiretes antud muutlikkust ei täheldata, mis rõhutab metaboolse plastilisuse tähtsust kasutada ära tuumori mikrokeskkonda (Bu et al., 2018; La Vecchia & Sebastián, 2020).

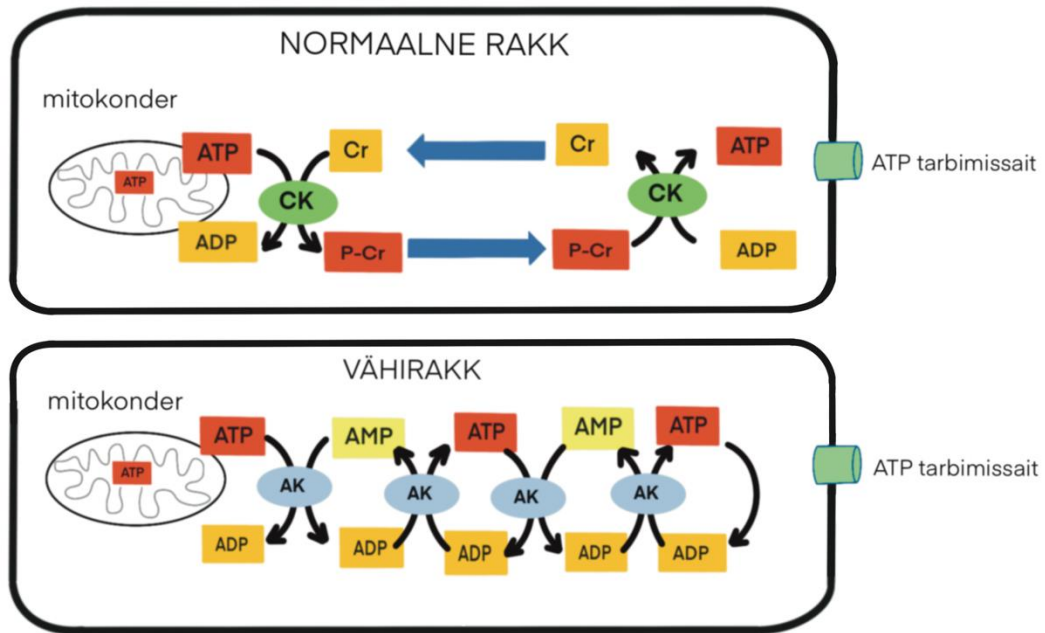
1.3 Energiatranspordi radade roll kasvajarakkudes

Lisaks muutustele energia tootmises, on vähirakkudes kirjeldatud ka võimalikke variatsioone selles, kuidas ATP jõuab sünteesi kohast ATPaasideni. Seda energiaülekannet vahendavad ensüümid kreatiinkinaasid (CK) ja adenüülütkinaasid (AK) (P. P. Dzeja & Terzic, 2003). Varasemate CRC uuringute kohaselt on märgatud, et CK isovormid on kasvajas allasurutud, samas kui AK isovormid on ülesreguleeritud (Joonis 2) (Chekulayev et al., 2015; Kaldma et al., 2014). See võib olla seotud kasvaja suure energiavajadusega anaboolsete protsesside ja rakustruktuuride ümberkorralduste jaoks. Soolevähirakud suudavad ümber lülituda CK signaalradadest AK ahelatesse, et tagada metaboolne plastilisus, mille regulatsioon võib olla seotud VDAC-i läbilaskvusega (Reinsalu et al., 2021).

CK katalüüsib pöörduvat reaktsiooni, kus fosfokreatiin (PCr) muudetakse vabaks kreatiiniks ja ADP-st saadakse ATP (Cabaniss, 1990). Inimesel on leitud vähemalt neli CK isovormi: kaks tsütosoolset (CK-M, CK-B), mis võivad moodustada dimeere (CK-MM, CK-MB, CK-BB), ning kaks mitokondriaalset isovormi (CKMT1, CKMT2) (T. Wallimann et al., 1992). Antud töös keskendutakse ajutüüpi kreatiinkinaasile (CK-BB) ja mitokondriaalsetele kreatiinkinaasidele (CKMT1, CKMT2). CKMT peamine ülesanne on varustada rakku energiaga ja takistada mitokondri membraani läbilaskvaks muutumist (Schlattner et al., 2006). CK-BB-l on oluline roll rakutsükli reguleerimisel, aidates kaasa kasvaja invasiivsusele. Häired CK-BB aktiivsuses vähendavad glükolüüsi ja võimendavad OXPHOS-i (Li et al., 2013; Mooney et al., 2011; Yan, 2016). Mitmes maliigses vähitüübis on leitud, et CKMT on ülesekspressioonitud (DeLuca et al., 1981; Kanemitsu et al., 1984). CRC puhul kaasnevad CKMT allareguleerimisega takistused PCr-i tootmises ja kaob VDAC-CKMT-ANT kompleksi vaheline funktsionaalsus (Reinsalu et al., 2021).

AK-d on ensüümid, mis osalevad rakulise energia homöostaasi tagamises. Rakustressi korral jäävad kataboolsed rajad ATP tarbimise kiirusest maha, mistõttu tõuseb ADP tase. AK-d katalüüsivad ADP muundamist adenosiinmonofosfaadiks (AMP), aktiveerides AMP-aktiveeritud proteiinkinaasi (AMPK), et taastada ATP tootmine ($2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$). Samal ajal lülitatakse välja teised biosünteesi rajad (P. Dzeja & Terzic, 2009; Hardie & Hawley, 2001). Inimkudedest on leitud üheksa AK isovormi, millest antud töös keskendutakse AK1, AK2, AK4 ja AK6-le. AK1 on oluline tsütosoolne isovorm, mida leidub enamikes koetüüpides. Seda ekspresseeritakse kõrgelt skeletilihastes, ajus ja erütrotsüütides (Khoo & Russell, 1972). AK2 asub mitokondri membraanide vahelises alas (Fukami-Kobayashi et al., 1996). Seda leidub palju maksas, neerus ja südames (Khoo & Russell, 1972; Takafumi Noma et al., 1998). AK4 asub mitokondri maatriksis ja AK6 asub rakutuumas ja tsütoplasmas. Arvatakse, et ka AK6 ekspresseerub kõikides kudedes (T. Noma et al., 2001; Panayiotou et al., 2014; Ren et al., 2005). Rinnavähi kartsinogeneesis on täheldatud AK1 ja AK2 isovormide esinemist (Klepinin et al., 2016). AK2 puhul on teada, et tegemist on tugeva onkogeeni kopsu adenokartsinoomis (H. Liu et al., 2019). Katsed SH-SY5Y rakuliiniga näitasid, et AK4 tase tõuseb hüpoksilistes tingimustes. Lisaks HeLa rakuliiniga tehtud uurimuses leiti, et AK4 moodustab ANT, HK2 ja VDAC-iga komplekse, et hõlbustada ADP kasutamist. Antud kompleks

omakorda soodustab kõrget glükolüütilist aktiivsust kasvajakarakus (Fujisawa et al., 2016; R. Liu et al., 2009). Uuringud CRC ja rinnavähiga on näidanud, et kõrge AK6 ekspressioonitase soosib Warburgi efekti kasutamist läbi LDHA fosforüleerimise (Ji et al., 2017).



Joonis 2. Oletuslik energiaülekande erinevus normaalses rakus ja vähirakus. Normaalses rakus katalüüsivad kreatiinkinaasid (CK) pöörduvat ADP muundamist ATP-ks, kasutades fosfokreatiini ajutise energiatalletajana. Vähirakus aitavad energia homöostaasi hoida adenüülükinaasid (AK) katalüüsides pöörduvat reaktsiooni, kus AMP ja ATP muudetakse kaheks ADP molekuliks (Fujisawa, 2023).

2 Töö eesmärgid

Metaboolset plastilisust on tänaseks kirjeldatud mitmetes kasvajatüüpides, kuid CRC puhul on uurimistööde aluseks olnud peamiselt rakuliinid. Kuigi see annab meile tugevad algteadmised, ei kirjelda sellised kontrollitud tingimused täpselt patsiendi organismis toimuvat. Tänaseks ei ole veel teada, millisel hetkel kasvaja arengu käigus energiametabolismi ümber reguleeritakse ning millisel tasemel see protsess toimub. Sellest tulenevalt on käesoleva uurimistöö eesmärgid järgmised:

1. mõõta energiametabolismis osalevate geenide ekspresioonitasemeid ning vastavate valkude hulka CRC koes ning soole kontrollkoes;
2. võrrelda glükolüüsi protsessis toimuvaid muutuseid kontrollkoes ja CRC koes geeni ja valgu ekspresiooni tasemel;
3. kirjeldada energiatranspordiradade ümber programmeerimist CRC koes geeni ja valgu ekspresiooni tasemel.

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Kliiniline materjal

Uurimuses teostatud katsed on kooskõlas Tervise Arengu Instituudi inimuuringute eetikakomitee otsustega nr KK557 ja KK558. Katsetes kasutati kolorektaalvähi (CRC) (n=14) ja normaalse soolekoe (n=14) proove, mis saadi Põhja-Eesti Regionaalhaigla onkoloogia- ja hematoloogiakliinikust. Soolekoe kontrollproovid koguti vähipatsientidelt 5 cm kauguselt tuumorist. Antud töö valimisse kuulusid patsiendid, kellel esines primaarne lokaalne või lokaalselt arenenud CRC ning kes ei olnud eelnevalt saanud keemilise kiiritusravi. Proove transporditi Mitomedium B lahuses (0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 60 mM K-Laktobionaat, 20 mM tauriin, 3 mM KH₂PO₄, 110 mM sukroos, 20 mM HEPES; pH 7,1) (Kaambre et al., 2012), kuhu lisati BSA (5 mg/mL), DTT (0,5 mM) ja leupeptiin (5 µL). Hilisemaks geeniekspressiooni analüüsiks koguti paralleelselt proovimaterjali ka RNAlater stabiliseerimislahuses (Qiagen).

3.2 Geeniekspressiooni mõõtmine

3.2.1 RNA eraldus

CRC ja kontrollkoe proovidest RNA eraldamiseks järgiti Untergasseri protokoll (Untergasser, 2008). Kliiniline materjal homogeniseeriti Trizoli reagentis (Invitrogen) ja RNA eraldamiseks kasutati RNeasy Mini Kit-i (Qiagen). Genoomse DNA eemaldamiseks töödeldi proove DNase I lahusega (Qiagen) ning RNA elueeriti kolonnist RNAasi vaba veega (Qiagen). Saadud RNA kontsentratsioon mõõdeti BioSpec-Nano spektrofotomeetriga (Shimadzu) ning säilitati edasise kasutamiseni -80 °C juures.

3.2.2 cDNA süntees

Eraldatud RNA-d (2 µg) kasutati komplementaarse DNA (cDNA) sünteesiks, mille jaoks kasutati High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-i koos RNAasi inhibiitoriga (Applied Biosynthesis) ning järgiti tootjapoolset protokoll. Pöördtranskriptsiooni (RT) segu koosnes 10x RT puhvrast, 25x desoksünukleotiidide (dNTP) segust, 10x RT praimeritest, MultiScribe™ pöördtranskriptaasist, RNAasi inhibiitorist ja puhtast veest. Reaktsiooni läbiviimiseks kasutati Eppendorf® 5332 Mastercycler termotsüklerit. RT protsess algas lahuse inkubeerimisega 10 °C juures 5 minuti jooksul. Seejärel toimus reaktsioon 37 °C juures 120 minutit, misjärel inaktiveeriti reaktsioon pöördtranskriptaasiga 85 °C juures 5 minuti jooksul. Saadud cDNA lahjendati 30x puhta veega ja säilitati temperatuuril -20 °C.

3.2.3 Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon

Reaalaja kvantitatiivset pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (qRT-PCR) teostati LightCycler 480 II masinal (Roche) kasutades TaqMan Gene Expression Master Mix-i (Applied Biosystems). Geeniekspressiooni tasemete tuvastamiseks kasutati FAM mäkega TaqMan sonde (Applied Biosystems): *aktiin- β* (Hs01060665_g1), *AK1* (Hs00176119_m1), *AK2* (Hs01123132_g1), *AK4* (Hs03405743_g1), *AK6* (Hs00360444_g1), , *HK1* (Hs00175976_m1), *HK2* (Hs00606086_m1), *GLUT1* (Hs00892681_m1), *CK-BB* (Hs00176483_m1), *CKMT1* (Hs00179727_m1), *CKMT2* (Hs00176502_m1). Proovid pipeteeriti 384 kaevuga plaadile (Applied Biosystems) neljas korduses. Reaktsioonisegu puhtuse kontrollimiseks kasutati negatiivse kontrollina cDNA asemel puhast vett (MQ). Tulemused normaliseeriti *aktiin- β* suhtes.

3.3 Valgu taseme määramine

3.3.1 Valgu eraldus

Kontrollkoe ja CRC proovidest eraldati valgud mehaanilise töötuse ja lüüsimise käigus. Alustuseks pipeteeriti radioimmunosadestamise (RIPA) lüüsi puhvrit (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS) koos proteaasi inhibiitorite kokteiliga (PI) (Roche) 2mL Lysing Matrix A eraldustuubidesse (RotaPrep). Seejärel peenestati uhmriga külmunud koeproovid vedelas lämmastikus ja saadud puru lisati eelkirjeldatud lahusesse. Proove homogeniseeriti MonoLyzer (RotaPrep), kus neid töödeldi maksimaalse kiirusega 10 sekundi jooksul 3 korda. Töötuste vahel hoiti proove jääl, et vältida temperatuuri mõju valkudele. Peale mehaanilist töötust asetati proovid loksutule ja jäeti 2 tunniks 4 °C juurde lüüsima. Seejärel tsentrifugeeriti proove temperatuuril 4 °C 20 minutit kiirusega 16 000 g-d, et muud koe komponendid põhja sadeneksid ning saadud supernatant, mis sisaldas valke RIPA puhvris koos PI-ga, tõsteti tuubidesse. Saadud valguproovid säilitati -80°C juures.

3.3.2 Valgu kontsentratsiooni määramine

Valgu kontsentratsiooni määramiseks kasutati Pierce BCA valgu analüüsi kit-i (Thermo Scientific). Standardina kasutati BSA lahuseid, mida lahjendati RIPA puhvris, kuhu oli lisatud PI. Valguproovidele tehti 3x lahjendus RIPA-s. Seejärel pipeteeriti iga standardlahus ja valguproov kolme kordusena mikrotiiterplaadi kaevikutesse, kuhu oli eelnevalt lisatud BCATM tööreagenti. Kaetud plaati inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit, jahutati toatemperatuurini ning neelduvused mõõdeti plaadilugejaga FLUOstar Omega (BMG Labtech) 562 nm juures. Valgu kontsentratsioonid proovides arvutati BSA standardkõvera alusel.

3.3.3 Naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees

Valgud lahutati naatriumdodetsüülsulfaat polüakrüülamiid geelelektroforeesil (SDS-PAGE), kasutades 10%-list SDS polüakrüülamiidgeeli (puhas vesi, 30% akrüülamiid, 1,5 M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% ammooniumpersulfaat, tetrametüületüleendiamiin) ja valati klaasile ning jäeti umbes 20 minutiks geelistuma. Geelifront fikseeriti butanooliga töötlemisel. Seejärel lisati 4%-line *stacking* geel (puhas vesi, 30% akrüülamiid, 0,5 M Tris pH 6,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED). Geeli jooksutati 1xSDS puhvris (25 mM Tris pH 8,3, 190 mM glütsiin, 0,1% SDS). Uuritavatele proovidele valmistati lahjendused, kus valgu sisaldus oli 30 µg. Seejärel lüüsi need Laemmleri laadimispuhvril (4% SDS, 20% glütserool, 120mM Tris pH6,8, 0,01% broomfenoolsinine, 5% merkaptoetanol) ning inkubeeriti 95 °C juures 5 minutit. Proovid pipeteeriti geeli taskutesse ja käivitati elektroforees kestusega 30 minutit voolutugevusel 80 V. Kui proovid olid jooksnud kahe geeli kokkupuute piirile, siis jätkati foreesi 120 V juures umbes 1,5 tundi.

3.3.4 Western blot analüüs

Antud töös kasutati *western blot* analüüsi valkude tuvastamiseks. Valkude ülekandeks geelilt polüvinülideenfluoriid (PVDF) membraanile (Immobilon®-P, 0,45 µm) (Merck Millipore) kasutati *wet blotting* meetodit ülekandepuhvril (24mM Tris, 192mM glütsiin, 20% metanol). Anoodile lisati olulised tarvikud järjekorras: anood, švamm, filterpaber, geel, membraan, filterpaber, švamm, katood. Ülekanne toimus voolutugevusel 45 mA 2 tunni jooksul. Peale ülekannet asetati membraan 15 minutiks Ponceau S värvimislahusesse (Thermo Scientific) ning enne pildistamist eemaldati taust fosfaatpuhverdatud soola- ja detergendifilahiuses (PBST) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20). Seejärel blokeeriti membraan 5% piimalahuses 30 minutit, pesti 3 korda PBST lahuses ning jäeti primaarsete antikehadega (Tabel 1) inkubeerima vähemalt kaheks tunniks. Primaarse antikeha töötluste järgselt pesti membraane 3x5 minutit, misjärel inkubeeriti membraani sekundaarse antikehaga 1 tunni vältel. Sekundaarse antikehana kasutati küüliku IgG vastast kitse antikeha (goat-anti rabbit IgG HRP) (Invitrogen) lahjenduses 1:2000 või 1:4000. Kemoluminestsentsi tuvastamiseks kasutati SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) vastavalt tootja protokollile. Signaal detekteeriti masinaga BioSpectrum® Imaging System (Ultra-Violet Products Ltd.).

Tabel 1. Töös kasutatud primaarsed antikehad ning nende optimeeritud lahjendused.

Valk	Antikeha	Tootja	Lahjendus
AK1	Sc-365316	Santa Cruz	1:500
AK2	PA5-28611	Invitrogen	1:500
AK4	PA5-61978	Invitrogen	1:500
AK6	10544-1-AP	Proteintech	1:200
HK1	PA5-117986	Invitrogen	1:1000
HK2	PA5-29326	Invitrogen	1:2500

3.4 Andmete analüüs

qRT-PCR-l saadud geeniekspressiooni tasemed normaliseeriti *aktiin-β* geeni suhtes. *Western blot* meetodil mõõdetud valgu tasemed normaliseeriti Ponceau S-ga visualiseeritud kogu valgu suhtes. Valgu hulga kvantifitseerimiseks kasutati ImageJ tarkvara, kus eemaldati taust ja määrati iga valgupiigi pindala. Andmete analüüsimiseks kasutati *student* t-testi, kus statistiliselt olulisteks arvestati p-väärtusi $< 0,05$. Antud töös olevad tulemused on esitatud kujul aritmeetiline keskmine \pm standardviga (SEM). Arvutuste ja graafikute tegemiseks kasutati MS Excel ja SigmaPlot 11.0.

4 Tulemused ja arutelu

4.1 Patsientide kliinilised andmed

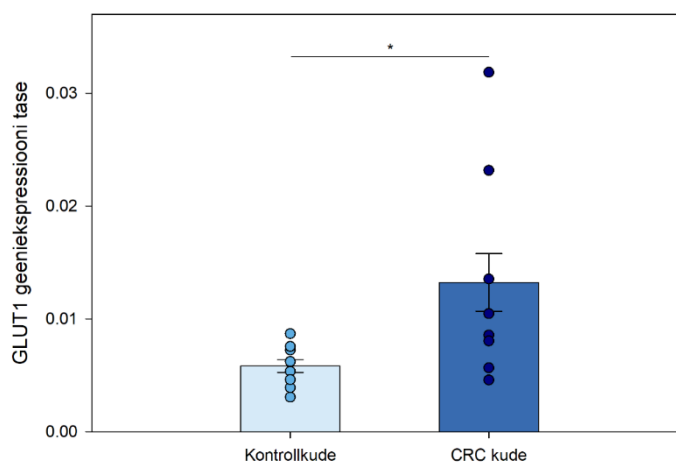
Antud uuringu valimisse kuulus 14 CRC patsienti, kellelt võeti nii vähi- kui ka kontrollproov. Uuringusse kaasatud 14 patsiendist 8 patsienti (57,1%) oli meessoost ning 6 patsienti (42,9%) oli naissoost. Patsientide keskmine vanus oli 74,1 aastat, kusjuures kõige noorem patsient oli 56-aastane ja kõige vanem patsient 85-aastane. Kasvaja lokalisatsioon patsientidel jagunes järgnevalt: 1 (7,1%) umbsooles, 5 (35,7%) ülenevas käärsooles, 2 (14,3%) jämesoole maksanurgas, 3 (21,4%) ristikäärsooles, 1 (7,1%) jämesoole põrnanurgas, 1 (7,1%) alanevas käärsooles ja 1 (7,1%) sigmakäärsooles. CRC I staadium diagnoositi 1 (7,1%) patsiendil, II staadium 6 (42,9%) patsiendil ja III staadium 7 (50%) patsiendil.

4.2 Energiametabolismiga seotud geenide ekspressioonitasemed

4.2.1 Glükolüüsiga seotud geenide ekspressioonitasemed

Kasutades qRT-PCR meetodit mõõdeti glükoosi metabolismis osalevate geenide *GLUT 1*, *HK1* ja *HK2* ekspressioonitasemed terves soolekoes ja vähikoos.

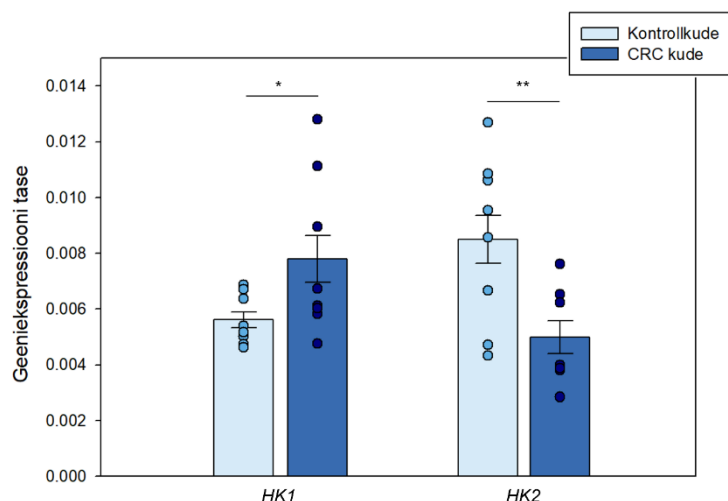
Kõige esimene samm glükoosi metabolismis on glükoosi sisenemine rakku, mis toimub läbi rakumembraanis asuvate glükoosi transporterite. GLUT perekonda kuulub 14 transportvalku, mille hulgas on kõige rohkem uuritud ja näidatud GLUT1 ja GLUT3 rolli vähi arengus (Ancey et al., 2018). Antud töö tulemuste järgi ekspresseerus *GLUT1* CRC koes 2 korda kõrgemalt kui terves soolekoes ($p = 0,013$) (Joonis 3), mis võib viidata suuremale glükoosi kasutamisele vähirakkudes.



Joonis 3. Glükoosi transporter 1 (*GLUT1*) ekspressioonitase soole kontrollkoes (n=8) ja kolorektaalvähi (CRC) koes (n=8). Veapostid näitavad standarddviaga. * $p < 0,05$ (t-test)

Immunohistokeemilised uuringud on CRC puhul näidanud, et mida kõrgemalt ekspresseerub *GLUT1*, seda agressiivsem on kasvaja. Seega on pakutud, et *GLUT1* võib olla oluline vähimarker, mis annab kliinilises diagnostikas olulist teavet CRC arengu kohta. Samuti on leitud, et *GLUT1* üleekspressioon on seotud CRC kehva elulemusega (Haber et al., 1998). *GLUT1* seost kasvaja maliigsusega on märgatud veel paljude vähitüüpide, nagu rinnavähi, munasarjavähi, pankreasevähi, puhul (Brown & Wahl, 1993; Cantuaria et al., 2000; Yamamoto et al., 1990). Vaadeldud proovidest kahel on märgata selgelt kõrgemat *GLUT1* ekspressiooni, mis võib viidata sellele, et kasvaja on väga invasiivne. Mõlemal kõrge *GLUT1* ekspressiooniga patsiendil oli diagnoositud II staadiumi CRC. Jälgides nende patseintide edasist käekäiku võime tulevikus püüda ennustada, kas kõrge ekspressioonitase võis viidata agressiivsusele.

Suurem glükoosi tarbimine ei viita tingimata glükolüüsi suurenemisele. Heksokinaasid on olulised ensüümid glükolüüsi reguleerimises, katalüüsides ATP-sõltuvalt rakulise glükoosi fosforüleerimist G-6-P-ks (Wilson, 2003). Varasemalt on soolevähi rakuliinidel näidatud, et *HK2* on üleekspressioneeritud (Wang et al., 2021), kuid antud töö tulemused patsiendi vähimaterjaliga näitasid vastupidiselt *HK2* ekspressioonitaseme langust vähikoos võrreldes terve soolekoega ($p = 0,006$) (Joonis 4).



Joonis 4. Heksokinaas 1 (*HK1*) ja heksokinaas 2 (*HK2*) geeniekspressiooni tasemed soole kontrollkoos ($n=8$) ja kolorektaalivähi (CRC) koos ($n=8$). Veapostid näitavad standardviga.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t-test).

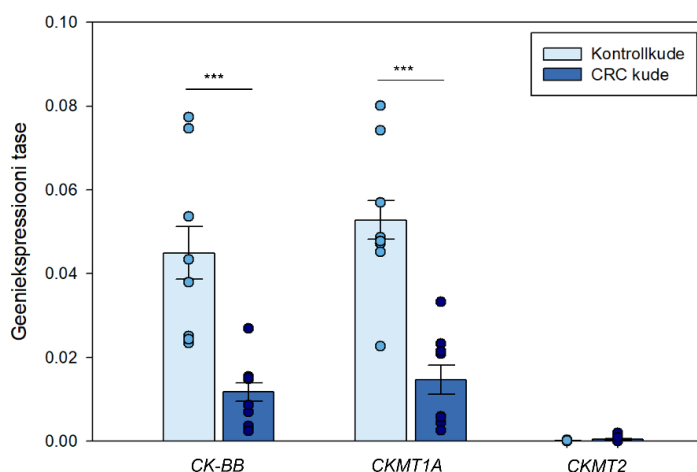
Vastavalt Pederseni mudelile (Bustamante & Pedersen, 1977) toetab *HK2* ülesreguleerimine kõrgelt glükolüütilist fenotüüpi, mistõttu võib järeldada, et CRC rakkudes ei üle glükolüüsi rada ülesaktiveeritud. Seevastu *HK1* ekspresseerus CRC koos kõrgemalt kui kontrollkoos ($p = 0,027$), mis on vastavuses varasemate andmetega. Chekulayev et al. (Chekulayev et al., 2015) järgi on üles ekspresseeritud *HK1*-ga CRC-s mõõdetud ka kõrgem glükolüütiline aktiivsus kõrglahutava respiromeetria meetodil. Sellest võib omakorda oletada, et *HK1* üleekspressiooniga kaasneb kõrgem glükolüütiline aktiivsus. Selline vastuolu võib tähendada, et Pederseni 50 aastat vana

hüpotees ei ole tõene CRC koes, kuid selle järelduse kinnitamiseks tuleb suurendada valimiarvu ning ekspressiooni määratavate geenide hulka ja mõõta glükolüütiliste metaboliitide hulka koes.

4.2.2 Energiatransporditeedega seotud geenide ekspressioonitasemed

Antud töös mõõdeti kolme kreatiinkinaasi isovormi (*CK-BB*, *CKMT1A*, *CKMT2*) (Joonis 5) ja nelja adenülaatkinaasi isovormi (*AK1*, *AK2*, *AK4*, *AK6*) (Joonis 6) geeniekspressiooni tasemed terves soolekoes ja CRC koes.

Kreatiinkinaaside (CK) abil muudetakse fosfokreatiin ATP-ks, et sinna talletunud energiat hiljem kasutada (Theo Wallimann et al., 2011). Käesolevas töös mõõdetud tulemuste järgi oli *CK-BB* ja *CKMT1A* ekspressioonitase vähikoes madalam kui kontrollkoes ($p < 0,001$ mõlemal juhul) (Joonis 5).

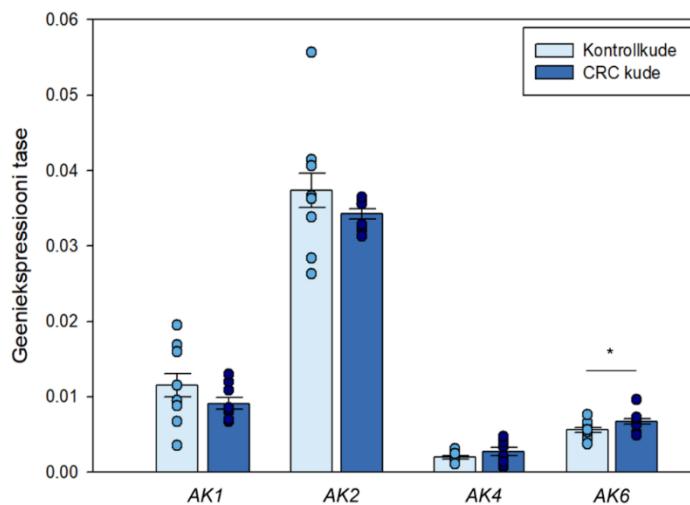


Joonis 5. Kreatiinkinaasi isovormide (*CK-BB*, *CKMT1A* ja *CKMT2*) geeniekspressiooni tasemed soole kontrollkoes (n=8) ja kolorektaalvähi (CRC) koes (n=8). Veapostid näitavad standarddviaga.*** $p < 0,001$ (t-test).

Saadud tulemused on vastavuses varasemate andmetega (Chekulayev et al., 2015; Kaldma et al., 2014), kus pakutakse, et CK-d on kasvajakoes allareguleeritud. Katsed Skov3 rakuliinidega näitasid, et *CK-BB* inhibeerimine vähendab glükolüüsi kasutamist vähirakkudes ja samas võimendab OXPHOS-i, mille tulemusel peatub rakkude proliferatsioon (Li et al., 2013). *CKMT* allareguleerimise tulemusel kaob CRC-s VDAC-CKMT-ANT kompleksi vaheline funktsionaalsus ja tekib VDAC-HK-ANT kompleks, mis soodustab glükolüüsi (Reinsalu et al., 2021). Kuna antud töös esines vähikoes kõrge *HK1* ekspressioonitase, siis võib järeldada, et uuritav kliiniline materjal on väga heterogeenne. *CKMT2* ekspressioonitasemel polnud vähikoe ja kontrollkoe vahel erinevusi.

Töö tulemustest selgus, et *AK1*, *AK2* ja *AK4* ekspressioonitasemel ei esinenud olulisi statistilisi erinevusi terve soolekoe ja CRC koe vahel (Joonis 6). Üldiselt tundub, et *AK1* ja *AK2* ekspresseerusid CRC-s vähem kui terves soolekoes, mis on aga vastuolus kirjanduses esitatud

andmetega (Chekulayev et al., 2015; Kaldma et al., 2014), mille alusel peaks kasvajas olema CK-de geeniekspressioon madal ja AK-d on energiaülekande keskpunktis.



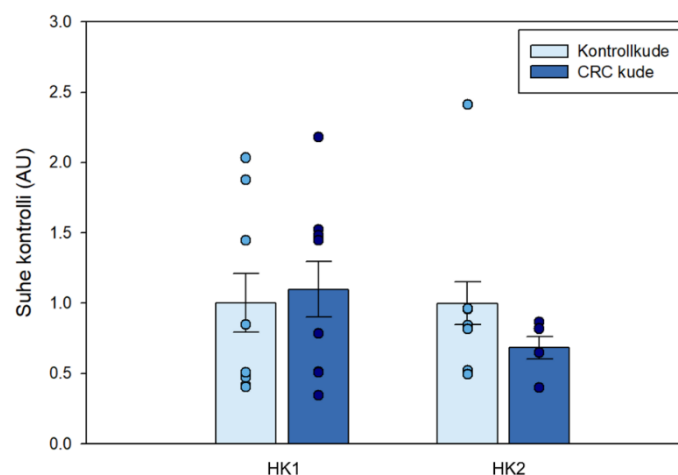
Joonis 6. Adenülatkinaasi isovormide (AK1, AK2, AK4, AK6) geeniekspressiooni tasemed soole kontrollkoes (n=8) ja CRC koes (n=8). Veapostid näitavad standardviga. * $p < 0,05$ (t-test).

Katsed rinnavähi rakuliinidega MCF-7 ja C33A on näidanud, et AK2 allareguleerimine soodustab rakkude jagunemist ja kasvaja arengut (Kim et al., 2014). AK6 ekspresseerub CRC koes kõrgemalt kui soole kontrollkoes. AK6 üleekspressioon vähendab Warburgi efekti kasutamist läbi LDHA fosforüleerimise (Ji et al., 2017).

4.3 Energiametabolismiga seotud valgu tasemed

4.3.1 Heksokinaasid

Kasutades *Western blot* meetodit ja kvantitatiivset analüüsi tuvastati valkude HK1 ja HK2 sisaldus soole kontrollkoes ja CRC koes (Joonis 7). Tulemuses selgus, et HK1 ja HK2 valgu tasemed terves soolekoes ja vähikoes pole statistiliselt erinevad. See võib tuleneda asjaolust, et heterogeense kliinilise materjali jaoks on proovide arv liiga väike. Seetõttu on edaspidiseks uurimiseks vaja tõsta valimi arvu.

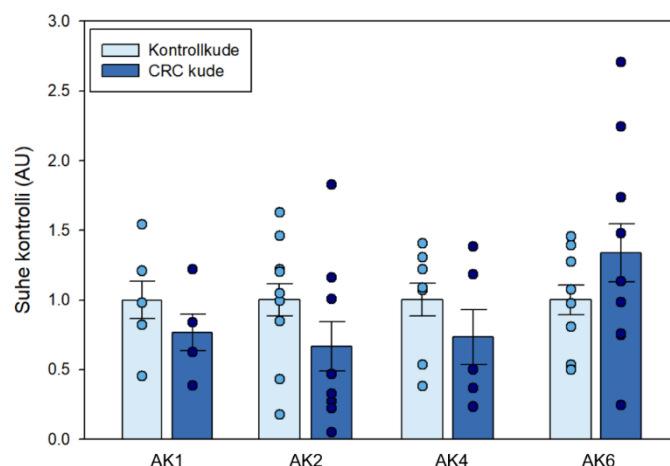


Joonis 7. Heksokinaas 1 (HK1) ja Heksokinaas 2 (HK2) valgutasemed soole kontrollkoos (vastavalt n=8 ja n=7) ja kolorektaalivähi (CRC) koos (vastavalt n=8 ja n=4). Veapostid näitavad standarddviiga.

Uurimusse kaasatud patsientide kliiniliste andmete ja graafikul esitatud proovide jaotuse põhjal võib eeldada inimese kliinilise materjali suurt heterogeensuse ulatust, sest heterogeensus on kõrge nii kontroll- kui kasvajakoes. Võrreldes vähikoe *HK1* geeniekspressiooni tulemusi valgu hulga esinemisega võiks oletada, et osad uuritavatest CRC proovidest eelistavad glükolüüsi. Kahjuks ei olnud antud uurimistöö käigus haiglast tulnud materjali hulk piisav, et mõõta samades proovides nii geeniekspressioon kui ka valgu hulk. Edaspidi on oluline uurida, kas kõrgeid ekspresseerijaid on korrelatsioonis ka kõrge valgu hulgaga. Huvitav tendents esineb ka kõrge *HK2* geeniekspressiooni tasemel terves soolekoos, kuna kirjanduse alusel imetajate koos esineb vähe *HK2*-e (S. P. Mathupala et al., 2006). Keskmise *HK2* valgu hulk CRC koos paistab sarnaselt *HK2* geeniekspressioonile olevat madalam kui kontrollkoos, kuid erinevus ei ole statistiliselt oluline. Kusjuures oli *HK2* detekteeritav uuritud üheksast proovist ainult neljas. See ei olnud korrelatsioonis proovi vanusega, mistõttu võib arvata, et mõningal juhul oli CRC rakkudes *HK2* hulk väga väike. See on taaskord vastuolus Pederseni hüpoteesiga (Bustamante & Pedersen, 1977), et vähirakkudes domineerib glükolüütiline metabolism *HK2* toel. Kuigi varasemad uuringud on näidanud, et primaarsetes ja malignsetes kasvujätkes on glükolüüs üles reguleeritud (Cantor & Sabatini, 2012), siis CRC-s antud töö tulemuste järgi sellist metaboolset reprogrammeerimist ei toimu.

4.3.2 Adenülaatkinaasid

Kasutades *western blot* meetodit ja kvantitatiivset analüüsi tuvastati valkude AK1, AK2, AK4, AK6 sisaldus soole kontrollkoos ja CRC koos. Töö tulemused ei näidanud statistiliselt olulisi erinevusi terve ja malignse koe vahel ühegi AK isovormi puhul, kuigi oletatav tendents tuleb graafikult välja (Joonis 8). See võib taaskord tuleneda väikesest proovide arvust. Seejuures on oluline märkida, et AK1 oli detekteeritav nii kontroll- kui vähimaterjali puhul ainult pooltes proovides, mistõttu korratakse tulevikus eksperimenti uue antikehaga.



Joonis 8. Adenülaatkinaaside isovormide (AK1, AK2, AK4, AK6) valgutasemed soole kontrollkoos (AK1 jaoks n=5, AK2 ja AK6 jaoks n=9, AK4 jaoks n=7) ja CRC koos (AK1 jaoks n=4, AK2 ja AK6 jaoks n=9, AK4 jaoks n=5). Veapostid näitavad standardviga.

Proovide heterogeensus on suur nii terves kui ka kasvajakoes. CRC proovides varieeruvad AK1 ja AK6 tasemed laialt ja ühtlaselt, kuid AK2 ja AK4 isovormide puhul moodustuvad tinglikult kõrge ja madala valguga grupid. Kahe kõige kõrgema AK2 hulga CRC proovi olid mõlemad saadud meespatsientidelt, kellel oli diagnoositud II staadiumi CRC ristikäärsooles. Kolmas keskmisest kõrgem proov oli aga naispatsiendilt III staadiumi kasvajaga jämesoole maksanurgas. Seega ei ole AK2 valguga hulk selgelt korrelatsioonis patsientide klinikopatoloogiliste omadustega. Kaks keskmisest kõrgema AK4 hulga patsienti on samuti mõlemad II staadiumi CRC-ga meespatsiendid, kuid ühel on kasvaja ristikäärsooles ning teisel sigmakäärsooles. Neljas kasvaja-proovis üheksast ei olnud AK4 detekteeritav. Selgitamiseks, kas see tuleneb proovide eripärast või antikehast on plaanis eksperimenti korrata uue antikehaga ja laiendada valimit. Varasemalt on näidatud AK6 üleekspressiooni CRC-s, kus ta omab erilist olulist rolli kasvaja tüvirakkudes fosforüleerides LDHA-d ja soodustades seeläbi glükolüütilist fenotüüpi. Seejuures AK6 inhibeerimine põhjustas raku surma nii tüvirakkudes kui ka mitte tüvirakkudes (Ji et al., 2017). Sellest tulenevalt on uurimistöö jätkamisel eesmärk leida korrelatsioon AK6 taseme ja mitokondriaalse ning glükolüütilise energiatootmise suhte vahel.

Kokkuvõte

Kolorektaalvähk on aeglaselt arenev kasvaja, mistõttu avastakse see tavaliselt hilises staadiumis. Seepärast oleks vaja leida võimalusi kasvaja varasemaks avastamiseks või leida sihtmärke uutele ravistrateegiatele. Vähhkasvajale omast kiiret proliferatsiooni toetab metabolismi ümberkujundamine, mis tagab tõhusa energia tootmise. Mitmed vähitüübid eelistavad oksüdatiivse fosforüülimise asemel kasutada aeroobset glükolüüsi.

Antud töö eesmärk oli iseloomustada kolorektaalvähi bioenergeetilist profiili ning võrrelda energiametabolismis osaleva 10 geeni ekspressiooni ja kuue valguga taseme andmeid terves soolekoes ja soolevähi koes.

Töö tulemused näitavad, et uuritud kliiniline materjal oli väga heterogeenne, mistõttu suur hulk tulemustest ei näidanud statistiliselt olulisi erinevusi terve ja kasvajakoe vahel. Glükoosi metabolismis osalevate geenide ekspressioonitasemetest selgus, et kolorektaalvähk võib suurendada glükolüüsi hulka, kuid saadud valgutase ei andnud statistiliselt olulist kinnitust. Energiatranspordiradade metabolismis osalevate kinaaside geeniekspressiooni andmetel selgus, et kasvajakoes langeb kreatiinkinaaside aktiivsus, kuid adenülaatkinaaside puhul sarnanes ekspressioonitasemed kontrollis ja tuumoris. Ainult AK6 oli vähikoes üleekspresseeritud.

Kliinilise materjali heterogeensusest tulenevalt oleks vaja enamik katseid korrata palju suurema valimi hulgaga. Kolorektaalvähi bioenergeetilise profiili mõistmiseks on vaja lisaks mõõta kreatiinkinaaside ja glükoositransporterite valguga esinemise tasemeid, glükolüütiliste metaboliitide hulka koes ning tõsta oluliselt ekspressiooni määratavate geenide hulka. Lisaks oleks huvitav rakendada paralleelselt proovidele funktsionaalseid uuringuid kõrglahutava respiromeetria meetodil, et selgitada, kuidas geeniekspressiooni ja valguga tasemel toimuvad muutused peegelduvad oksüdatiivse fosforüülimise ja glükolüüsi aktiivsuses. Suurema proovide hulga korral oleks ka võimalik vaadelda, kas metaboolne reprogrammeerimine ja patsiendi klinikopatoloogilised omadused on omavahel seotud.

Tänuavaldused

Alustuseks soovin tänada enda juhendajat, Leenu Reinsalu, kannatlikkuse ja heatahtlikkuse eest, mis on mulle palju tuge pakkunud. Olen tänulik meie paindliku ja sujuva koostöö eest.

Samuti soovin tänada KBFI keemilise bioloogia uurimisrühma juhti Tuuli Käämbret ja teisi liikmeid, kes oma nõu ja jõuga olid abiks. Lisaks kuulub tänulikkus ka perekonnale ja sõpradele, kes mõnikord uskusid minusse rohkem kui ma ise.

Kasutatud kirjandus

- Ancey, P. B., Contat, C., & Meylan, E. (2018). Glucose transporters in cancer – from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS Journal*, 285(16), 2926–2943. <https://doi.org/10.1111/febs.14577>
- Bellance, N., Benard, G., Furt, F., Begueret, H., Smolková, K., Passerieux, E., Delage, J. P., Baste, J. M., Moreau, P., & Rossignol, R. (2009). Bioenergetics of lung tumors: Alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(12), 2566–2577. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.08.012>
- Bonora, E., Porcelli, A. M., Gasparre, G., Biondi, A., Ghelli, A., Carelli, V., Baracca, A., Tallini, G., Martinuzzi, A., Lenaz, G., Rugolo, M., & Romeo, G. (2006). Defective oxidative phosphorylation in thyroid oncocyctic carcinoma is associated with pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting complexes I and III. *Cancer Research*, 66(12), 6087–6096. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0171>
- Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)
- Brosens, L. A. A., Offerhaus, G. J. A., & Giardiello, F. M. (2015). Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *Surgical Clinics of North America*, 95(5), 1067–1080. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2015.05.004>
- Brown, R. S., & Wahl, R. L. (1993). Overexpression of glut-1 glucose transporter in human breast cancer an immunohistochemical study. *Cancer*, 72(10), 2979–2985. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19931115\)72:10<2979::AID-CNCR2820721020>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931115)72:10<2979::AID-CNCR2820721020>3.0.CO;2-X)
- Bu, P., Chen, K. Y., Xiang, K., Johnson, C., Crown, S. B., Rakhilin, N., Ai, Y., Wang, L., Xi, R., Astapova, I., Han, Y., Li, J., Barth, B. B., Lu, M., Gao, Z., Mines, R., Zhang, L., Herman, M., Hsu, D., ... Shen, X. (2018). Aldolase B-Mediated Fructose Metabolism Drives Metabolic Reprogramming of Colon Cancer Liver Metastasis. *Cell Metabolism*, 27(6), 1249-1262.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.04.003>
- Bustamante, E., & Pedersen, P. L. (1977). High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(9), 3735–3739. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3735>
- Cabaniss, C. D. (1990). Creatine Kinase. In H. K. Walker, W. D. Hall, & J. W. Hurst (Eds.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory* (3rd ed.). Butterworths.
- Cantor, J. R., & Sabatini, D. M. (2012). Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces. *Cancer Discovery*, 2(10), 881–898. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0345>
- Cantuaria, G., Magalhaes, A., Penalver, M., Angioli, R., Braunschweiger, P., Gomez-Marin, O., Kanhoush, R., Gomez-Fernandez, C., & Nadji, M. (2000). Expression of GLUT-1 glucose transporter in borderline and malignant epithelial tumors of the ovary. *Gynecologic Oncology*, 79(1), 33–37. <https://doi.org/10.1006/gyno.2000.5910>
- Chekulayev, V., Mado, K., Shevchuk, I., Koit, A., Kaldma, A., Klepinin, A., Timohhina, N., Tepp, K., Kandashvili, M., Ounpuu, L., Heck, K., Truu, L., Planken, A., Valvere, V., & Kaambre, T. (2015). Metabolic remodeling in human colorectal cancer and surrounding tissues: Alterations in regulation of mitochondrial respiration and metabolic fluxes. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 4, 111–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.020>
- Dasgupta, S., Soudry, E., Mukhopadhyay, N., Shao, C., Yee, J., Lam, S., Lam, W., Zhang, W., Gazdar, A. F., Fisher, P. B., & Sidransky, D. (2012). Mitochondrial DNA mutations in respiratory complex-I in never-smoker lung cancer patients contribute to lung cancer progression and associated with EGFR gene mutation. *Journal of Cellular Physiology*, 227(6), 2451–2460. <https://doi.org/10.1002/jcp.22980>
- De Berardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science*

- Advances*, 2(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- DeLuca, M., Hall, N., Rice, R., & Kaplan, N. O. (1981). Creatine kinase isozymes in human tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 99(1), 189–195. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291x\(81\)91731-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291x(81)91731-9)
- Dzeja, P. P., & Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *Journal of Experimental Biology*, 206(12), 2039–2047. <https://doi.org/10.1242/jeb.00426>
- Dzeja, P., & Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), 1729–1772. <https://doi.org/10.3390/ijms10041729>
- Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487). <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>
- Fendt, S. M., Frezza, C., & Erez, A. (2020). Targeting metabolic plasticity and flexibility dynamics for cancer therapy. *Cancer Discovery*, 10(12), 1797–1807. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0844>
- Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3), 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.025>
- Fujisawa, K. (2023). Regulation of Adenine Nucleotide Metabolism by Adenylate Kinase Isozymes: Physiological Roles and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5561. <https://doi.org/10.3390/ijms24065561>
- Fujisawa, K., Terai, S., Takami, T., Yamamoto, N., Yamasaki, T., Matsumoto, T., Yamaguchi, K., Owada, Y., Nishina, H., Noma, T., & Sakaida, I. (2016). Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0322-2>
- Fukami-Kobayashi, K., Nosaka, M., Nakazawa, A., & Go, M. (1996). Ancient divergence of long and short isoforms of adenylate kinase: Molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family. *FEBS Letters*, 385(3), 214–220. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00367-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00367-5)
- Gautheron, D. C. (1984). SECTION III : DISORDERS OF THE RESPIRATORY CHAIN AND THE LACTIC ACIDAEMIAS Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Respiratory Chain : Review. *Cell*, 1, 57–61.
- Haber, R. S., Rathan, A., Weiser, K. R., Pritsker, A., Itzkowitz, S. H., Bodian, C., Slater, G., Weiss, A., & Burstein, D. E. (1998). GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: A marker for poor prognosis. *Cancer*, 83(1), 34–40. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19980701\)83:1<34::AID-CNCR5>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19980701)83:1<34::AID-CNCR5>3.0.CO;2-E)
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hardie, D. G., & Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: The energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 23(12), 1112–1119. <https://doi.org/10.1002/bies.10009>
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, VOL. 54, 1015–1069. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.54.1.1015>
- Hayashi, J. I., Takemitsu, M., & Nonaka, I. (1992). Recovery of the missing tumorigenicity in mitochondrial DNA-less HeLa cells by introduction of mitochondrial DNA from normal human cells. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 18(2), 123–129. <https://doi.org/10.1007/BF01233159>
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Hofseth, L. J., Hebert, J. R., Chanda, A., Chen, H., Love, B. L., Pena, M. M., Murphy, E. A., Sajish, M.,

- Sheth, A., Buckhaults, P. J., & Berger, F. G. (2020). Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *17*(6), 352–364. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0253-4>
- Hosono, K., Endo, H., Takahashi, H., Sugiyama, M., Uchiyama, T., Suzuki, K., Nozaki, Y., Yoneda, K., Fujita, K., Yoneda, M., Inamori, M., Tomatsu, A., Chihara, T., Shimpo, K., Nakagama, H., & Nakajima, A. (2010). Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Molecular Carcinogenesis*, *49*(7), 662–671. <https://doi.org/10.1002/mc.20637>
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, *134*(5), 703–707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- Iommarini, L., Calvaruso, M. A., Kurelac, I., Gasparre, G., & Porcelli, A. M. (2013). Complex I impairment in mitochondrial diseases and cancer: Parallel roads leading to different outcomes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *45*(1), 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.016>
- Ji, Y., Yang, C., Tang, Z., Yang, Y., Tian, Y., Yao, H., Zhu, X., Zhang, Z., Ji, J., & Zheng, X. (2017). Adenylate kinase hCINAP determines self-renewal of colorectal cancer stem cells by facilitating LDHA phosphorylation. *Nature Communications*, *8*(May), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms15308>
- Kaambre, T., Chekulayev, V., Shevchuk, I., Karu-Varikmaa, M., Timohhina, N., Tepp, K., Bogovskaja, J., Kütner, R., Valvere, V., & Saks, V. (2012). Metabolic Control Analysis of cellular respiration in situ in intraoperational samples of human breast cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *44*(5), 539–558. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9457-9>
- Käämbre, T., Koit, A., Ševtšuk, I., Tšekulajev, V., Tepp, K., Timohhina, N., Bogovskaja, J., & Valvere, V. (2013). Uusi suundi kasvajate energiametabolismi uuringutes. *Eesti Arst*, 261–267.
- Kaldma, A., Klepinin, A., Chekulayev, V., Mado, K., Shevchuk, I., Timohhina, N., Tepp, K., Kandashvili, M., Varikmaa, M., Koit, A., Planken, M., Heck, K., Truu, L., Planken, A., Valvere, V., Rebane, E., & Kaambre, T. (2014). An in situ study of bioenergetic properties of human colorectal cancer: The regulation of mitochondrial respiration and distribution of flux control among the components of ATP synthasome. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *55*, 171–186. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.09.004>
- Kanemitsu, F., Kawanishi, I., Mizushima, J., & Okigaki, T. (1984). Mitochondrial creatine kinase as a tumor-associated marker. *Clinica Chimica Acta*, *138*(2), 175–183. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(84\)90232-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(84)90232-8)
- Kassauei, K., Habbe, N., Mullendore, M. E., Karikari, C. A., Maitra, A., & Feldmann, G. (2006). Mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, *37*(2–3), 57–64. <https://doi.org/10.1007/s12029-007-0008-2>
- Khoo, J. C., & Russell, P. J. (1972). *Isoenzymes of adenylate kinase in human tissue*. *Biochimica et biophysica acta*. *268*(1), 98–101. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2744\(72\)90202-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2744(72)90202-1)
- Kim, H., Lee, H. J., Oh, Y., Choi, S. G., Hong, S. H., Kim, H. J., Lee, S. Y., Choi, J. W., Su Hwang, D., Kim, K. S., Kim, H. J., Zhang, J., Youn, H. J., Noh, D. Y., & Jung, Y. K. (2014). The DUSP26 phosphatase activator adenylate kinase 2 regulates FADD phosphorylation and cell growth. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4351>
- Klepinin, A., Ounpuu, L., Guzun, R., Chekulayev, V., Timohhina, N., Tepp, K., Shevchuk, I., Schlattner, U., & Kaambre, T. (2016). Simple oxygraphic analysis for the presence of adenylate kinase 1 and 2 in normal and tumor cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *48*(5), 531–548. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9687-3>
- La Vecchia, S., & Sebastián, C. (2020). Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *98*(March 2019), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.018>
- Li, X. H., Chen, X. J., Ou, W. Bin, Zhang, Q., Lv, Z. R., Zhan, Y., Ma, L., Huang, T., Yan, Y. Bin, & Zhou, H. M. (2013). Knockdown of creatine kinase B inhibits ovarian cancer progression by

- decreasing glycolysis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(5), 979–986. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.003>
- Lim, H. Y., Ho, Q. S., Low, J., Choolani, M., & Wong, K. P. (2011). Respiratory competent mitochondria in human ovarian and peritoneal cancer. *Mitochondrion*, 11(3), 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.12.015>
- Liu, H., Pu, Y., Amina, Q., Wang, Q., Zhang, M., Song, J., Guo, J., & Mardan, M. (2019). Prognostic and therapeutic potential of Adenylate kinase 2 in lung adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53594-4>
- Liu, R., Ström, A. L., Zhai, J., Gal, J., Bao, S., Gong, W., & Zhu, H. (2009). Enzymatically inactive adenylate kinase 4 interacts with mitochondrial ADP/ATP translocase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(6), 1371–1380. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.12.002>
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., & Yoldi, M. J. R. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>
- Mathupala, S. P., Ko, Y. H., & Pedersen, P. L. (2006). Hexokinase II: Cancer’s double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25(34), 4777–4786. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209603>
- Mathupala, Saroj P., Ko, Y. H., & Pedersen, P. L. (2009). Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer’s stygian link to the “Warburg effect” and a pivotal target for effective therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 19(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.006>
- Mooney, S. M., Rajagopalan, K., Williams, B. H., Zeng, Y., Christudass, C. S., Li, Y., Yin, B., Kulkarni, P., & Getzenberg, R. H. (2011). Creatine kinase brain overexpression protects colorectal cells from various metabolic and non-metabolic stresses. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(4), 1066–1075. <https://doi.org/10.1002/jcb.23020>
- Nishioka, T., Oda, Y., Seino, Y., Yamamoto, T., Inagaki, N., Yano, H., Imura, H., Shigemoto, R., & Kikuchi, H. (1992). Distribution of the Glucose Transporters in Human Brain Tumors. *Cancer Research*, 52(14), 3972–3979.
- Noma, T., Fujisawa, K., Yamashiro, Y., Shinohara, M., Nakazawa, A., Gondo, T., Ishihara, T., & Yoshinobu, K. (2001). Structure and expression of human mitochondrial adenylate kinase targeted to the mitochondrial matrix. *Biochemical Journal*, 358(1), 225–232. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580225>
- Noma, Takafumi, Song, S., Yoon, Y. S., Tanaka, S., & Nakazawa, A. (1998). cDNA cloning and tissue-specific expression of the gene encoding human adenylate kinase isozyme 2. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1395(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00193-0)
- Panayiotou, C., Solaroli, N., & Karlsson, A. (2014). The many isoforms of human adenylate kinases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 49(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.014>
- Pedersen, P. L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers’ most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(3), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9094-x>
- Reinsalu, L., Puurand, M., Chekulayev, V., Miller, S., Shevchuk, I., Tepp, K., Rebane-Klemm, E., Timohhina, N., Terasmaa, A., & Kaambre, T. (2021). Energy Metabolic Plasticity of Colorectal Cancer Cells as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 11(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.698951>
- Ren, H., Wang, L., Bennett, M., Liang, Y., Zheng, X., Lu, F., Li, L., Nan, J., Luo, M., Eriksson, S., Zhang, C., & Su, X. D. (2005). The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 303–308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407459102>

- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., & Wallimann, T. (2006). Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(2), 164–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.09.004>
- Sciacovelli, M., Guzzo, G., Morello, V., Frezza, C., Zheng, L., Nannini, N., Calabrese, F., Laudiero, G., Esposito, F., Landriscina, M., Defilippi, P., Bernardi, P., & Rasola, A. (2013). The mitochondrial chaperone TRAP1 promotes neoplastic growth by inhibiting succinate dehydrogenase. *Cell Metabolism*, 17(6), 988–999. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.019>
- Shoshan-Barmatz, V., Maldonado, E. N., & Krelin, Y. (2017). VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress*, 1(1), 11–36. <https://doi.org/10.15698/cst2017.10.104>
- Shussman, N., & Wexner, S. D. (2014). Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology Report*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1093/gastro/got041>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tan, A. S., Baty, J. W., & Berridge, M. V. (2014). The role of mitochondrial electron transport in tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(4), 1454–1463. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.016>
- Tseng, L. M., Yin, P. H., Yang, C. W., Tsai, Y. F., Y., H. C., Chi, C. W., & Lee, H. C. (2011). Somatic mutations of the mitochondrial genome in human breast cancers. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 50(10), 800–811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/gcc.20901>
- Untergasser, A. (2008). RNAprep - Trizol combined with Columns. *Untergasser's Lab*, 25–28. http://www.untergasser.de/lab/protocols/rna_prep_comb_trizol_v1_0.htm
- Viale, A., Pettazzoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sánchez, N., Marchesini, M., Carugo, A., Green, T., Seth, S., Giuliani, V., Kost-Alimova, M., Muller, F., Colla, S., Nezi, L., Genovese, G., Deem, A. K., Kapoor, A., Yao, W., Brunetto, E., ... Draetta, G. F. (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*, 514(7524), 628–632. <https://doi.org/10.1038/nature13611>
- Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and Cancer. *Cell*, 166(3), 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002>
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., & Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*, 281(1), 21–40. <https://doi.org/10.1042/bj2810021>
- Wallimann, Theo, Tokarska-Schlattner, M., & Schlattner, U. (2011). The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*, 40(5), 1271–1296. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0877-3>
- Wang, N. N., Zhang, P. Z., Zhang, J., Wang, H. N., Li, L., Ren, F., Dai, P. F., Li, H., & Lv, X. F. (2021). Penfluridol triggers mitochondrial-mediated apoptosis and suppresses glycolysis in colorectal cancer cells through down-regulating hexokinase-2. *Anatomical Record*, 304(3), 520–530. <https://doi.org/10.1002/ar.24464>
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). I. Killing-Off of Tumor Cells in Vitro. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530.
- Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 206(12), 2049–2057. <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>
- Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., Yamada, Y., Inoue, K.,

- Manabe, T., & Imura, H. (1990). Over-expression on of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *170*, 223–230.
- Yan, Y. Bin. (2016). Creatine kinase in cell cycle regulation and cancer. *Amino Acids*, *48*(8), 1775–1784. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2217-0>
- Yoshida, G. J. (2015). Metabolic reprogramming: The emerging concept and associated therapeutic strategies. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *34*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0221-y>
- Zong, W. X., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell*, *61*(5), 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Janne Jegorkina,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Kolorektaalvähi energiametabolismis esinevad geneetilised ja valgulised muutused“,

mille juhendaja on Leenu Reinsalu,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

31.05.2023

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud üks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.