



**KOLOREKTAALVÄHI ARENGUT SOODUSTAVAD
ÜMBERKORRALDUSED ENERGIAMETABOLISMIS**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Betty Abel, 194039LAAB

Juhendaja: Leenu Reinsalu, doktorant-nooremteadur,

Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia

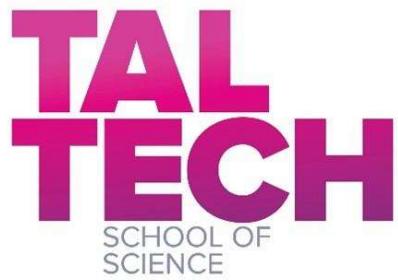
Autorideklaratsioon

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: Betty Abel
/allkirjastatud digitaalselt/

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Leenu Reinsalu
/allkirjastatud digitaalselt/

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Vello Tõugu
/allkirjastatud digitaalselt/



REARRANGEMENTS IN ENERGY METABOLISM PROMOTING THE DEVELOPMENT OF COLORECTAL CANCER

Bachelor thesis

Student: Betty Abel, 194039LAAB

Supervisor: Leenu Reinsalu, doctoral student-junior researcher,

National Institute of Chemical Physics and Biophysics

Study program: Applied Chemistry, Food, and Gene Technology

Sisukord

Lühendid.....	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Vähkkasvaja tunnusmärgid	7
1.1.1 Kolorektaalvähk ja soolepolüübidi	7
1.2 Energia tootmine rakus	8
1.2.1 Mitokonder ja raku hingamine.....	8
1.2.2 Mitokondri roll tumorigeneesis.....	10
1.3 Metaboolne reprogrammeerimine.....	10
1.3.1 Warburgi efekt	11
1.3.2 Heksokinaaside seos Warburgi efektiga.....	12
1.4 Energiatranspordi radade osalus metaboolsetes muutustes	13
1.4.1 Kreatiinkinaasid.....	14
1.4.2 Adenülaatkinaasid.....	14
2. Töö eesmärgid.....	15
3. Materjalid ja meetodid.....	16
3.1 Kliiniline materjal.....	16
3.2 Oksügraafiline analüüs	16
3.2.1 Näiline Michaelis-Menteni konstant ADP suhtes.....	16
3.2.2 Glükoosi efekt – heksokinaaside aktiivsus	17
3.3 Geeniekspressiooni mõõtmine	17
3.3.1 RNA eraldus.....	17
3.3.2 cDNA süntees	17
3.3.3 Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon.....	17
3.4 Andmete analüüs	18
4. Tulemused ja arutelu.....	19
4.1 Näiline Michaelis-Menteni konstant ADP suhtes.....	19
4.2 Glükoosi efekt.....	20
4.3 Glükoosi metabolismis osalevate geenide ekspressioonitasemed	20
4.4 Mitokondriaalses hingamises osalevate geenide ekspressioonitasemed.....	23
4.5 Energiatransporditeededes osalevate geenide ekspressioonitasemed.....	24
Kokkuvõte.....	26
Abstract	27
Tänuavaldused	28
Kasutatud kirjandus.....	29

Lühendid

ADP – adenosiindifosfaat
AK – adenülaatkinaas
AMP – adenosiinmonofosfaat
AMPK – AMP-aktiveeritud proteiinkinaas
ANT – adeniinnukleotiidtranslokaas
AP5A – diadenosiin-pentafosfaat
ATP – adenosiin trifosfaat
CII – mitokondriaalse hingamisahela kompleks II
CK – kreatiinkinaas
CK-BB – ajutüüpi kreatiinkinaas
CK-MT – mitokondriaalne kreatiinkinaas
CRC – kolorektaalvähk
CoQ – koensüüm Q
Cyt-c – tsütokroom c
ETA – elektrontranspordiahel
FADH – redutseeritud flaviin adeniin dinukleotiid
GLUT – glükoosi transporter
G3P - glütseraldehyd 3-fosfaat
HIF1 α – hüpopsiaga indutseeritav faktor 1- α
HK - heksokinaas
LDHA – lakaadi dehüdrogenaas
MCT – monokarboksülaadi transporter
MIM – mitokondri sisemembraan
MOM – mitokondri välismembraan
mtDNA – mitokondriaalne DNA
NADH – redutseeritud nikotiinamiid adeniin dinukleotiid
OXPHOS – oksüdatiivne fosforülimine
PNC – perinukleaarne ruum
TCA – tsitraaditsükkel
VDAC – pingest sõltuv anioonkanal
qRT-PCR – reaalaja kvantitatiivne pöörđtranskriptsiooni polümeraasi ahdreaktsioon

Sissejuhatus

Kolorektaalvähk ehk inimese jäme- ja käärsoolevähk on maailmas kolmandal kohal pahaloomuliste kasvajate hulgas, mistöttu on oluline leida uusi ravimeetodeid. Vähkkasvajates on häritud regulatoorsed rajad, mis vastutavad normaalse proliferatsiooni eest. Piiramatuks rakujagunemiseks vajab muude omaduste muutmise körval kasvajarakk ka rakuenergeetika reprogrammeerimist, et muuta energia tootmine rakuks efektiivsemaks. Vähkkasvajatel on täheldatud erineaid metaboolseid fenotüüpe, kuid enim levinud on glükolüüsi domineerimine tavapärase oksüdatiivse fosforüülimise asemel.

Kolorektaalvähi arengu esimene etapp on tavaliselt premaliigsed soole limaskesta väljasopistused ehk neoplastilised polüübidi. Pahaloomuliseks muutumisel mängivad põhilist rolli raku bioenergeetika ja mitokondriaalse DNA mutatsioonid. Oluline on välja selgitada kolorektaalvähi ja premaliigsete polüüpide energiametabolism, et mõista tervet vähiarengu protsessi ja leida sobiv sihtmärk ravimitele. Sellel põhjusel oli antud töö eesmärgiks kirjeldada soolepolüüpidele ja kolorektaalvähile omast energiametabolismi iseloomustades ja võrreldes eksperimentaalselt jälgitud mitokondriaalset hingamist kliinilises materjalis.

Töö teoreetilises osas keskendutakse energia tootmisele rakuks. Seejuures kirjeldatakse mitokondriaalset hingamist ja selles toimuvaid muutuseid vähirakkudes. Lisaks tuuakse välja mitokondri roll tumorigeneesis ja metaboolses reprogrammeerimises, pannes rõhku Warburgi efekti mehhanismile ja heksokinaaside rollile selles. Samuti pöörati tähelepanu energiatranspordi radadele ja nende osalusele metaboolsetes muutustes. Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse energia tootmist inimese soolevähis, polüübisis ja terves soolekoes. See algab kliinilise materjali oksügraafilise analüüsiga, mille põhjal arvutati Michaelis-Menteni konstant ADP suhtes ja maksimaalne ADP poolt aktiveeritud hingamine. Järgmiseks määratati energia toomisel ja energiatranspordis osalevate 18 geenide ekspressioonitasemed kliinilises materjalis reaalaja kvantitatiivse pöördtranskriptsiooni PCR meetodil.

Antud töö tulemustest selgus, et soolepolüüpides on glükolüüsi aktiivsus kõrgem kui terves soolekoes ja kasvajas. Seda näitasid nii oksügraafilise analüüsiga käigus mõõdetud parameetrid kui ka glükoosi kasutamises osalevate geenide ekspressioonitasemete tõus. Vastupidiselt kirjanduses varasemalt välja toodud tulemustele ei saanud kinnitust soolevähile omandatud glükolüütiline fenotüüp, vaid antud töö tulemused näitasid märkimisväärset oksüdatiivse fosforüülimise rolli.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Vähkkasvaja tunnusmärgid

Vähkkasvajatele on iseloomulik, et rakkudes on häiritud regulatoorsed rajad, mis harilikult tagavad tervetes rakkudes normaalse proliferatsiooni ja homöostaasi. Inimorganismist on leitud rohkem kui 100 erinevat vähitüüpi, mille puhul rakutsükkel on kontrollimatu. Selleks, et leida ühiseid jooni erinevate vähkkasvajate puhul on Hanahan ja Weinberg pakkunud välja kümme vähi põhiomadust (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Nendeks on proliferatiivse signaliseerimise säilitamine, kasvusuppressorite vältimine, immuunlagundamise vältimine, replikatiivse surematuse võimaldamine, tuumori teket soodustav põletik, invasiooni ja metastaseerumise aktiveerimine, angiogeneesi soodustamine, genoomi ebastabiilsus ja mutatsioonid, rakusurma vältimine ning rakuenergeetika reprogrammeerimine.

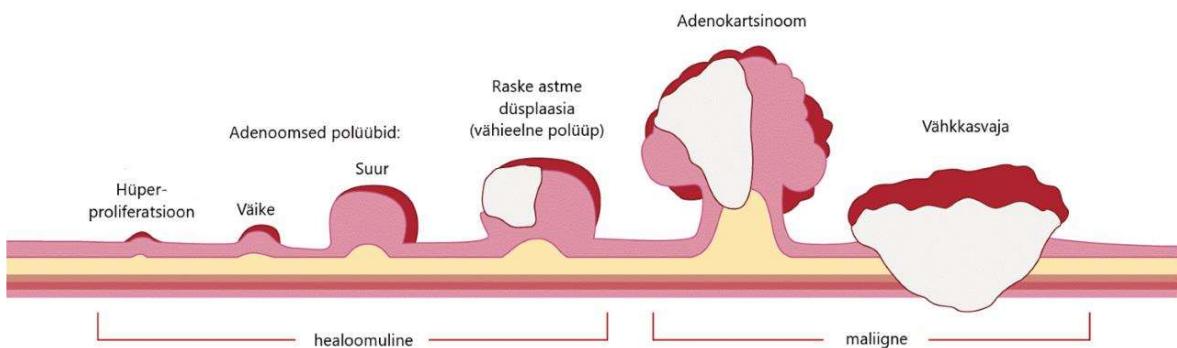
Antud töös keskendutakse rakuenergeetika reprogrammeerimisele, sest efektiivne energia tootmine ja kasutamine on oluline vähile iseloomuliku kontrollimatu jagunemise ja kiire kasvu toetamiseks. Vähkkasvajaid ei saa mõista ainult põhiomaduste järgi, vaid arvesse tuleb võtta ka kasvaja mikrokeskkonna panust kasvaja tekkesse ja arengusse, sest metaboolsetes radades osalevad metaboliidid asuvad kasvaja ümbruses (Hanahan & Weinberg, 2011; Herst, Grasso, & Berridge, 2018).

1.1.1 Kolorektaalvähk ja soolepolüübidi

Kolarektaalvähk (CRC) on maailmas kolmandal kohal pahaloomuliste kasvajate hulgas ja prognooside kohaselt suureneb selle osakaal veelgi (La Vecchia & Sebastián, 2020). CRC on kompleksaigus, millel on geneetilised, keskkondlikud ja elustiili riskifaktorid (Brenner, Kloor, & Pox, 2014). Enamik juhtumitest on juhuslikud ja arennevad aeglaselt. Raviks kasutatakse operatsiooni ning neoadjuvantset kiiritusravi, mida teostatakse enne kirurgilist ravi, ja adjuvantset keemiaravi, mida kasutatakse pärast kirurgilist ravi. Kaugele arenenud CRC ravi on keeruline ja lõpuks areneb välja resistentsus erinevate ravivormide suhtes, mistõttu tekivad metastaasid muudes organites (Brenner et al., 2014; Jing et al., 2019; La Vecchia & Sebastián, 2020). Aina enam lisandub uuringuid, mille järgi uus efektiivne ravivõimalus võiks olla rakumetabolismi mõjutamine (La Vecchia & Sebastián, 2020).

CRC areng algab enamasti soole limaskesta väljasopistustest ehk polüüpidest (joonis 1). Need jagunevad neoplastilisteks ja mitte-neoplastilisteks, mis omakorda võivad olla hüperplastilised, hamartomatoosid ja põletikulised. Risk, et polüübist areneb kasvaja, sõltub selle endoskoopilistest ja histoloogilistest omadustest. Pahaloomuliseks ehk maliigiseks võivad areneda vaid neoplastilised polüübidi. Vähi arenguni viivad kromosoomide ja mikrosatelliitide ebastabiilsused, mis aktiveerivad onkogeene või pärsvad tuumori supressorgeene (De Palma et al., 2019; Vogelstein et al., 1988). Polüübi üleminekul kasvajaks sisenevad polüübidi submukoosasse, mis annab võimaluse metastaseerumiseks. Enamus neoplastilisi polüüpe ei arene pahaloomuliseks, kuid suur osa CRC kasvajatest on arenenud neist (Shaukat et al., 2020; Shussman & Wexner, 2014). Kolonoskoopia käigus on keeruline eristada mitte-neoplastilisi polüüpe neoplastilistest, mis võivad areneda soolevähiks (Shussman & Wexner, 2014). Raku bioenergeetika ja mitokondriaalse DNA

(mtDNA) mutatsioonid on olulise tähtsusega neoplastilise polüübi muutumisel pahaloomuliseks. Näidatud on, et glükolüusi tase tõusis märkimisväärsest suurenenud adenokartsinoomides. Järeldatud on ka, et soolepolüüpide ja CRC bioenergeetilised profiilid on sarnased (Lin et al., 2019).



Joonis 1. Soolepolüüpide areng algab epiteliaalsete rakkude suurenenud proliferatsioonist. Adenoomsete polüüpide kasvamisel tekib viimaks rakkude düsplaasia, mis on vähieelse polüübi seisund. Maliigseks muutudes tekib adenokartsinoom, mis siseneb soole limakesta ja millest arenub edasi vähi siirdeid andev metastaseeruv vähkkasvaja (Elzagheid, Libya, & Al-Fituri, 2020).

1.2 Energia tootmine rakus

Glükoos on peamine energia- ja süsinikuallikas loomarakkudes (Bonora et al., 2012; Meyerhof, 1927). Energia tootmine algab raku tsütoplasmas glükolüüsiga, mille käigus glükoos muudetakse hapniku juuresolekul püruvaadiks ja selle olemasoluta laktaadiks. Glükolüüs on oluline vaheetapp aminohapete ja rasvade sünteesiks. Glükolüusi viivad läbi kümme ensüümi ja protsessi energi netosaagis on 2 ATP molekuli. Anaeroobsetes tingimustes redukteeritakse püruvaat laktaadiks NADH ja laktaadi dehydrogenaasi (LDHA) abil (Pavlova, Zhu, & Thompson, 2022). Sellist protsessi võib näha ka aeroobsetes tingimustes eukarüootide erütrotsüütides, millega puuduvad mitokondrid, ja vähirakkudes, kus seda protsessi kirjeldas esmalt Otto Warburg (Bonora et al., 2012; O Warburg, Wind, & Negelein, 1927).

1.2.1 Mitokonder ja raku hingamine

Mitokonder on kahe membraaniga rakuorganell, mille peamine ülesanne on toota adenosiintrifosfaati (ATP) tsitraaditsükli (TCA) ja oksüdatiivse fosforüülimise (OXPHOS) käigus (Bellance & Patrick Lestienne, 2009; Bonora et al., 2012; Burke, 2017; Siekzvit & Potter, 1955; van der Bliek, Sedensky, & Morgan, 2017). Mitokondri välismembraan (MOM) on läbilaskev ja selles koonduvad erinevad valgud, mis vastutavad mitokondri normaalse funktsioneerimise eest. MOM-i ülesanne on siduda mitokondrit teiste rakuorganellidega nagu endoplasmaatiline retiikulum, lüsosoovid, endosoovid ja raku membraan. Seevastu mitokondri sisemembraan (MIM) ümbritseb mitokondri maatriksit moodustades kristasid. Need tagavad suurema pinna hingamisahela kompleksidele, et võimaldada piisav energia tootmine rakuks (Giacomello, Pyakurel, Glytsou, & Scorrano, 2020; Herst et al., 2018). Eukarüootses rakuks on raku hingamise teoreetiline saagis ühe glükoosimolekuli kohta 36 ATP-d (Bonora et al., 2012).

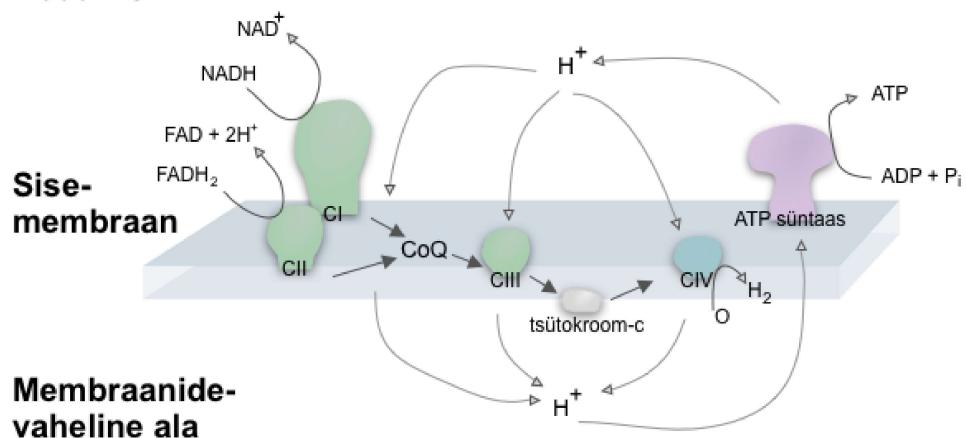
Mitokondrid on olulised ka muudes elutähtsates raku protsessides nagu biosünteesi eellasmolekulide ja reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) tootmine, raku proliferatsiooni ja

signaalülekande regulatsioon, apoptoosi inducerimine ja tsütosoolse Ca^{2+} tasakaalu hoidmine (Simula, Nazio, & Campello, 2017; Wallace, 2012). Muutused mitokondris võivad mõjutada eelmainitud rakuprotsesse ning transkriptsionifaktoreid ja kromatiini struktuuri muutes raku mitteaktiivselt ja diferentseerunud olekust aktiivselt proliferatiivseks (Wallace, 2012).

Tsitraaditsükkel (TCA), mida tuntakse ka Krebsi tsüklina, toimub mitokondri maatriksis. Püruvaadist toodetakse atsetülkkoensüm A, mis TCA-s oksüdeeritakse ning tekivad ka molekulid NADH ja FADH. Need on elektronkandjad, mis alustavad OXPHOS-i (van der Bliek et al., 2017). Algava OXPHOS-i käigus muudetakse keemiline energia elektrokeemiliseks gradiendiks MIM-is asuvate elektrontranspordiahela (ETA) komplekside kaudu. OXPHOS-i substraadid ja produktid transporditakse läbi MOM-i pingest sõltuva anioonkanali (VDAC) kaudu (Wallace, 2012). Protsessi käigus kasutatakse hapnikku, mis on elektronide vastuvõtjaks, et moodustada vesi (H_2O). Hapniku tarbimist saab mõõta, et hinnata mitokondri funksiooni (Burke, 2017; van der Bliek et al., 2017).

ETA kompleks on neli (CI-CIV) (joonis 2). CI on NADH-CoQ oksüdoreduktas, mis kannab elektronid NADH-It koensüm Q-le (CoQ). CII oluline roll on siduda TCA-d ja elektrontransporti läbi suksinaadi dehydrogeenimise. CoQ ja tsütokroom c (Cyt-c) on mobiilsed elektronkandjad komplekside vahel. CoQ viib elektronid CI ja CI-It CIII-le. Cyt-c kannab elektronid CIII-It edasi CIV-le. CIII on nende kahe mobiilse elektronkandja oksüdoreduktas. CIV ehk Cyt-c oksüdaas lõpetab elektronülekande ETA-s tootes hapnikust vett. ATP süntaab, teise nimega ka kompleks V, kasutab elektrokeemilises gradiendis salvestatud energiat, et toota adenosiindifosfaatist (ADP) ATP-d (Burke, 2017; van der Bliek et al., 2017).

Maatriks



Joonis 2. Mitokondri sisemembraanil paiknevad OXPHOS-i komponendid, mille ülesanne on toota ADP-st ATP-d. CI toodab NADH-ist NAD^+ ja CII FADH₂-st FAD. CI, CIII ja CIV on kujutatud eraldiseisvatena, kuid tavaliselt esinevad need respiratoorse komponendina toimiva superkompleksina. Välja on toodud ka vesiniku liikumine komplekside vahel (van der Bliek et al., 2017).

1.2.2 Mitokondri roll tumorigeneesis

Mitokondril on keskne roll metaboolse plastilisuse dünaamikas, mis on esmavajalik tuumori tekkes, invasioonis ja metastaseerumises (Herst et al., 2018). Olulisel kohal tumorigeneesis on aeroobne glükolüüs, ROS kogunemine, antiapoptootilised signaalid ja hüpoksia. Muutused mitokondri pärilikkusaines reguleerivad metabolismis oluliste ensüümide hulka ja aktiivsust. Transkriptsionifaktorid, mille aktiveerimine või inhibeerimine tuleb tuumorile kasuks, on näiteks hüpoksiaga indutseeritav faktor 1- α (HIF1 α), aktivaatorvalk 1 ja tuumafaktoriga erütroid 2 seotud faktor 2 (Badrinath & Yoo, 2018).

Paljud anaboolsed rajad asuvad just mitokondri maatriksis (Herst et al., 2018). Suurem osa uuringuid on tehtud *in vitro*, et leida CRC rakkudele omaseid metaboolseid radu, kuid värskemad uuringud näitavad, et *in vivo* võib mikrokeskkond mõjutada metaboolset fenotüüpi (La Vecchia & Sebastián, 2020; Muir, Danai, & Vander Heiden, 2018). Rakud, milles on anabolism keskel kohal, transpordivad TCA tsüklis toodetud tsitraadi mitokondrist välja, et sünteesida rasvhappeid ja kolesteroli tsütosoolis, mis on vajalikud rakumembraani ehituseks (Pavlova et al., 2022). Aminohappeid kasutatakse nukleotiidide lämmastikaluste puriini ja pürimidiiini sünteesimiseks (Vyas, Zaganjor, & Haigis, 2016). Mitokondri välimuse põhjal saab eeldada, missugust rakuhiingamist eelistatakse. Õhemad ja väljavenitatud mitokondrid on seotud suurenenud OXPHOS-i aktiivsusega ja laienenud kristade struktuurid eelistavad glükolüusi (Simula et al., 2017). Muutused mitokondrite massis võivad viidata biosünteesi ja mitofaagia ebanormaalsele funktsoonile (Vyas et al., 2016).

ETA kompleksid on olulised tuumori kasvus ja metastaseerumises (Tan, Baty, & Berridge, 2014). Katsed melanoomi ja rinnavähi rakuliinidega on näidanud tuumori aeglast kasvu, kui vähirakkudes puudub mtDNA (Tan et al., 2015). Mõned mutatsioonid mtDNA-s põhjustavad ETA inhibeerimist, mis soodustab CRC tekkimist ROS-söltuvalt (Bellance & Patrick Lestienne, 2009; Kaori et al., 2008). Küll aga on näidatud, et CII on funktsionaalselt aktiivne CRC puhul (Kaldma et al., 2014). Hingamisahela kompleksi CI ebanormaalne funktsioon panustab mitmesuguste vähkkasvajate, nt kopsuvähk, pankreasevähk, rinnavähk (Iommarini, Calvaruso, Kurelac, Gasparre, & Porcelli, 2013), ja neuroloogiliste haiguste, nt Parkinsoni töve, tekkesse (Bellance & Patrick Lestienne, 2009; Vogel, Nijtmans, Ugalde, van den Heuvel, & Smeitink, 2004). CI ja CIII ülekspresseerumine võib viia tuumori metastaseerumiseni (Frank et al., 2010), mille inhibeerimist on näidatud metformiiniga. Samuti on leitud köige rohkem mutatsioone CI geneetilises materjalis kilpnäärmekasvaja rakuliinide puhul (Yeh et al., 2000). CII allareguleerimisega kaasneb suksinaadi taseme tõus, mis stabiliseerib HIF1 α -d ja soodustab ümberlülitust glükolüüsile (Badrinath & Yoo, 2018; Kluckova, Bezawork-Geleta, Rohlena, Dong, & Neuzil, 2013; Wallace, 2012). CIV mutatsioonid on seotud näiteks epitelialse munasarjavähiga (Permuth-Wey et al., 2011).

1.3 Metaboolne reprogrammeerimine

Nii normaalsed kui ka kasvajarakud reguleerivad oma metabolismi vastavalt diferentseeritusele ja funktsionaalsele staatusele ning mikrokeskkonna muutustele (Herst et al., 2018). Aeroobsetes tingimustes muudavad normaalsed rakud tsütosoolis glükoosi püruvaadiks glükolüusi teel ja seejärel püruvaadi mitokondrites süsinikdioksiidiks (CO_2). Anaeroobsetes tingimustes eelistab rakk glükolüusi ja mitokondritesse saadetakse vähe püruvaati. Otto Warburg tähdas esmalt, et

vähirakkudes toimub metaboolne reprogrammeerimine, kus isegi hapniku olemasolul rakk eelistab glükolüusi. Seda seisundit nimetatakse aeroobseks glükolüüsiks ehk Warburgi efektiks (Hanahan & Weinberg, 2011; O Warburg et al., 1927). Üks olulisi aspekte metabolismis on glükolüütile ja mitokondriaalse energia tootmise tasakaal, millele avaldavad surveid ka stressorid keskkonnast. Peamine neist, mis viib rakud glükolüütile teele, on hüpoksia (Herst et al., 2018; Jing et al., 2019).

Herst koos kolleegidega pakub välja, et metaboolne muutus võib oleneda kasvajakoe seisundist. Aeglaselt kasvav primaarne tuumor eelistab OXPHOS-i ja invasiivses olekus vahetab selle glükolüusi vastu välja. Metastaatiline kasvaja eelistab hiljem jälle OXPHOS-i (Herst et al., 2018). Küll aga pole võimalik öelda, kas on olemas kindel metaboolne fenotüüp, mis tagaks eduka metastaseerumise (Bellance & Patrick Lestienne, 2009; Danhier et al., 2017).

1.3.1 Warburgi efekt

Otto Warburg pakkus esimest korda 1920. aastatel välja, et vähkkasvaja tekke põhjustaja võib olla mitokondriaalse raku hingamise vähinemine ja glükolüütile ümberlülitus. Warburgi efekti kohaselt ei liigu püruvaat edasi Krebsi tsüklisse ja glükolüusi osakaal suureneb ka hapniku juuresolekul (O Warburg et al., 1927; Otto Warburg, 1956). Katsetes hiire kasvajarakkudega näitas Warburg koos kolleegidega, et kasvajarakud saavad aeroobsest glükolüüsist ligikaudu sama palju energiat kui OXPHOS-ist. Hiljem on näidatud, et kasvajarakkude mitokondrites on mitmesuguseid muutuseid, mis hõlmavad struktuuri, funktsiooni ja aktiivsust. Need muutused võivad viia pöördumatu raku hingamise kahjustuseni, kus vähirakud ei muudu kunagi tagasi normaalselt funktsioneerivateks rakkudeks (Pedersen, 2007; Otto Warburg, 1956).

Kasvajarakk võib eelistada glükolüusi OXPHOS-ile, sest glükolüüs annab süsinikuallika anaboolsete reaktsioonide jaoks. Laktaat, mis on glükolüütile körvalprodukt, korjatakse üles stroomarakkude poolt ja muudetakse püruvaadiks (Koukourakis, Giatromanolaki, Harris, & Sivridis, 2006; Pedersen, 2007). Mitokondriaalsete funktsioonide inhibeerimine viib püruvaadi akumuleerimisele tsütosooli, kus see muudetakse laktaadiks (Wallace, 2012). Happelise laktaadi abil suudavad kasvajarakud vastu panna organismi immuunsüsteemi rünnakutele. Laktaadi transportimisega rakust välja kaasneb ka NAD⁺ tootmine, et tagada glükolüüs. Laktaadi poolt põhjustatud madal pH kasvajaraku keskkonnas on negatiivse mõjuga normaalsele ümbritsevatele rakkudele ja soodustab kasvaja invasiooni (Payen, Porporato, Baselet, & Sonveaux, 2016). Samuti aitab Warburgi efekt kasvajarakkudel kauem vastu pidada, kui peaks tekkima hapnikupuuudus (Mathupala, Ko, & Pedersen, 2009; Pedersen, 2007). Glükolüütised kasvajarakud võivad hüpoksia korral teha koostööd OXPHOS-i kasutavate kasvajarakkudega, et vahetada laktaati glükoosi vastu (Payen, Mina, Van Hée, Porporato, & Sonveaux, 2020; Sonveaux et al., 2008). Rakuväline laktaat võib pakkuda ka süsinikuallikat, kui kasvaja keskkond on glükoosivaene (Pavlova et al., 2022).

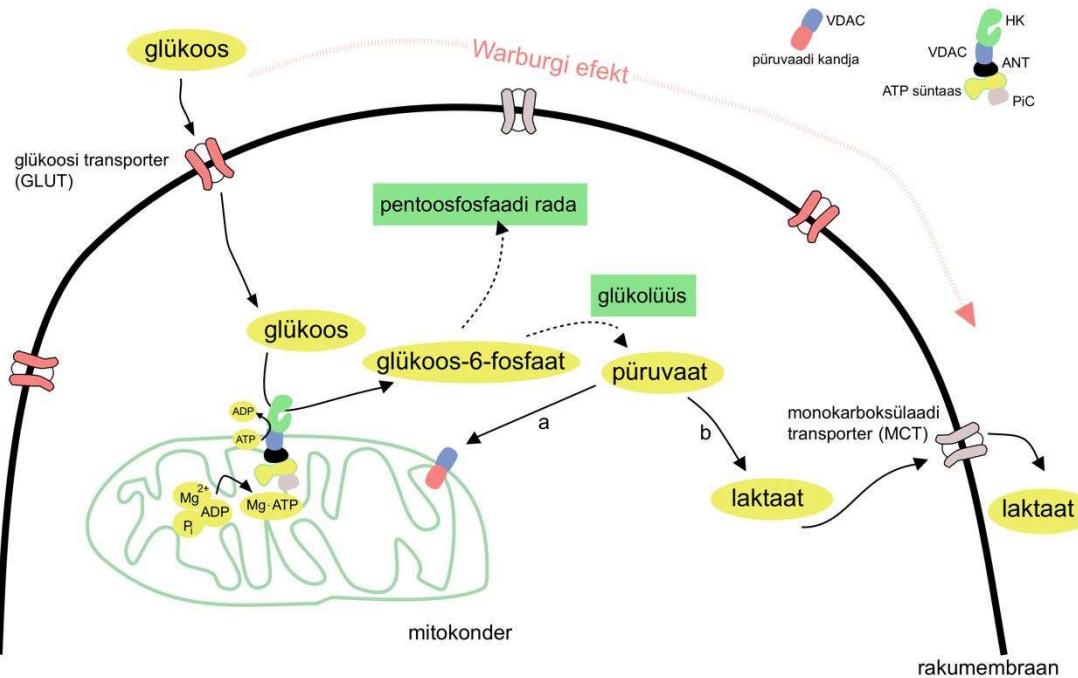
Kui glükolüusi osakaal rakuks tõuseb, siis peab suurenema ka glükoosi transport raku, mis toimub läbi glükoosi transporterite (GLUT) (Pavlova et al., 2022). Antud töös keskendutakse GLUT isovormidele 1 ja 5, mis kuuluvad glükoosi transporterite teise klassi. GLUT5 nimetatakse fruktoosi transporteriks, sest sellel on körgem afiinsus fruktoosile kui glükoosile (Holman, 2020). Suurenenud GLUT ekspressioonitasemed on seotud tuumorite kasvuga ning viitab vähi glükolüütile ja Warburgi efektile (Ganapathy-Kanniappan & Geschwind, 2013; Holman, 2020).

Glükolüütile aktiivsuse tõus viib ka suurenenud laktaadi välja viimiseni rakust, mis toimub läbi monokarboksülaadi transporterite (MCT) ja lisaprootoni abil (Halestrap, 2012; Pavlova et al., 2022). Terved soolerakud saavad 60-70% energiast rasvhäpetest, täpselt butüraadist, mille transpordiks rakku sisse on samuti olulised MCT-d (Lambert, Wood, Ellis, & Shirazi-Beechey, 2002). Uuringud vähiproovidega on näidanud MCT 1, 2 ja 4 isovormide ülesreguleerimist. Peamiselt stimuleerib ülesreguleerimist hüpoksia aktiveerides HIF1 α transkriptsioonifaktori aktiveerimises (Payen et al., 2020). Kõrged MCT ekspressioonitasemed on seotud tuumori invasiooni ja metastaseerumisega CRC-s (Ganapathy-Kanniappan & Geschwind, 2013; Nakayama et al., 2012; Pinheiro et al., 2008).

Adenosiinmonofosfaadiga aktiveeritud proteiinikinaas (AMPK) indutseerib glükolüusi energiapuuduse korral surudes maha ATP-d tarbivad signaalrajad (Hardie, 2011). AMPK on tuumorsuppressor signaalradades, mis osalevad raku kasvus ja proliferatsioonis (Hardie & Carling, 1997). Samas on leitud, et see võib olla ka tuumorit soodustav (Jones et al., 2005), kuid mehhanismid, mis on seotud metaboolse stressiga vähirakkudes, on seni lõpuni teadmata. Raku metabolismi seisukohalt arvatakse, et AMPK reguleerib metabolismiga seotud geenide ekspressiooni (Hardie, 2011). On leitud, et AMPK suurendab mitokondri biogeneesi (Bergeron et al., 2001) roti skeletilihastes. Vähirakkudele on AMPK kasulik, sest see hoiab raku metabolismi homöostaasi glükoosi puuduse korral muude biomolekulide abil nagu glutamiin, laktaat ja rasvhapped (Chabe et al., 2015).

1.3.2 Heksokinaaside seos Warburgi efektiga

Heksokinaaside (HK) ülesanne on katalüüsida reaktsiooni, mille käigus muudetakse glükoos ATP fosfaatgruppi abil glükoos-6-fosfaadiks (joonis 3). Imetajate rakkudes on neli HK isovormi, millega HK1 ja HK2 asuvad peamiselt MOM-is, HK3 perinukleaarses ruumis (PNC) ja HK4 raku tsütosoolis (Mathupala et al., 2009). Pedersen koos kolleegidega pakkus 2007. aastal välja mudeli, mille järgi Warburgi efekti soodustab üleekspressoeritud HK2 seondudes pingest sõltuva anioonkanaliga (VDAC) ja põhjustades seläbi konformatsioonimuutuseid (Pedersen, 2007). Tavaliselt ekspressoeritakse HK2 geenil normaalsetes rakkudes vähe (Mathupala et al., 2009).



Joonis 3. Glükoosi metabolism glükolüütisest kasvajarakus. Glükoosi transporterid (GLUT) viivad glükoosi läbi plasmamembraani raku sisse, kus see fosforüülitakse HK2 poolt, mis on MOM-il VDAC-iga seotud. Selle tulemusel saadakse glükoos-6-fosfaat, mis võib siseneda kahele metaboolsele rajale. Üks variant on pentoosfosfaadi rada, mille tulemusena sünteesitakse nukleinhapete eellasmolekulid. Teine variant on selle muutmine püruvadiks, mis (a) siseneb mitokondrisse või (b) muudetakse laktaadiks ja transporditakse monokarboksülaadi transporterite (MCT) poolt rakust välja (Mathupala et al., 2009).

Põhjused, miks kasvajad võivad eelistada HK2 isovormi, on parem substraadi afiinsus ja katalüütiline aktiivsus ning hüdrofoobne domeen, mis on seotud VDAC-iga. HK2 on seotud MOM-il tavaliselt VDAC1 isovormiga (Reinsalu et al., 2021), mis aitab vältida HK2 inhibeerimist selle ensüümi reaktsiooniprodukti glükoos-6-fosfaadi poolt (Pedersen, 2007). VDAC1 on mitokondriaalne valk, mis reguleerib rakutsüklit ja kontrollib ioonide, metaboliitide, nukleotiidide, Ca^{2+} liikumist mitokondrisse ja välja (Shoshan-Barmatz, Ben-Hail, Admoni, Krelin, & Tripathi, 2015). VDAC1 seotus HK1 ja HK2-ga annab ka muid eeliseid nagu kõrgem MOM-i läbilaskvus adeniini nukleotiididele, suurenendatud aeroobne glükolüüs, parem resistentsus apoptoosile ja kaitse oksüdatiivse stressi eest. VDAC-i ja HK seostumist on tagasi pööratud HK2 inhibiitoritega nagu 3-bromopüruvat, mida on katsetatud ka vähevastase ravimina (Mazure, 2017; Reinsalu et al., 2021; Shoshan-Barmatz et al., 2015).

1.4 Energiatranspordi radade osalus metaboolsetes muutustes

Raku tsütosoolis ja mitokondrites toimub energia ülekanne fosfaatgruppide abil, mida katalüüsivad kreatiinkinaasid (CK) ja adenülaatkinaasid (AK). Kasvajarakkude suure energianöndluse tõttu on kannatav oluline roll raku metaboolsetes muutustes. Varasemad uuringud CRC puhul on näidanud allareguleeritud CK isovorme ja AK isovormid on vastupidi ülesreguleeritud (Chekulayev et al., 2015; Kaldma et al., 2014). Soolevähirakud suudavad CK signaalrajad vahetada AK omade vastu, et tagada

metaboolne plastilisus, mille regulatsioon võib olla seotud VDAC-i läbilaskvusega (Reinsalu et al., 2021). Kui AK on allareguleeritud, siis CK-d suudavad kompenseerida nende tööd (Yan, 2016).

1.4.1 Kreatiinkinaasid

Kreatiinkinaaside (CK) ülesanne on tagada ATP homöostaas rakkudes, kus ATP muudetakse fosfokreatiiniks keemilise energia hoiustamiseks (Loo et al., 2015). Tsütosoolsed CK-d muudavad fosfokreatiini jälle ATP-ks energiat tarbivates kohtades. Inimesel on leitud neli CK isovormi, millega siin keskendutakse ajutüipi kreatiinkinaasile (CK-BB) ja mitokondriaalsetele kreatiinkinaasidele (CK-MT) 1 ja 2 (Yan, 2016). CK lihtsustab tuumoris rakujagunemist ja inhibeeriib apoptoosi. Kasvajarakud indutseerivad CK-BB sekretsiooni, et tulla toime metaboolse stressiga (La Vecchia & Sebastián, 2020). Häired CK-BB aktiivsuses vähendavad glükolüusi aktiivsust ja suurendavad OXPHOS-i osakaalu (Yan, 2016). CRC puhul viib CK-MT allareguleerimine selleni, et fosfokreatiini ei saa toota ja kaob VDAC-mtCK-ANT kompleksi vaheline funktsionaalsus. Selle tulemusena tekib VDAC-HK-ANT kompleks (Reinsalu et al., 2021).

1.4.2 Adenülaatkinaasid

Adenülaatkinaasid (AK) on olulised rakusiseses metaboolses signaliseerimises (Dzeja & Terzic, 2009; Klepinin et al., 2020) ja regulatsioonis (Fujisawa et al., 2016). Katalüütilise reaktsiooni käigus, kus 2 ADP molekuli muudetakse AMP ja ATP molekulideks, suudab AK märgata väikest muutust ATP/ADP suhtes AMP kontsentratsiooni abil. Seejärel AK aktiveerib AMP-aktiveeritud proteiinkinaasi (AMPK), mis viib ATP tootmiseni. Samaaegselt lülitatakse välja biosünteesirajad (D Grahame Hardie, Ross, & Hawley, 2012). Praegu on leitud AK üheksa isovormi (AK1-AK9), millega antud töös keskendutakse AK1, AK2, AK4 ja AK6-le. AK1 on peamine isovorm tsütosoolis ja on ekspresseerunud suure energiavajadusega kudedes. AK2 asub MIM-is ja kristadevahelises alas, AK4 mitokondri maatriksis ning AK6 rakutuumas. Ainult AK1 ja AK6 ekspresseeruvad teatavasti kõikides kudedes (Klepinin et al., 2020; Panayiotou, Solaroli, & Karlsson, 2014). AK1 madalat ekspressiooni on tähdeldatud akuutses müeloidses leukeemias, kus see reguleerib glükoosi transporti rakkku (Zhang et al., 2020). Kõrget ekspressiooni aga Parkinsoni töve ja kopsu adenokartsinoomi puhul (Jan, Lai, Yang, Huang, & Hsiao, 2019). AK2 funktsiooni langus soodustab rakkude proliferatsiooni rinnavähi rakuliinides MCF-7 ja C33A (H. Kim et al., 2014). Lisaks on AK2 agressiivne onkogeen kopsu adenokartsinoomis (Liu et al., 2019). AK4 ekspressiooni indutseerib hüpoksia. HeLa rakuliiniga tehtud katsetes leiti, et AK4 moodustab komplekse ANT, HK-2 ja VDAC-iga efektiivsemaks ADP kasutuseks. See kompleks omakorda soodustab kõrget glükolüütelist aktiivsust kasvajarakus (Fujisawa et al., 2016). AK6 kõrge ekspressioon osaleb Warburgi efekti tekkes rinnavähi, CRC ja osteosarkoomi puhul (Bai et al., 2016; Xu, Yang, & Zheng, 2021). Madal ekspressioon seevastu mõjutab DNA parandamist akuutses müeloidses leukeemias (Xu et al., 2019). Erinevate AK isovormide käitumine CRC puhul vajab täiendavaid uuringuid (Reinsalu et al., 2021).

2. Töö eesmärgid

Kolorektaalvähi arengu ja bioenergeetilise profiili mõistmiseks on oluline mõista ka vähieelse etapi omadusi. Tänaseks on premaliigsete soolepolüüpide metaboolsete muutuste ja energia tootmisse regulatsiooni kohta vähe andmeid. Sellest tulenevalt on antud bakalaurusetöö eesmärkideks:

1. iseloomustada mitokondriaalse hapniku tarbimise aktiivsust premaliigsetes soolepolüüpides ja soolevähi kasvajakoes ning võrrelda seda terve soolekoega;
2. leida korrelatsioon glükoosi metabolismis ja OXPHOS-is osalevate geenide ekspressiooni ja soolevähis esinevate funktsionaalsete metaboolsete muutuste vahel võrreldes tervet soolekude, kasvajakude ja soolepolüüpe;
3. kirjeldada mitokondriaalsete kinaaside geeniekspresiooni seostades neid energiatranspordiradade ümberkorraldustega soolevähis ning võrrelda ekspressioonitasemeid terves soolekoes, kasvajakoes ja soolepolüüpides.

3. Materjalid ja meetodid

3.1 Kliiniline materjal

Antud uurimuses teostatud katsed on kooskõlas Tallinna Meditsiiniuuringute Eetikakomitee otsustega nr 2182 ja 2183. Katsetes kasutati inimese soolepolüübi ($n=13$) ja kolorektaalvähi (CRC) ($n=20$) proove. Soolepolüübide eemaldati patsientidelt Lääne-Tallinna Keskhaigla endoskoopia osakonnas kolonoskoopia teel ja CRC proovid saadi Põhja-Eesti Regionaalhaigla onkoloogia- ja hematoloogiakliinikust. Paralleelselt kasvaja proovidega (T) koguti samadelt patsientidelt ka kontrollkoe (C) proovid. Vähi patsiendid ei olnud eelnevalt saanud keemia- ega kiiritusravi. Proovide transportimiseks kasutati Mitomedium B lahust (0,5 mM EGTA, 3 mM K-Laktobionaat, 3 mM KH_2PO_4 , 20 mM tauriin, 20 mM HEPES, 110 mM sahharoos; pH 7,1) (Kaambre et al., 2012), kuhu oli lisatud BSA (5 mg/ml), DTT (0,5 μM) ja leupeptiin (5 μM). Hilisemaks geeniekspresiooni analüüsiks transporditi paralleelselt proovid ka RNA Lateris (Qiagen).

3.2 Oksügraafiline analüüs

CRC ja soolepolüüride mitokondriaalset rakuhiingamist mõõdeti Oroboros Oxygraph-2k analüsaatoritega (Oroboros Instruments, Austria). Oksügraafi kahes kambris on Clark tüüpi plaatinast elektroodid, millel on hapnikku läbilaskvad membraanid hapniku kontsentratsiooni mõõtmiseks (Wolfbeis, 2015). Analüüsiks ettevalmistudes pandi esmalt materjal lahus A-sse (3 mM KH_2PO_4 , 20 mM tauriin, 5,7 mM ATP, 15 mM PCr, 9,5 nN $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 49 mM MES, 7,23 mM K_2EGTA , 2,77 mM K_2CaEGTA ; pH 7,1), mille temperatuur oli 4 °C. Kliiniliselt materjalilt eemaldati rasvkude ja veresooned ning valmistati õhukesed 5-15 mg koefiibrid. Rakkude permeabiliseerimiseks kasutati saponiini (5 mg/ml) lahuses A, mis jätab puutumata intratsellulaarsed organellid nagu mitokondrid, kuid lõhub rakumembraani (Kuznetsov et al., 2008). Fiibreid inkubeeriti kerge segamisega 4 °C juures 30 minuti väitel. Saadud saponiiniga töödeldud proove pesti kolm korda Mitomedium B lahuses, milles oli lisaks DTT (0,5 μM) ja BSA (5 mg/ml). Seejärel olid proovid oksügraafiliseks analüüsiks valmis ning jäid ootale kolmandasse pesulahusesse.

3.2.1 Näiline Michaelis-Menteni konstant ADP suhtes

Mitokondriaalset rakuhiingamist aktiveeriti lisades oksügraafi kambritesse glutamaati (5 mM) ja malaati (2 mM), mis aktiveerivad ETA kompleksi CI (Nelson & Cox, 2012). Seejärel lisati CII aktiveerimiseks suksinaati (10 mM) (Hatefi, 1985). Näiline Michaelis-Menteni konstant (K_m) on näiline, sest ADP kontsentratsioon mitokondri membraanidevahelises alas ei ole määratud (Anflous, Armstrong, & Craigen, 2001). K_m_{ADP} leiti ADP suhtes arvutuslikul teel lisades mõõtelahusele kasvavas kontsentratsioonis ADP-d. Lisatud ADP kontsentratsioon jäi vahemikku 25 μM – 1 mM kuni mitokondriaalse hapnikutarbimise kiirus oli maksimaalne. Täiendavalt kontrolliti MOM terviklikkust ja rakkude permeabiliseerimist Cyt-c lisamisel (8 μM).

3.2.2 Glükoosi efekt – heksokinaaside aktiivsus

Heksokinaaside aktiivsust proovides hinnati ADP ja glükoosi juuresolekul. Hingamine aktiveeriti glutamaadi (5 mM) ja malaadiga (2 mM) (Nelson & Cox, 2012) ning ATP-ga (0,2 mM). Seejärel lisati glükoosi (10mM), mis on eriti oluline energiaallikas just Warburgi efektiga vähirakkudes (O Warburg et al., 1927). Viimasena lisati ADP (2 mM), et aktiveerida maksimaalselt mitokondriaalne hingamine energia tootmiseks. Glükoosi efekt leiti arvutuslikul teel valemiga $glc\text{ efekt} = \frac{V_{glc}-V_{ATP}}{V_{ADP}-V_{ATP}} \cdot 100\%$ (Chekulayev et al., 2015), mis näitab, kui suure osa moodustab glükolüüsiga aktiveeritud hingamine kogu raku hingamisest.

3.3 Geeniekspresiooni mõõtmine

3.3.1 RNA eraldus

Soolepolüübi ja CRC proovidest eraldati RNA Untergasseri protokolli (Untergasser, 2008) järgi. Kliiniline materjal homogeniseeriti Trizoli reagendiga (Invitrogen) ja RNA eralduseks kasutati RNeasy Mini Kit-i (Qiagen). Dnaas I lahusega (Qiagen) eemaldati proovidest genoomne DNA ja RNA elueeriti kolonnist Rnaasi vaba veega (Qiagen). Saadud RNA kontsentraatsioon mõõdeti BioSpec-Nano spektrofotomeetriga (Shimadzu). Proovid asetati säilitamiseks -80 °C juurde.

3.3.2 cDNA süntees

Eraldatud RNA-d kasutati komplementaarse DNA (cDNA) sünteesiks, mille jaoks kasutati High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Rnaasi inhibiitoriga (Applied Biosynthesis) ja nendepoolset protokolli. Pöördtranskriptsiooni reaktsioonisegusse lisati peale RNA 10x RT puhvrit, 25x desoksünukleotiidide (dnTP) segu, 10x RT praimereid, MultiScribe™ pöördtranskriptaasi, Rnaasi inhibiitorit ja puast vett (MQ). Reaktsiooni läbiviimiseks kasutati Eppendorf 5332 Mastercycler termotsükliterit, kus alguses inkubeeriti lahust 25 °C juures 10 minutit. Seejärel toimus reaktsioon 37 °C juures 120 minutit, mida peatati pöördtranskriptaasiga 5 minutit 85 °C juures. Saadud cDNA lahjendati 30x MQ veega ja seda säilitati -20 °C juures.

3.3.3 Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon

Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (qRT-PCR) teostati mitokondriaalse raku hingamisega seotud geenide ekspressioonitasemete määramiseks soolepolüüpides ja CRC-s. Reaktsiooni läbiviimiseks kasutati LightCycler 480 II masinat (Roche) ja TaqMan Gene Expression Master Mix-i (Applied Biosystems). Samuti olid kasutuses FAM märkega TaqMan sondid (Applied Biosystems): *aktiin-β* (Hs01060665_g1), AK1 (Hs00176119_m1), AK2 (Hs01123132_g1), AK4 (Hs03405743_g1), AK6 (Hs00360444_g1), CK-BB (Hs00176483_m1), CK-MT1 (Hs00179727_m1), CK-MT2 (Hs00176502_m1), HK1 (Hs00175976_m1), HK2 (Hs00606086_m1), GLUT1 (Hs00892681_m1), GLUT5 (Hs01086390_m1), LDHA (Hs03405707_g1), MCT1 (Hs00161826_m1), MCT2 (Hs04332706_m1), MCT4 (Hs00358829_m1), NDUFA9 (Hs00159597_m1), SDHA (Hs07291717_mH) ja PRKAA1 (Hs01562315_m1). Valitud proovid pipeteeriti 384 kaevuga plaadile (Applied Biosystems). Negatiivse kontrollina kasutati cDNA asemel deioniseeritud vett ja tulemused normaliseeriti *aktiin-β* suhtes.

3.4 Andmete analüüs

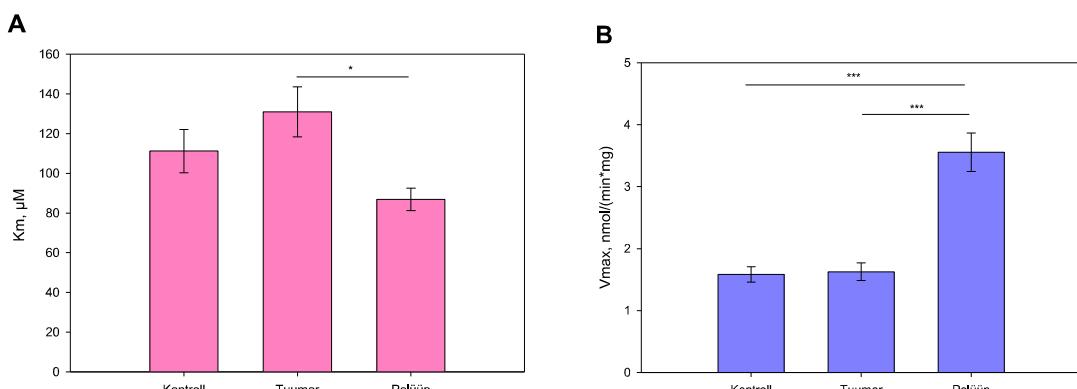
Andmete analüüsimiseks kasutati keskmist väärust ja standardviga (SEM). Erisuguste tulemuste omavaheliseks võrdluseks kasutati kahepoolset *student t-testi*, kus arvesse võeti p väärusti $<0,05$. Oksügraafilise analüüsi andmete töötlus toimus Oroboros DatLab 7 tarkvaras ja tulemused normaliseeriti kuivkaalu suhtes. Arvutused ja graafikud tehti programmides MS Excel ja SigmaPlot 11.0.

4. Tulemused ja arutelu

4.1 Näiline Michaelis-Menteni konstant ADP suhtes

OXPHOS-i osakaalu iseloomustamiseks ATP sünteesimisel mõõdeti kõrglahutuva respiromeetria meetodil hapniku tarbimise kiirust terves soolekoes ($n=21$), CRC kasvajakoes ($n=20$) ja polüübiks ($n=16$). Tulemuste põhjal arvutati maksimaalne ADP-akteiveeritud hingamine (V_{max}) ja näiline Michaelis-Menteni konstant eksogeenselt lisatud ADP suhtes (Km_{ADP}) (joonis 4). Näiline Michaelis-Menteni konstant Km_{ADP} näitab mitokondri afiinsust ADP suhtes ja selle madal väärthus viitab suuremale glükolüüsi rollile energiatootmises.

Kasvajakoe Km_{ADP} ($130,94 \pm 12,58$) ja terve soolekoe Km_{ADP} ($111,19 \pm 10,96$) sarnanevad ($p=0,242$), kuid polüübi Km_{ADP} väärthus ($86,86 \pm 5,62$) on vähist märgatavalt madalam ($p=0,006$) (joonis 4A). See viitab suuremale glükolüüsi osakaalule polüübiks võrreldes kasvajakoega, kuid vähis domineerib sarnaselt tervele soolekoole OXPHOS. Lisaks tähendab see ka suuremat MOM-i läbilaskvust polüübiks. Kõrgelt glükolütiline fenotüüp polüübiks soodustab selle arenemist maliigseks (Lin et al., 2019). Seda toetab ka polüübi kaks korda suurem V_{max} väärthus ($3,56 \pm 0,31$) võrreldes kasvajakoe ($1,63 \pm 0,14$, $p<0,001$) ja terve soolekoega ($1,58 \pm 0,12$, $p<0,001$) (joonis 4B). V_{max} terves soolekoes ja kasvajakoes ei erinenud ($p=0,814$), mis näitab, et rakkude hingamiskiirus nendes kudedes ei erine. Antud töö Km_{ADP} ja V_{max} tulemustest võib järeladata, et CRC kasvajakude ja terve soolekude on sarnase bioenergeetilise fenotüübiga. Üheaegselt kõrge V_{max} ja madal Km_{ADP} polüüpides viitab suurenenedu energiatoomisele glükolüüsi arvelt.

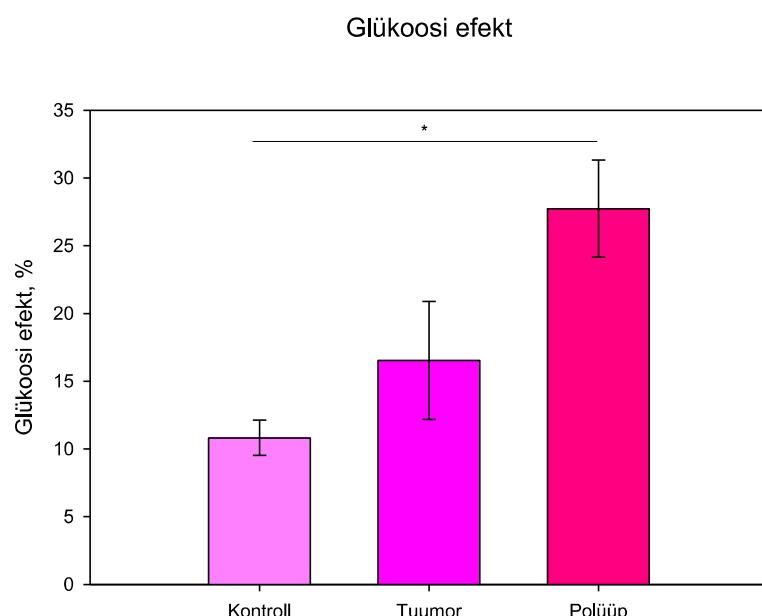


Joonis 4. Mitokondriaalse hapniku tarbimise kiirus terves soolekoes ($n=21$), CRC kasvajakoes ($n=20$) ja polüübiks ($n=16$). Võrreldi (A) näilst Michaelis-Menteni konstanti eksogeense ADP suhtes (Km_{ADP}) ja (B) maksimaalset ADP-akteiveeritud hingamise taset (V_{max}). Veapostid näitavad standardviga. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ (t-test).

Enamik CRC molekulaarsed mehhanismid on kirjeldatud rakukultuuride põhjal, kus on näidatud kõrget glükolütilist aktiivsust. Varasemad tulemused kliinilise materjaliga on aga viidanud OXPHOS-i domineerimisele kasvajarakkudes (Reinsalu et al., 2021). Antud töö tulemustes oli CRC kasvajakoe üsna kõrge Km_{ADP} , mis tähendab suurt OXPHOS-i osakaalu. Rakukultuuridega tehtud katsed erinevad kliinilisest materjalist, sest rakke ei kasvatata füsioloogilise hapniku juuresolekul ning rakusöötmes domineerib glükoos (Koit et al., 2017). Sellel põhjusel vajab CRC rohkem uurimist just kliinilise materjaliga, et mõista kasvajaraku bioenergeetikat *in vivo* tingimustel.

4.2 Glükoosi efekt

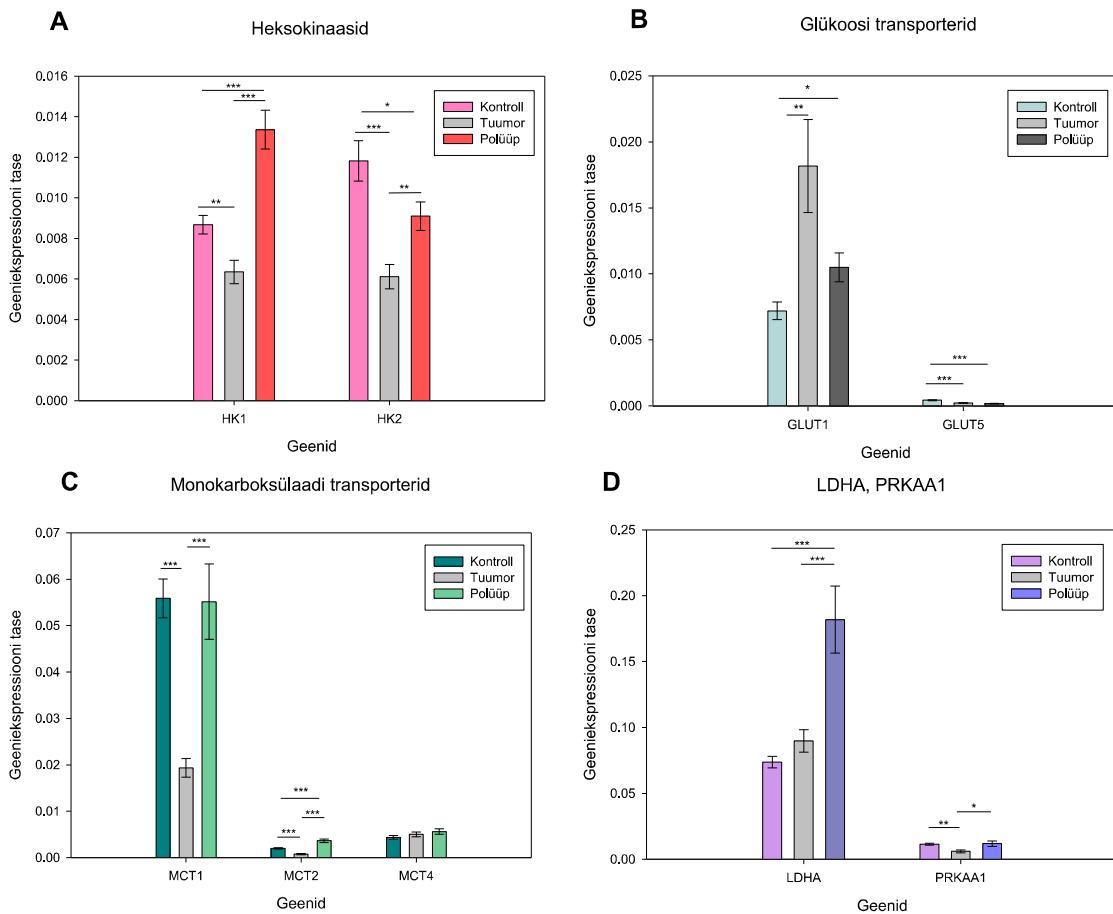
Heksokinaaside (HK) ülesanne on fosforüleerida glükoosi ATP fosfaatgrupi abil (Mathupala et al., 2009). HK aktiivsust terves soolekoes ($n=4$), kasvajakoes ($n=5$) ja polüübiks ($n=17$) hinnati ADP ja glükoosi juuresolekul (joonis 5). Erinevus puudus kasvajakoe ($I_{gluc}=16,54\%$) ja terve soolekoe ($I_{gluc}=10,82\%$) ning kasvajakoe ($I_{gluc}=16,54\%$) ja polüübi ($I_{gluc}=27,74\%$) vahel (vastavalt $p=0,296$ ja $p=0,129$). Sellest saab järeltõsta, et heksokinaaside aktiivsus on nendes kudedes sarnane, mida kinnitab ka varasem uuring terve soolekoe, kasvajakoe ja sellele lähedal asuva koega (Chekulayev et al., 2015). Küll aga võib vajalik olla valimi hulga suurendamine, et järeltõusele kinnitust saada. Polüübis on heksokinaasid võrreldes terve soolekoega kaks korda aktiivsemad ($p=0,037$), mis viitab taaskord suurenenud glükolüüsile osakaalule polüübiks.



Joonis 5. Oksügraafiline analüüs tuvastamaks heksokinaaside aktiivsust glükoosi juuresolekul terves soolekoes ($n=4$), kasvajakoes ($n=5$) ja soolepolüübiks ($n=17$). Veapostid näitavad standardviga.
* $p<0,05$ (t-test).

4.3 Glükoosi metabolismis osalevate geenide ekspressioonitasemed

Kasutades qRT-PCR-i leiti glükoosi metabolismis osalevate geenide *HK1*, *HK2*, *GLUT1*, *GLUT5*, *LDHA*, *PRKAA1* ja *MCT1*, *MCT2*, *MCT4* ekspressioonitasemed terves soolekoes ($n=16$), vähikokes ($n=15$) ja polüübiks ($n=12$) (joonis 6).



Joonis 6. (A) Heksokinaaside, (B) glükoosi transporterite, (C) monokarboksülaadi transporterite ja (D) LDHA ekspressioonitasemed terves soolekoes ($n=16$), CRC kasvajakoes ($n=15$) ja soolepolüübisse ($n=12$). (D) PRKAA1 ekspressioonitase terves soolekoes ($n=7$), CRC kasvajakoes ($n=6$) ja soolepolüübisse ($n=2$). Veapostid näitavad standardviga. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (t-test).

HK1 ja *HK2* ekspressoeruvad vähikokes madalamalt kui terves soolekoes (vastavalt $p=0,004$ ja $p<0,001$) (joonis 6A). Sarnaselt on *HK1* ja *HK2* ekspressoonitasemed vähikokes madalamad kui polüübisse (vastavalt $p<0,001$ ja $p=0,003$). *HK2* ekspressoerub kirjanduse põhjal vähikokes kõrgemalt ja seondub VDAC-iga kutsudes esile Warburgi efekti (Mathupala et al., 2009; Robey & Hay, 2006). Pederseni mudeli järgi viitab heksokinaaside üleekspressoон suurenenuud glükolüütilese aktiivsusele (Pedersen, 2007). Madal *HK* isovormide ekspressoон kasvajakoes viitab seega CRC oksüdatiivsele fenotüübile, sest heksokinaaside ekspressoон on suurenenuud kõrgelt glükolüütilestes tuumorites (Mathupala et al., 2009). Seda kinnitasid ka oksügraafilise analüüsiga tulemused (joonis 4 ja 5). Polüüpides ekspressoerub *HK1* kõrgemalt kui terves soolekoes ($p<0,001$), mis koos Km_{ADP} ja glükoosi efekti tulemustega kinnitab nendes suurenenuud glükolüütlist aktiivsust. Küll aga ekspressoerub *HK2* polüübisse madalamalt kui terves soolekoes ($p=0,047$). See näitab, et Warburgi efekt polüüpides ei tulene *HK2* üleekspressoonest (Mathupala et al., 2009; Robey & Hay, 2006). Glükolüusi aktiivsuse tõus polüüpides võib seega tuleneda *HK1* kõrgest ekspressoonitasemest või tugevamast *HK2* seondumisest VDAC-ile.

Varasemalt on näidatud, et mitmesugused onkogeenid nagu *c-myc* ja *ras* võivad suunata energiatootmist glükolüusi suunas suurendades erinevate *GLUT* isovormide ekspressooni, millele on kinnitust leidnud erinevates kasvajatüüpides näidatud *GLUT* aktiivsuse muutused (Marín-

Hernández et al., 2006; Rodríguez-Enríquez, 2009). Antud töö tulemused kahe *GLUT* isovormiga näitasid, et fruktoosispetsiifiline *GLUT5* ekspresseerub kõikides kudedes madalalt (joonis 6B), mis viitab sellele, et rakud eelistavad energiaallikana glükoosi fruktoosile. *GLUT1* ekspressoontase on vähikoes 2,5 korda kõrgem kui terves sooles ($p=0,004$), mis võib tähendada suurenenud glükoosi kasutamist vähirakkudes. Körget *GLUT1* ekspressooni seostatakse CRC kehva elulemusega (Ancey, Contat, & Meylan, 2018). *GLUT1* ekspressoontasemetes pole erinevust vähikoe ja polüübi vahel ($p=0,071$). Põhinedes kirjandusele võib *GLUT1* üleekspressioon soodustada heksokinaaside üleekspressiooni (Rathmell et al., 2003), kuid antud töös heksokinaasid ekspresseerusid vähikoes madalamalt. Polüübisse ekspresseerus *GLUT1* kõrgemalt kui terves soolekoes ($p=0,012$) sarnaselt heksokinaasidele. Suurenenud *GLUT* ekspressoontasemed soodustavad tuumorite kasvu (Ganapathy-Kanniappan & Geschwind, 2013; Holman, 2020). Madala glükolüüs aktiivsusega vähirakud võivad suurendada glükoosi transporti, et kasutada seda pentoosfosfaadi rajas. *GLUT5* ekspresseerub nii tuumoris kui ka polüübisse madalamalt kui terves soolekoes (mõlemad $p<0,001$). See võib tähendada, et terve kude suudab haarata energiа saamiseks ka fruktoosi, kuid vahi- ja polüübirkud sõltuvad rohkem glükoosist.

LDHA ekspressoontasemetes vähikoe ja terve soolekoe vahel erinevus puudub ($p=0,101$) (joonis 6D), milles võib järeltähtaada, et laktaadi tootmine vähikoes ja terves soolekoes ei erine. Vastupidiselt on kirjanduses leitud seos *LDHA* ekspressooni ja CRC metastaseerumise vahel (Koukourakis, Giatromanolaki, Sivridis, Gatter, & Harris, 2006), kus rakuväline laktaat suurendab vähirakkude liikuvust ja kasvufaktorite reguleerimist (Walenta et al., 2000). Polüübisse ekspresseerub *LDHA* kõrgemalt kui vähikoes ($p<0,001$) ja terves soolekoes ($p<0,001$), mis viitab sellele, et pürivaat ei lähe edasi OXPHOS-i, vaid muudetakse peamiselt lakaadiks (Pavlova et al., 2022). Üks uuring polüüpidega on näidanud, et muutused *LDHA* isovormide ekspressoontasemetes võib olla varajane märk pahaloomulisesest (Carda-Abella, 1982), sest rakuväline pH langus soodustab immuunvastuse vaigistamist ja metstaseerumist (R. Kim, Emi, & Tanabe, 2007; Payen et al., 2016).

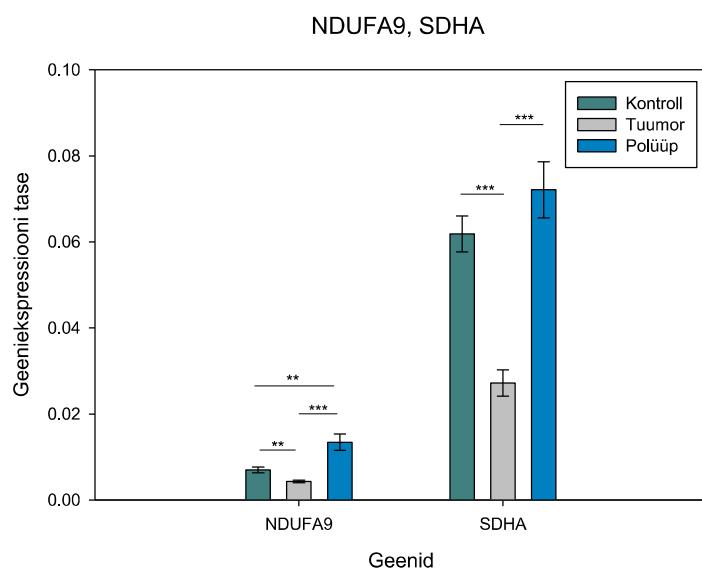
MCT1 ja *MCT2* ekspresseeruvad vähikoes umbes kaks korda madalamalt kui terves soolekoes ja polüübisse ($p<0,001$ mõlemal juhul) (joonis 6C). Madal *MCT*-de ekspressoontase vähis võib viidata sellele, et laktaati ei transpordita suures hulgas rakust välja, vaid ilmselt liigub see eelistatult mitokondrisse OXPHOS-i. Sellest võib taaskord järeltähtaada, et CRC ei ole glükolüütiline vähitüüp (Mathupala et al., 2009). *MCT1* ekspressooni korreleerub ka laktaadi, ketoonkehade ja butüraadi rakku sissevooluga (Curry et al., 2013), mistöttu võib arvata, et erinevalt tervest soolekoest ei sõltu soolevähk energiatootmisel rasvhapetest. Butüraadi transpordi olulist osakaalu terves soolekoes näitab *MCT1* kõrge ekspressoontase. Samas kasvajakude, mis pole glükolüütiline, toetub vähem ka rasvhapetele. *MCT4* ekspressoontasemetes pole erinevust vähikoe ja terve soolekoe ($p=0,308$) ning vähikoe ja polüübi vahel ($p=0,474$). *MCT4* on tuumorspetsiifiline marker epitheliaalsetes vähirakkudes oksüdatiivse stressi ja glükolüusi puhul. Seetõttu on pakutud välja, et mitte-prolifereeruvad rakud, milles *MCT4* on ülesreguleeritud, toodavad molekule profileeruvate vähirakkude jaoks metaboolse sümbioosi käigus (Curry et al., 2013). Sellest võib järeltähtaada, et soolevähk ei kasuta monokarboksülaadi transporterite vahendatud metaboolset plastilisust. Küll aga ei pruugi geeniekspressooni ja valgufunksiooni rakus olla korrelatsioonis. *MCT2* ekspresseerub polüübisse kõrgemalt kui terves soolekoes ($p<0,001$), mis osutab glükolüütile metabolismile, sest *MCT2* asub peamiselt tsütosoolis (Pinheiro et al., 2010). *MCT1* ja *MCT4* puhul polüübi ja terve soolekoe (vastavalt $p=0,934$ ja $p=0,082$) vahel erinevus puudub. See tulemus võib viidata polüübisse

ülekaalus olevale glükolüüsile, mistöttu laktaati on rohkem. Eelduste kohaselt on *MCT1* ja *MCT4* terves soolekoes kõrge butüraadi transpordiks, kuid polüübiks laktaadi jaoks. Selle kinnitamiseks on vajalikud edasised oksügraafilised analüüsides protokollidega, kus aktiveeritakse rasvhapete metabolismi.

PRKAA1 ekspresseerub vähikoes madalamalt kui terves soolekoes ($p=0,002$) (joonis 6D), mis võib olla vähikoele kasulik, sest metaboolse stressi korral AMPK inhibeerib tuumori kasvu rakutsükli kontrollpunktide kaudu (Slattery et al., 2010; Woods et al., 2003). AMPK ekspressiooni vähenemine embrüonaalsetes fibroblastides vähendas rakutsükli G2-M kontrollpunktide vastust (Sanli et al., 2012). Vastuoluliselt on CRC kliinilise materjaliga näidatud, et kõrged AMPK tasemed on seotud patsiendi halva prognoosiga. Rakuliinides on AMPK oluline vähirakkude ellujäämisel ja kasvamisel metaboolse stressi puhul (Wang et al., 2020). Suurenenedud AMPK ekspressioon supresseerib vähiraku proliferatsiooni ja on näidanud kemoterapiat saanud hiiremudeli paremat elulemust (Harada, Ferdous, Harada, & Ueyama, 2016). Polüübiks ekspresseerub *PRKAA1* kõrgemalt kui vähikoes ($p=0,044$), kuid polüübi ja terve soolekoe vahel erinevus puudub ($p=0,831$). Polüübiga tehtud *PRKAA1* tulemustesse tuleb suhtuda kriitiliselt, sest geeniekspressiooni mõõdeti vaid kahes proovis.

4.4 Mitokondriaalses hingamises osalevate geenide ekspressioonitasemed

Glükoosi metabolismis järgneb glükolüüsile mitokondriaalne hingamine. Sellel põhjusel mõõdeti antud töös mitokondriaalse hingamisahela CI subühiku *NDUFA9* ja CII subühiku *SDHA* ekspressioonitasemeid terves soolekoes ($n=16$), vähikoes ($n=15$) ja polüübiks ($n=12$) (joonis 7).



Joonis 7. NADH dehüdrogenaasi subühik 9 (NDUFA9) ja suksinaadi dehüdrogenaasi subühik A (SDHA) ekspressioonitasemed terves soolekoes ($n=16$), CRC kasvajakoes ($n=15$) ja soolepolüübiks ($n=12$). Veapostid näitavad standardviga. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (t-test).

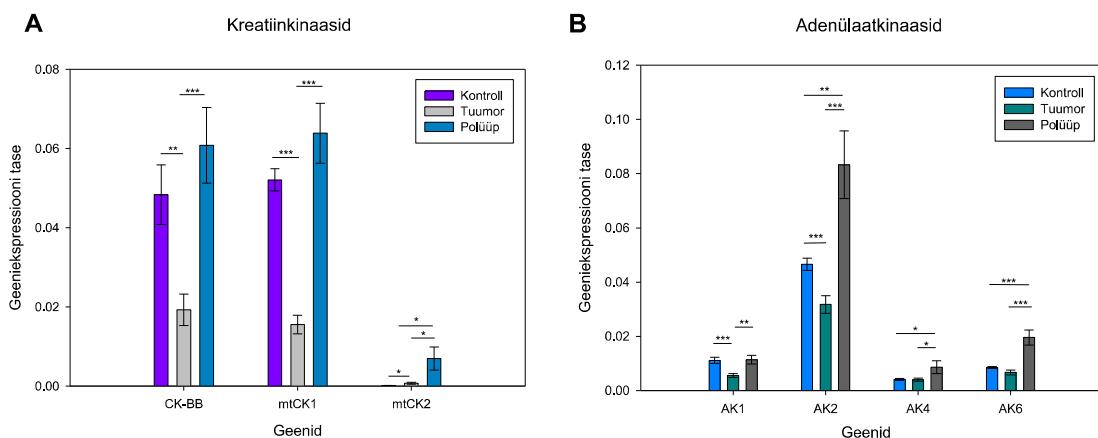
NDUFA9 ekspresseerub vähikoes madalamalt kui terves soolekoes ja polüübiks ($p=0,001$ ja $p<0,001$) (joonis 7). Polüübiks ekspresseerub *NDUFA9* kõrgemalt kui terves soolekoes ($p<0,001$). Saadud tulemused on vastuolus eelnevate glükoosi metabolismi ekspressiooni tulemutega viidates sellele,

et soolevähk võib olla glükolüütiline, sest Cl üks subühikutest ei tööta sama hästi kui terves soolekoes ja polüübis. Lynch sündroomi ehk päriliku mittepolüüpse CRC ja juhuslikul DNA valepaardumisel tekkinud tuumorites oli *NDUFA9* alaekspressoerunud (Dominguez-Valentin et al., 2013). Küll aga näitavad tulemused CRC SW620 rakuliiniga, et *NDUFA9* on üleekspressoerunud ja glükolüütilised ensüümid alaekspressoerunud (Lin et al., 2018). Sellest võib järeltada, et NADH dehidrogenaas on funktsionaalselt paremini reguleeritud kompleksina kui ühe subühiku tasemel. Cl, CIII ja CIV superkompleksi moodustumine võib tasakaalustada defekte üksikus subühikus (Acín-Pérez, Fernández-Silva, Peleato, Pérez-Martos, & Enriquez, 2008).

SDHA ekspressoontasemetes (joonis 7) täheldati vähikoes madalamat taset kui terves soolekoes ja polüübisse ($p<0,001$ ja $p<0,001$). Polüübi ja terve soolekoe puhul *SDHA* ekspressoontasemetes erinevus puudub ($p=0,180$). Vastupidiselt tulemused mao vähikoega näitasid *SDHA* ekspressooni suurenemist võrdluses normaalse koega. Hüpoksia korral *SDHA* ekspressoontasemed vähenesid, mis viitab glükolüüsile. Leiti, et *SDHA* ekspressooni suurenedes TCA tsükkel töötas, aga hingamisahela funktsioon langes (Jiang et al., 2021). Seedetrakti strooma kasvaja puhul üheksal patsiendil 33-st oli *SDHA* ekspressooni puudulik võrreldes normaalse koega (Wagner et al., 2013). Antud töö *SDHA* madal ekspressooni vähikoes võib viidata mittetäielikule TCA ja elektrontranspordi sidumisele. Küll aga võib hingamisahela funktsioon olla tasakaalustatud teise subühiku poolt või domineerib kasvajas hoopis Cl, CIII ja CIV moodustatud superkompleksi (Acín-Pérez, Fernández-Silva, Peleato, Pérez-Martos, & Enriquez, 2008).

4.5 Energiatransporditeedese osalevate geenide ekspressoontasemed

Energiatransporditeedese osalevad energiakandjatena peamiselt kreatiinkinaasid (CK) ja adenülaatkinaasid (AK). CK abil muudetakse fosfokreatiini ATP-ks, et sinna salvestatud energiat uuesti kasutusele võtta (Yan, 2016). AK arvatakse elevat omapärane vähkkasvajatele, kus see tavapäraselt hüpoksia korral aktiveerib AMPK-i, mis viib ATP tootmiseni (Fujisawa et al., 2016; Hardie et al., 2012). Antud töös mõõdeti kolme kreatiinkinaasi isovormi (joonis 8A) ja nelja adenülaatkinaasi isovormi (joonis 8B) ekspressoontasemeid terves soolekoes ($n=16$), vähikoes ($n=15$) ja polüübisse ($n=12$).



Joonis 8. (A) Kreatiinkinaaside ja (B) adenülaatkinaaside isovormide ekspressoontasemed terves soolekoes ($n=16$), CRC kasvajakoes ($n=15$) ja soolepolüübisse ($n=12$). Veapostid näitavad standardviga. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (t-test).

Antud töös mõõdetud tulemuste järgi ekspresseeruvad *CK-BB* ja *mtCK1* ekspresseeruvad vähikoes madalamalt kui terves soolekoes (vastavalt $p=0,002$ ja $p<0,001$) ja polüübiks (vastavalt $p<0,001$ ja $p<0,001$) (joonis 8A). See on vastavuses varasemate andmetega (Chekulayev et al., 2015; Kaldma et al., 2014), mis pakub, et kreatiinkinaasid on vähikoes allareguleeritud. Muutused *CK-BB* aktiivsusel suurendavad OXPHOS-i osakaalu (Yan, 2016). *mtCK* allareguleerimine CRC-s viib VDAC-*mtCK*-ANT kompleksi funktsionaalsuse kadumiseni, mille tulemusel tekib VDAC-HK-ANT kompleks (Reinsalu et al., 2021). Küll aga on antud töö vähikoe tulemustes heksokinaasid samuti allareguleeritud. *mtCK2* ekspresseerub vähikoes kõrgemalt kui terves soolekoes ($p=0,012$) ja madalamalt kui polüübiks ($p=0,026$), mille erinevus võib tulla nende isovormide paiknemisest. Lisaks *mtCK* ülesregulatsioon võib viidata kompensatoorsele mehhanismile, et parandada OXPHOS-i (Schlattner, Tokarska-Schlattner, & Wallimann, 2006). Polüübiks ekspresseeruvad *mtCK1* ja *mtCK2* kõrgemalt kui terves soolekoes (vastavalt $p=0,020$ ja $p=0,010$), mis viitab nende funktsionaalsele muutusele polüübiks. *CK-BB* ekspressioonitasemed polüübi ja terve soolekoe vahel ei erine ($p=0,308$).

AK1 ja *AK2* ekspresseeruvad vähikoes madalamalt kui terves soolekoes (vastavalt $p<0,001$ ja $p<0,001$) (joonis 8B). See on vastuolus kirjanduses toodud hüpoteesiga ja varasemate tulemustega (Chekulayev et al., 2015; Kaldma et al., 2014), et vähikoes suureneb AK roll, kui CK süsteemi osakaal väheneb. *AK2* madal ekspressioon on kasulik prolifereruvatele rakkudele rinnavähi rakuliinides MCF-7 ja C33A (H. Kim et al., 2014). Seejuures *AK1* ekspressioon polüüpides ja terves soolekoes sarnaneb ($p=0,889$), kuid *AK2* on polüüpides ekspresseerunud peaaegu kaks korda kõrgemalt kui terves soolekoes ($p=0,003$). Lisaks on *AK1* ja *AK2* polüüpides ekspresseerunud kõrgemalt kui tuumoris (vastavalt $p=0,001$ ja $p<0,001$). Sellest saab järeldada, et antud ekspressioonitasemed on polüüpidele kasulikud, et toetada raku proliferatsiooni (Dzeja & Terzic, 2009) maliigseks muutumisel. *AK4* ja *AK6* ekspressioonitasemetes ei esine olulisi stastilisi erinevusi vähikoe ja terve soolekoe vahel (vastavalt $p=0,814$ ja $p=0,073$). *AK4*, mis on kopsuvähi biomarker (Klepinin et al., 2020), ekspresseerub kõrgemalt polüübiks kui terves soolekoes ja vähikoes ($p=0,040$ ja $p=0,045$). Samuti *AK6*, mis kirjanduse alusel võiks olla vähimarker (Klepinin et al., 2020), on kõrgelt ekspresseerunud hoopis soolepolüübiks võrreldes terve soolekoe ja vähikoega ($p<0,001$ ja $p<0,001$). Adenülaatkinaaside ja kreatiinkinaaside samaaegne kõrge aktiivsus soolepolüüpides viitab üleminekuvaasile maliigseks muutumisel.

Kokkuvõte

Kolorektaalvähk on üks surmavamaid pahaloomulisi kasvajaid, sest see tuvastatakse tihti hilises staadiumis. Seetõttu on tarvis leida uusi ravimeetodeid. Vähkkasvajatele omast kiirest proliferatsiooni toetab rakuenergeetika reprogrammeerimine. Mitmesugustel kasvajatel on erinevad metaboolsed fenotüübhid, kus ülekaalus võib olla glükolüüs või hoopis oksüdatiivne fosforülimine.

Kolorektaalvähk areneb enamasti neoplastilistest polüüpidest jäme- ja käärsoole limaskestas, mille pahaloomulisust toetab metaboolne plastilisus. Muutused raku bioenergeetikas ja mutatsioonid mitokondriaalses pärilikkusaines mõjutavad rakkude energiametabolismi radu, mis võivad olla sobivad sihtmärgid ravimitele. Sellel põhjusel oli antud töö eesmärgiks iseloomustada kolorektaalvähvi arengule omast energiametabolismi ning kirjeldada hapniku tarbimist kliinilises materjalis. Sealjuures võrrelda oksügraafilisi ja energiametabolismis osaleva 18 geenit ekspresiooni andmeid terves soolekoes, soolevahi kasvajakoes ja polüübise.

Töö tulemustest ilmnes, et soolepolüübidi eelistavad glükolüüs ja viitavad Warburgi efektile. Küll aga on soolevähis glükolüusi osatähtsus vähenenud ja oksüdatiivne fosforülimine ATP tootmiseks taastunud. Sellele viitasid arvutatud maksimaalne ADP-aktiveeritud hingamine ja näiline Michaelis-Menteni konstant eksogeenselt lisatud ADP suhtes. Glükoosi metabolismis osalevate geenide ekspresioonitasemetest selgus, et kolorektaalvähk ei pruugi olla glükolüüteline vähitüüp, nagu eelnevalt on pakutud. Analüüsides mitokondriaalses hingamises osalevate geenide ekspresioonitasemeid leiti, et subühikute ekspresioon ei kajasta hingamisahela komplekside funktsionaalset aktiivsust. Energiatransporditeedes osalevate kinaaside geeniekspresiooni analüüsime andis tulemuse, et kasvajakoes langeb kreatiinkinaaside aktiivsus, kuid selle asemel ei kasva adenülaatkinaaside kompenseeriv osakaal. Küll aga on mõlemad aktiivsed soolepolüüpides, mis on kasulik maliigsuse tekkes.

Edasine katsete kordamine on kliinilise materjali ebaühtlusest tulenevalt oluline valimi hulga suurendamiseks. Antud töös käsitletud geenide valgufunktsiooni ja sellest tuleneva ensüümaktiivsuse uurimine edaspidiselt annab parema ülevaate soolepolüüpide ja kolorektaalvähvi bioenergeetikast. Lisaks on tähtis uurida erinevaid energiatootmisse radu ja võimalusel teostada oksügraafilist analüysi muude substraatidega vastavalt soolerakkude toitainete eelistusele. Vähi ravitulemuste parendamiseks tuleks jälgida patsientide haiguskulgu ning leida korrelatsioone tulemuste ja ravivõimaluste vahel.

Abstract

Colorectal cancer is a malignant and often fatal cancer type because it is diagnosed at a late stage. According to this, there is a need for new therapeutic methods. Tumors are rapidly proliferating, contributing to the rearrangements in energy metabolism to provide enough energy for fast cell growth. Several cancer types have different metabolic phenotypes, which may be dominated by glycolysis or oxidative phosphorylation.

Colorectal cancer develops primarily from neoplastic polyps in the mucosa of the colon and rectum. The malignancy is induced by metabolic plasticity. Changes in cell bioenergetics and mutations in mitochondrial genetic information affect energy metabolism pathways in cells. These can be proper targets for new therapeutic methods. Therefore, the study aimed to describe the characteristics to the development of colorectal cancer and describe the consumption of oxygen in clinical material. Thereby, the author compared the results from oxygraphic analyzes and eighteen gene expression data in healthy colon tissue, colorectal cancer tissue, and polyp tissue.

Results showed that polyps prefer glycolysis and refer to the Warburg effect. The activity of glycolysis in colorectal cancer tissue is lower and oxidative phosphorylation is mainly used for ATP production. It was indicated by calculating the maximal ADP-induced respiration and apparent Michaelis-Menten's constant in the ratio of exogenous ADP. Expression levels of genes involved in glucose metabolism indicate that colorectal cancer may not be a glycolytic cancer type as previously suggested. Analyzing the expression levels of genes involved in mitochondrial respiration, it was found that the expression of subunits may not reflect the functional activity of supercomplexes. Analysis of the gene expression of kinases involved in energy transport chains revealed a decrease in the activity of creatine kinases in cancer tissue. Likewise, there was no increase in the compensatory role of adenylate kinases as previously suggested. However, both are active in colon polyps, which is beneficial in the development of malignancy.

Further repetition of experiments is important due to the heterogeneity of clinical material. It is important to study the genes discussed in this work on protein level and measure the enzyme activity to provide a better overview of the bioenergetics of polyps and colorectal cancer. In addition, it is necessary to study different energy production pathways and perform oxygraphic analysis with other substrates to test the activity of other metabolic pathways. To improve cancer outcomes, it is suggested to monitor patients and find correlations between outcomes and treatment options.

Tänuavalused

Soovin esmalt tänada oma juhendajat Leenu Reinsalu, kes oma südikusega inspireeris ka mind olema uudishimulik ja teotahteline. Olen tänulik meie paindliku ja usaldusväärse koostöö eest, mis edenes oodatust paremini. Tema heatahtlikkus ja ülesehitav toetus on peamine, mis ka stressirohkkel perioodil suutis mõistuse ratsionaalsena hoida.

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 alati julgustasid ja tundsid huvi mu töö vastu. Nende utoopiline uskumus, et ma leiutan vähiravimi, suurendas mu töötahet ja ambitionsiooni.

Kasutatud kirjandus

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- Ancey, P.-B., Contat, C., & Meylan, E. (2018). Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. *The FEBS Journal*, 285(16), 2926–2943. <https://doi.org/10.1111/febs.14577>
- Anflous, K., Armstrong, D. D., & Craigen, W. J. (2001). Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1954–1960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006587200>
- Badrinath, N., & Yoo, S. Y. (2018). Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. *Carcinogenesis*, 39(12), 1419–1430. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy148>
- Bai, D., Zhang, J., Li, T., Hang, R., Liu, Y., Tian, Y., ... Zheng, X. (2016). The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nature Communications*, 7(1), 12310. <https://doi.org/10.1038/ncomms12310>
- Bellance, N., & Patrick Lestienne, R. R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *FBL*, 14(11), 4015–4034. <https://doi.org/10.2741/3509>
- Bergeron, R., Ren, J. M., Cadman, K. S., Moore, I. K., Perret, P., Pypaert, M., ... Shulman, G. I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 281(6), E1340–E1346. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1340>
- Bonora, M., Paterniani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., ... Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signalling*, 8(3), 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>
- Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490–1502. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)
- Burke, P. J. (2017). Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trends in Cancer*, 3(12), 857–870. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.006>
- Carda-Abella, P., Perez-Cuadrado, S., Lara-Baruque, S., Gil-Grande, L., & Nuñez-Puertas, A. (1982). LDH isoenzyme patterns in tumors, polyps, and uninvolved mucosa of human cancerous colon. *Cancer*, 49(1), 80–83. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19820101\)49:1<80::aid-cncr2820490118>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19820101)49:1<80::aid-cncr2820490118>3.0.co;2-c)
- Chabe, B., Malvi, P., Singh, S. V., Mohammad, N., Viollet, B., & Bhat, M. K. (2015). AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis. *Cell Death Discovery*, 1(1), 15063. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.63>
- Chekulayev, V., Mado, K., Shevchuk, I., Koit, A., Kaldma, A., Klepinin, A., ... 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/https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.020>
- Curry, J. M., Tuluc, M., Whitaker-Menezes, D., Ames, J. A., Anantharaman, A., Butera, A., ... Martinez-Outschoorn, U. E. (2013). Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence. *Cell Cycle*, 12(9), 1371–1384. <https://doi.org/10.4161/cc.24092>
- Danhier, P., Bański, P., Payen, V. L., Grasso, D., Ippolito, L., Sonveaux, P., & Porporato, P. E. (2017). Cancer metabolism in space and time: Beyond the Warburg effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 556–572. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabiobio.2017.02.001>
- De Palma, F. D. E., D'Argenio, V., Pol, J., Kroemer, G., Maiuri, M. C., & Salvatore, F. (2019). The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers*, 11(7), 1017.

- <https://doi.org/10.3390/cancers11071017>
- Dominguez-Valentin, M., Therkildsen, C., Veerla, S., Jönsson, M., Bernstein, I., Borg, A., & Nilbert, M. (2013). Distinct gene expression signatures in lynch syndrome and familial colorectal cancer type x. *PLoS One*, 8(8), e71755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071755>
- Dzeja, P., & Terzic, A. (2009). Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing. *International Journal of Molecular Sciences*, Kd 10. <https://doi.org/10.3390/ijms10041729>
- Elzagheid, A., Libya, T., & Al-Fituri, O. (2020). Ministry of Education Authority of Natural Science Research and Technology The Prognostic and Predictive Value of Immunohistochemical Markers in Stage II Colorectal Cancer Special Reference to E-cadherin, MUC2, Cyclooxygenase-2, Protein phosphatase methyl. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19976.98566>
- Frank, W., Robert, H., W., W. W., Samuel, W., Joy, J., Marcos, L., ... S., C. N. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8788–8793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003428107>
- Fujisawa, K., Terai, S., Takami, T., Yamamoto, N., Yamasaki, T., Matsumoto, T., ... Sakaida, I. (2016). Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0322-2>
- Ganapathy-Kanniappan, S., & Geschwind, J.-F. H. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Molecular Cancer*, 12, 152. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-152>
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 204–224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
- Halestrap, A. P. (2012). The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life*, 64(1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/iub.573>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(4), 57–70. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- 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>
- Harada, K., Ferdous, T., Harada, T., & Ueyama, Y. (2016). Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 49(1), 276–284. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3523>
- Hardie, D G, & Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry*, 246(2), 259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x>
- Hardie, D Grahame. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development*, 25(18), 1895–1908. <https://doi.org/10.1101/gad.17420111>
- Hardie, D Grahame, Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Hatéfi, Y. (1985). THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 1015–1069. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.005055>
- Herst, P. M., Grasso, C., & Berridge, M. V. (2018). Metabolic reprogramming of mitochondrial respiration in metastatic cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(4), 643–653. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9769-2>
- Holman, G. D. (2020). Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 472(9), 1155–1175.

- <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02411-3>
- Iommari, 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. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(1), 47–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.016>
- Jan, Y.-H., Lai, T.-C., Yang, C.-J., Huang, M.-S., & Hsiao, M. (2019). A co-expressed gene status of adenylate kinase 1/4 reveals prognostic gene signature associated with prognosis and sensitivity to EGFR targeted therapy in lung adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 9(1), 12329. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48243-9>
- Jiang, J., Jiang, Y., Zhang, Y.-G., Zhang, T., Li, J.-H., Huang, D.-L., ... Ma, Y.-Y. (2021). The effects of hypoxia on mitochondrial function and metabolism in gastric cancer cells. *Translational Cancer Research*, 10(2), 817–826. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-2598>
- Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H., & Shu, Y. (2019). Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer*, 18(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1089-9>
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., ... Thompson, C. B. (2005). AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, 18(3), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.027>
- Kaambre, T., Chekulayev, V., Shevchuk, I., Karu-Varikmaa, M., Timohhina, N., Tepp, K., ... Saks, V. (2012). Metabolic control analysis of cellular respiration *in situ* in intraoperative samples of human breast cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(5), 539–558. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9457-9>
- Kaldma, A., Klepinin, A., Chekulayev, V., Mado, K., Shevchuk, I., Timohhina, N., ... 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>
- Kaori, I., Keizo, T., Miho, A., Nobuko, K., Aya, Y., Hirotake, I., ... Jun-Ichi, H. (2008). ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science*, 320(5876), 661–664. <https://doi.org/10.1126/science.1156906>
- Kim, H., Lee, H.-J., Oh, Y., Choi, S.-G., Hong, S.-H., Kim, H.-J., ... Jung, Y.-K. (2014). The DUSP26 phosphatase activator adenylate kinase 2 regulates FADD phosphorylation and cell growth. *Nature Communications*, 5, 3351. <https://doi.org/10.1038/ncomms4351>
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
- Klepinin, A., Zhang, S., Klepinina, L., Rebane-Klemm, E., Terzic, A., Kaambre, T., & Dzeja, P. (2020). Adenylate Kinase and Metabolic Signaling in Cancer Cells. *Frontiers in Oncology*, 10(May), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00660>
- Kluckova, K., Bezwork-Geleta, A., Rohlena, J., Dong, L., & Neuzil, J. (2013). Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5), 552–564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabiobio.2012.10.015>
- Koit, A., Shevchuk, I., Ounpuu, L., Klepinin, A., Chekulayev, V., Timohhina, N., ... Kaambre, T. (2017). Mitochondrial Respiration in Human Colorectal and Breast Cancer Clinical Material Is Regulated Differently. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1372640. <https://doi.org/10.1155/2017/1372640>
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L., & Sivridis, E. (2006). Comparison of Metabolic Pathways between Cancer Cells and Stromal Cells in Colorectal Carcinomas: a Metabolic Survival Role for Tumor-Associated Stroma. *Cancer Research*, 66(2), 632 LP – 637. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3260>
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (2006). Lactate Dehydrogenase 5 Expression in Operable Colorectal Cancer: Strong Association With Survival and Activated Vascular Endothelial Growth Factor Pathway—A Report of the Tumour

- Angiogenesis Research Group. *Journal of Clinical Oncology*, 24(26), 4301–4308. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9501>
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3(6), 965–976. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>
- La Vecchia, S., & Sebastián, C. (2020). Metabolic pathways regulating colorectal cancer initiation and progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 98, 63–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.018>
- Lambert, D. W., Wood, I. S., Ellis, A., & Shirazi-Beechey, S. P. (2002). Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *British Journal of Cancer*, 86(8), 1262–1269. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600264>
- Lin, C.-S., Liu, L.-T., Ou, L.-H., Pan, S.-C., Lin, C.-I., & Wei, Y.-H. (2018). Role of mitochondrial function in the invasiveness of human colon cancer cells. *Oncology Reports*, 39(1), 316–330. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6087>
- Lin, W.-R., Chiang, J.-M., Lim, S.-N., Su, M.-Y., Chen, T.-H., Huang, S.-W., ... Yeh, C.-T. (2019). Dynamic bioenergetic alterations in colorectal adenomatous polyps and adenocarcinomas. *EBioMedicine*, 44, 334–345. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.031>
- Liu, H., Pu, Y., Amina, Q., Wang, Q., Zhang, M., Song, J., ... Mardan, M. (2019). Prognostic and therapeutic potential of Adenylate kinase 2 in lung adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 9(1), 17757. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53594-4>
- Loo, J. M., Scherl, A., Nguyen, A., Man, F. Y., Weinberg, E., Zeng, Z., ... Tavazoie, S. F. (2015). Extracellular Metabolic Energetics Can Promote Cancer Progression. *Cell*, 160(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.018>
- Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Macías-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *The FEBS Journal*, 273(9), 1975–1988. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05214.x>
- Mathupala, S. 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.semcaner.2008.11.006>
- Mazure, N. M. (2017). VDAC in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 665–673. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabiobio.2017.03.002>
- Meyerhof, O. (1927). RECENT INVESTIGATIONS ON THE AEROBIC AND AN-AEROBIC METABOLISM OF CARBOHYDRATES. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 531–542. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.531>
- Muir, A., Danai, L. V., & Vander Heiden, M. G. (2018). Microenvironmental regulation of cancer cell metabolism: implications for experimental design and translational studies. *Disease Models & Mechanisms*, 11(8), dmm035758. <https://doi.org/10.1242/dmm.035758>
- Nakayama, Y., Torigoe, T., Inoue, Y., Minagawa, N., Izumi, H., Kohno, K., & Yamaguchi, K. (2012). Prognostic significance of monocarboxylate transporter 4 expression in patients with colorectal cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(1), 25–30. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.361>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2012). Lehninger Principles of Biochemistry. New York, W.H. Freeman & Company. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-049601-3.50017-1>
- Panayiotou, C., Solaroli, N., & Karlsson, A. (2014). The many isoforms of human adenylate kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 49, 75–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.014>
- Pavlova, N. N., Zhu, J., & Thompson, C. B. (2022). The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metabolism*, 34(3), 355–377. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.01.007>
- Payen, V. L., Mina, E., Van Hée, V. F., Porporato, P. E., & Sonveaux, P. (2020). Monocarboxylate

- transporters in cancer. *Molecular Metabolism*, 33, 48–66. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.07.006>
- Payen, V. L., Porporato, P. E., Baselet, B., & Sonveaux, P. (2016). Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1333–1348. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2098-5>
- 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>
- Permuth-Wey, J., Chen, Y. A., Tsai, Y.-Y., Chen, Z., Qu, X., Lancaster, J. M., ... Sellers, T. A. (2011). Inherited Variants in Mitochondrial Biogenesis Genes May Influence Epithelial Ovarian Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 20(6), 1131–1145. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-1224>
- Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Scapulatempo, C., Ferreira, L., Martins, S., Pellerin, L., ... Baltazar, F. (2008). Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Archiv*, 452(2), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0558-5>
- Pinheiro, C., Reis, R. M., Ricardo, S., Longatto-Filho, A., Schmitt, F., & Baltazar, F. (2010). Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 427694. <https://doi.org/10.1155/2010/427694>
- Rathmell, J. C., Fox, C. J., Plas, D. R., Hammerman, P. S., Cinalli, R. M., & Thompson, C. B. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7315–7328. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7315-7328.2003>
- Reinsalu, L., Puurand, M., Chekulayev, V., Miller, S., Shevchuk, I., Tepp, K., ... 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>
- Robey, R. B., & Hay, N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene*, 25(34), 4683–4696. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209595>
- Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2009). Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 221(3), 552–559. <https://doi.org/10.1002/jcp.21885>
- Sanli, T., Storozhuk, Y., Linher-Melville, K., Bristow, R. G., Laderout, K., Viollet, B., ... Tsakiridis, T. (2012). Ionizing radiation regulates the expression of AMP-activated protein kinase (AMPK) in epithelial cancer cells: modulation of cellular signals regulating cell cycle and survival. *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 102(3), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.11.014>
- Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., & Wallimann, T. (2006). Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1762(2), 164–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2005.09.004>
- Shaukat, A., Kaltenbach, T., Dominitz, J. A., Robertson, D. J., Anderson, J. C., Cruise, M., ... Rex, D. K. (2020). Endoscopic Recognition and Management Strategies for Malignant Colorectal Polyps: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 159(5), 1916–1934.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.08.050>
- Shoshan-Barmatz, V., Ben-Hail, D., Admoni, L., Krelin, Y., & Tripathi, S. S. (2015). The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10, Part B), 2547–2575. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.040>
- Shussman, N., & Wexner, S. D. (2014). Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology Report*, 2(1), 1–15. <https://doi.org/10.1093/gastro/got041>
- SIEKVITZ, P., & POTTER, V. R. (1955). Biochemical structure of mitochondria. I. Intra-mitochondrial

- components and oxidative phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 215(1), 221–235.
- Simula, L., Nazio, F., & Campello, S. (2017). The mitochondrial dynamics in cancer and immune-surveillance. *Seminars in Cancer Biology*, 47, 29–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcaner.2017.06.007>
- Slattery, M. L., Herrick, J. S., Lundgreen, A., Fitzpatrick, F. A., Curtin, K., & Wolff, R. K. (2010). Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. *Carcinogenesis*, 31(9), 1604–1611. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq142>
- Sonneaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., ... Dewhirst, M. W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3930–3942. <https://doi.org/10.1172/JCI36843>
- Tan, A. S., Baty, J. W., & Berridge, M. V. (2014). The role of mitochondrial electron transport in tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(4), 1454–1463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.016>
- Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., ... Berridge, M. V. (2015). Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metabolism*, 21(1), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.003>
- Untergasser, A. (2008). RNAprep - Trizol combined with Columns. *Untergasser's Lab*.
- van der Bliek, A. M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2017). Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics*, 207(3), 843–871. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300262>
- Vogel, R., Nijtmans, L., Ugalde, C., van den Heuvel, L., & Smeitink, J. (2004). Complex I assembly: a puzzling problem. *Current Opinion in Neurology*, 17(2).
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., ... Bos, J. L. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- 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>
- Wagner, A. J., Remillard, S. P., Zhang, Y.-X., Doyle, L. A., George, S., & Hornick, J. L. (2013). Loss of expression of SDHA predicts SDHA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Modern Pathology*, 26(2), 289–294. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.153>
- Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfør, K., Rofstad, E. K., & Mueller-Klieser, W. (2000). High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence, and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers1. *Cancer Research*, 60(4), 916–921.
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(10), 685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>
- Wang, Y.-N., Lu, Y.-X., Liu, J., Jin, Y., Bi, H.-C., Zhao, Q., ... Wang, F. (2020). AMPK α 1 confers survival advantage of colorectal cancer cells under metabolic stress by promoting redox balance through the regulation of glutathione reductase phosphorylation. *Oncogene*, 39(3), 637–650. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1004-2>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
- Warburg, Otto. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309–314.
- Wolfbeis, O. S. (2015). Luminescent sensing and imaging of oxygen: Fierce competition to the Clark electrode. *BioEssays*, 37(8), 921–928. <https://doi.org/10.1002/bies.201500002>
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., ... Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology : CB*, 13(22), 2004–2008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031>
- Xu, R., Yang, Y., & Zheng, X. (2021). Unique structural features of the adenylate kinase hCINAP/AK6 and its multifaceted functions in carcinogenesis and tumor progression. *FEBS Letters*, 595(16), 2071–2084. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14158>

- Xu, R., Yu, S., Zhu, D., Huang, X., Xu, Y., Lao, Y., ... Zheng, X. (2019). hCINAP regulates the DNA-damage response and mediates the resistance of acute myelocytic leukemia cells to therapy. *Nature Communications*, 10(1), 3812. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11795-5>
- Yan, Y.-B. (2016). Creatine kinase in cell cycle regulation and cancer. *Amino Acids*, 48(8), 1775–1784. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2217-0>
- Yeh, J. J., Lunetta, K. L., van Orsouw, N. J., Moore, F. D., Mutter, G. L., Vijg, J., ... Eng, C. (2000). Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene*, 19(16), 2060–2066. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203537>
- Zhang, J., Hu, H., Mu, T., Wang, W., Yu, B., Guo, J., ... Xin, G. (2020). Correlation Analysis between AK1 mRNA Expression and Inosine Monophosphate Deposition in Jingyuan Chickens. *Animals*, Kd 10. <https://doi.org/10.3390/ani10030439>

Lihtlitsents lõputöö reproduutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Betty Abel,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Kolorektaalvähi arengut soodustavad ümberkorraldused energiametabolismis“,

mille juhendaja on Leenu Reinsalu,

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

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

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

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

01.06.2022

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