



**GLÜKOLÜÜSIS OSALEVAD VÕTMEENSÜÜMID SOOLEVÄHI KLIINILISES  
MATERJALIS JA RAKUKULTUURIS**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Jaanika Annuk

Üliõpilaskood: 213025LAAB

Juhendaja: Sten Miller, 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: Jaanika Annuk  
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.  
Juhendaja: Sten Miller  
[allkiri ja kuupäev]



**KEY ENZYMES INVOLVED IN GLYCOLYSIS IN CLINICAL MATERIAL AND CELL  
CULTURE OF COLORECTAL CANCER**

Bachelor thesis

Student: Jaanika Annuk

Üliõpilaskood: 213025LAAB

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

Study program: Applied Chemistry and Gene Technology

# Sisukord

Sissejuhatus .....	5
Kasutatud lühendid .....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Vähhkasvaja üldised omadused .....	7
1.1.1 Soolevähi iseloomustus .....	7
1.2 Metaboolne ümberprogrammeerimine.....	8
1.2.1 Energia tootmine rakus.....	8
1.2.2 Warburgi efekt.....	9
1.2.3 Heksokinaas .....	11
1.2.4 Laktaat dehüdrogenaas .....	11
2. Töö eesmärgid .....	12
3. Eksperimentaalne osa.....	13
3.1 Uuritav materjal .....	13
3.1.1 Rakkude kultiveerimine .....	13
3.1.2 Rakkude loendamine .....	13
3.2 Geeniekspressiooni mõõtmine .....	13
3.2.1 RNA eraldus .....	13
3.2.2 cDNA süntees.....	13
3.2.3 Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon.....	14
3.3 Ensüümkinetika mõõtmine .....	14
3.3.1 Proovide ettevalmistamine.....	14
3.3.2 Kinetika analüüs.....	14
3.3.3 Valgu kontsentratsiooni mõõtmine .....	14
3.4 Andmeanalüüs.....	15
4. Tulemused ja arutelu .....	16
4.1 Muutused glükolüüsi alguses .....	16
4.1.1 Geeniekspressioonid.....	16
4.1.2 Ensüümaktiivsused .....	17
4.2 Muutused glükolüüsi lõpus .....	20
4.2.1 Geeniekspressioonid.....	20
4.2.2 Ensüümaktiivsused .....	21
Kokkuvõte .....	23
Abstract .....	24
Tänuavaldused.....	25
Kasutatud kirjandus.....	26
Lisad .....	34
1. Lihtlitsents .....	34

## Sissejuhatus

Kolorektaalvähk ehk soolevähk on soole eri osades arenev pahaloomuline kasvaja. Soolevähk on üks kõige levinumaid vähivorme ja ühtlasi ka maailma teine peamine vähisurmade põhjustaja. Enamuses surmajuhtumitest on vähkkasvaja metastaseerunud ning ei allu ravile. Kõrge suremuse tõttu on suur nõudlus uute ravimeetodite vastu.

Pahaloomulist kasvajat eristab tavakoest selle võime lõpmatult kasvada ja kanduda üle ümbritsevasse kudedesse. Kontrollimatuks vohamiseks peab rakkudel olema seda soodustav energiametabolism. Normaalsetes rakkudes toimub glükolüüs põhiliselt hapnikuvaestes tingimustes, aga Warburgi efekti kohaselt eelistavad vähirakud aeroobsetes tingimustes glükolüüsi. On oluline uurida glükolüüsis osalevaid ensüüme, kuna need viivad läbi energiametabolismi protsesse. Ensüümikineetika abil saab määrata ensüümaktiivsusi, mis on vähis erinevad tervest koest.

Töö teoreetilises osas kirjeldatakse kolorektaalvähi üldomadusi ja iseloomustatakse soolevähi arengut. Tutvustatakse ka metaboolset reprogrammeerimist ja energia tootmist rakus. Seejärel iseloomustatakse uuritavaid glükolüüsis osalevaid ensüüme, milleks on heksokinaasid ja laktaat dehüdrogenaas, ja nende seost vähiga. Lõpuks kirjeldatakse ka Warburgi efekti ehk aeroobset glükolüüsi ning selle tekkemehhanisme pahaloomuliste kasvajate rakkudes. Töö eksperimentaalses osas näidatakse glükolüüsis oluliste ensüümide kineetikat. Lisaks sellele tuuakse välja ka energia tootmises ja energia transportimises oluliste geenide ekspressioonitasemeid vähikoes mida mõõdeti reaalaja kvantitatiivse pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni meetodil. Kõiki saadud tulemusi võrreldakse normaalse soole koega ja CaCo-2 rakkudega.

Antud töö käigus selgus, et inimese soolevähikoes võib olla ülesreguleeritud LDH aktiivsus. Kuid tulemused ei näidanud kindlaid suuri erinevusi glükoosi metabolismi ja metaboolse reprogrammeerimise muudes aspektides. Suuremas osas tulemustes ei esine statistiliselt olulist erinevust, sest kõrge heterogeensusega kliinilist materjali uurides on vaja kasutada rohkemat proovide kogust.

## Kasutatud lühendid

ADP – adensiindifosfaat

ATP – adensiinrifosfaat

cDNA – komplementaarne DNA

DTT – dithiothreitol

EDTA - etüleendiamiintetraädikhape

EGTA – etüleenglükool-bis( $\beta$ -aminoetüleeter)-N,N,N',N''-tetraädikhape

G6P – glükoos-6-fosfaat

HEPES – 4-(2-hüdroksüetüül)piperasiin-1-etaansulfoonhape

HK – heksokinaas

$K_m$  – Michaelis-Menteni konstant

LDH – laktaat dehüdrogenaas

LDHA – laktaat dehüdrogenaas A

MCT – monokarboksülaadi transporter

MOM – mitokondri välismembraan

MOPS – 3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape

NADH – Nikotiinamiid adeniin dinukleotiidi redutseeritud vorm

$NAD^+$  – Nikotiinamiid adeniin dinukleotiidi oksüdeeritud vorm

OXPHOS – oksüdatiivne fosforüleerimine

PMSF – fenüülmetüülsulfonüül fluoriid

qRT-PCR – reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon

TCA tsükkel – tsitraaditsükkel

VDAC – pingest sõltuvad anioonkanalid

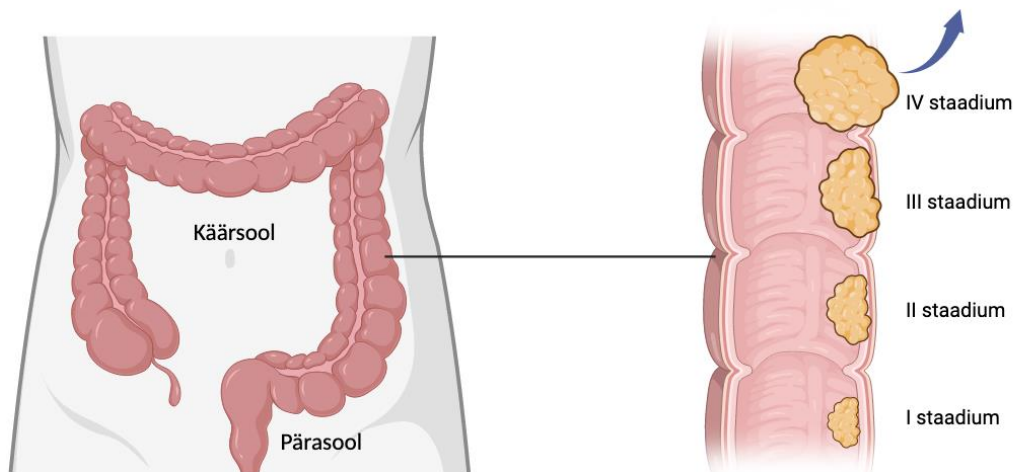
# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Vähhkasvaja üldised omadused

Vähk on keeruline ja mitmepalgeline haigus, millele on iseloomulik rakkude kontrollimatu proliferatsioon ning häiritud homoöstaas, mis on tingitud vastavate reguleerivate radade muudatustest. Inimorganismist on avastatud üle 100 erinevat tüüpi vähhkasvajaid, mida iseloomustab kontrollimatu rakutsükkel. Hanahan ja Weinberg on välja pakkunud vähi ja selle rakkude kontrollimatu paljunemise iseloomustamiseks 14 põhiomadust (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011). Need tunnused 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, polümorfsed mikrobioomid ning vananevad rakud. Antud töös keskendutakse soolevähi metaboolsele ümberprogrammeerimisele, mis puudutab glükolüüsi.

### 1.1.1 Soolevähi iseloomustus

Soolevähk ehk kolorektaalvähk on pahaloomuline kasvaja, mis algab käärsoole või pärasoole piirkonnast. Kolorektaalvähk areneb tavaliselt välja soole limaskestast polüüpidest (Bujanda et al., 2010) ning progresseerub läbides staadiumeid I kuni IV (Joonis 1), alates vähist, mis piirdub limaskestast ja lihaskihiga ning lõpetades metastaseerumisega kaugematesse organitesse (Weiser, 2018). Soolevähk on maailmas kolmas kõige levinum ja maailma teine suurim vähisurmade põhjustaja (Sung et al., 2021). Enamik surmajuhtumeid on tingitud metastaseerunud kasvajatest (Pretzsch et al., 2019). Eestis registreeriti 2022 aastal 457 surmajuhtumit seoses kolorektaalvähiga (Tervise Arengu Instituut, 2023). Kasvaja pahaloomulise arengu riskifaktoriteks on elustiil, vanus ja geneetilised haigused (Brenner, Kloor, & Pox, 2014). Vähi raviks kasutatavad ravimeetodid võivad hõlmata kombinatsioone operatsioonist keemiaravist ja kiiritusravist. Hiljutised uuringud näitavad, et rakumetabolismi mõjutamine võiks tulla uueks kolorektaalvähi ravivõimaluseks (La Vecchia & Sebastián, 2020).



**Joonis 1.** Jämesoole piirkonnad, kus soolevähk võib paikneda ja vähi arenguetaapid. Soolevähil on neli staadiumit (I-IV). I staadiumis tungib tuumor limaskestast ja lihaskihti. II staadiumis on vähk kasvanud või kinnitunud teistesse organitesse. III staadiumis on vähk levinud lümfisõlmedesse. IV staadiumis on vähk metastaseerunud kaugematesse organitesse (Amin, 2017). Loodud BioRender.com vahendusel.

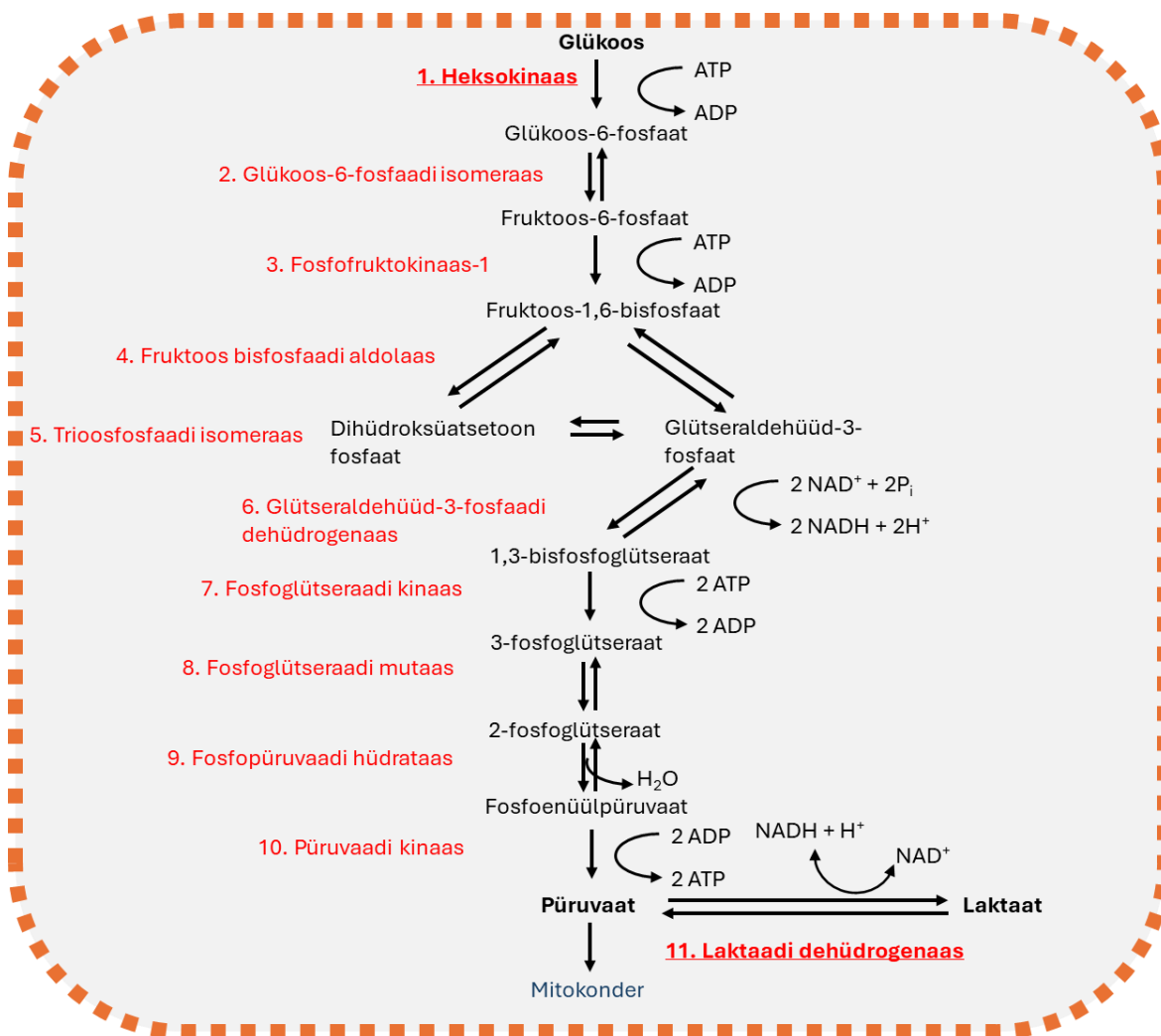
## 1.2 Metaboolne ümberprogrammeerimine

Kasvajatele on iseloomulik suurenenud energiavajadus, mis tuleneb nende kiirest kasvust ja kontrollimatust rakkude proliferatsioonist. Kuna vähirakud võrreldes tervete rakkudega on ümbritsetud teistsuguse mikrokeskkonnaga võib energia tootmiseks vajaliku hapniku ja toitainete kättesaamine olla keerukas. Sellise olukorraga toimetulekuks ning piisava energiahulga tagamiseks rakuliste protsesside läbiviimiseks toimuvad vähirakkudes energiametabolismi ümberkorraldused (De Berardinis & Chandel, 2016; Hanahan & Weinberg, 2011). Seda nähtust nimetatakse kokkuvõtvalt energiametabolismi ümberprogrammeerimiseks ning uurimustööd on näidanud, et selline energia tootmise regulatsioon on mängib olulist rolli nii kasvaja tekkel kui ka arenemisel ning lisaks võib ka toetada invasiivust kui ka metastaseerumist teistesse organitesse ja kudedesse (Faubert et al., 2020; Yoshida, 2015).

### 1.2.1 Energia tootmine rakus

Imetaja rakkudes on glükoos peamine energia- ja süsinikuallikas. Glükoos saab adenosiin trifosfaadiks (ATP) läbi glükolüüsi, tsitraaditsükli (TCA tsükkel) ja viimaks oksüdatiivse fosforüleerimise (OXPHOS). (Bonora et al., 2012). Energia tootmise esimene etapp algab raku tsütoplasmas glükolüüsiga, kus glükoos muudetakse hapniku juuresolekul püruvaadiks ning hapniku puudumisel muudetakse püruvaat laktaadiks. Glükolüütilist rada mõjutavad 10 erinevat ensüümi ja selle netosaagis on 2 ATP molekuli. Hapniku puudumisel redutseeritakse püruvaat NADH ja laktaadi dehüdrogenaasi (LDH) vahendusel laktaadiks (Joonis 2.) (Pavlova, Zhu, & Thompson, 2022). Hapniku juuresolekul selliseid protsesse võib täheldada erütrotsüütides, millel puuduvad mitokondrid ning vähirakkudes, millele esimesena Otto Warburg tähelepanu pööras (Bonora et al., 2012; O Warburg, Wind, & Negelein, 1927).





**Joonis 2.** Glükolüüs on raku energiatootmise esimene etapp, kus tsütoplasmas glükoos läbi 10 erineva ensüümi vahendusel muudetakse püruvaadiks, mis hapniku juuresolekul diffundeerub mitokondrisse. Hapniku puudumisel muudetakse püruvaat laktaadi dehüdrogenaasi vahendusel laktaadiks.

### 1.2.2 Warburgi efekt

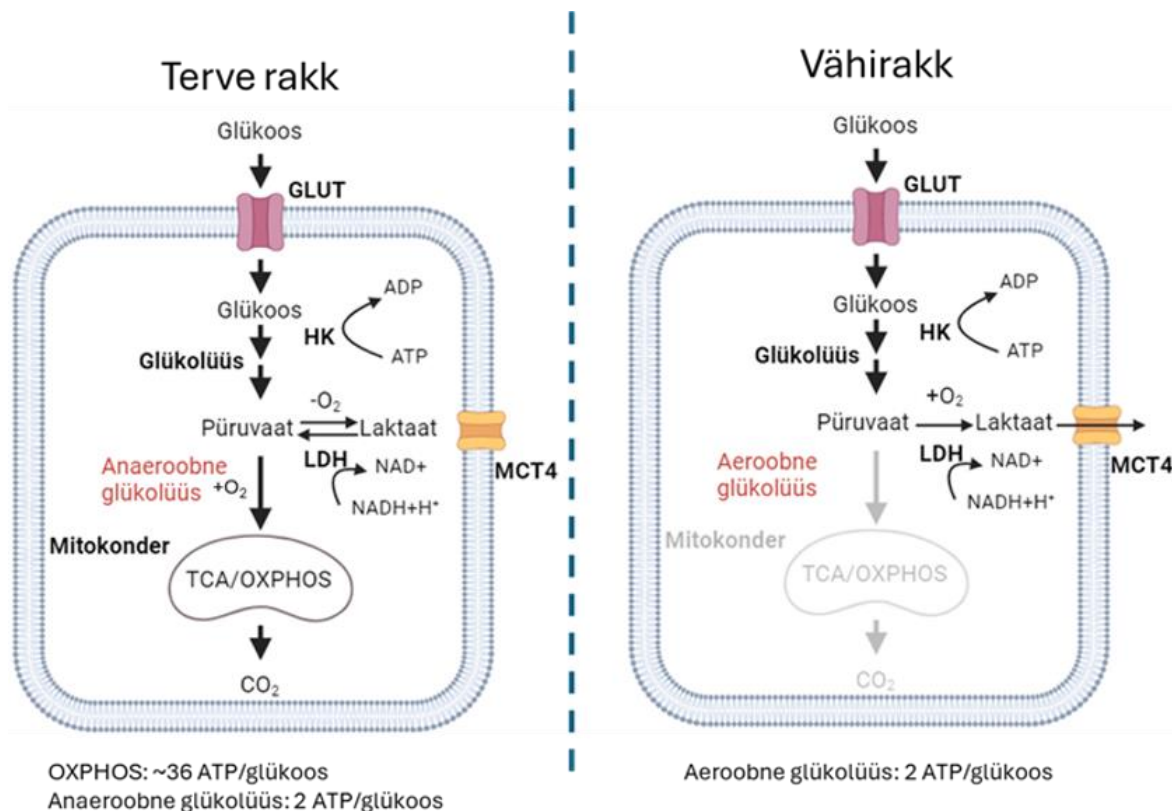
Vähirakkudes esinevat nähtust, mille puhul rakud eelistavad glükolüüsi energia saamiseks isegi piisava hapniku juures, kirjeldati esimest korda Otto Warburgi poolt (Warburg et al., 1927). Warburgi teooria kohaselt enamus vähirakke kasutavad energiametabolismis glükolüüsi, millele järgneb piimhappe fermenteerimine tsütosoolis, isegi juhul, kui hapnikut on piisavalt. Normaalsed rakud toodavad ATP-d läbi glükolüüsi, millele järgneb TCA tsüklil ja OXPHOS (Joonis 3) (Warburg, 1956; Warburg et al., 1927). Anaeroobne glükolüüs on ligikaudu 18 korda vähem efektiivne kui OXPHOS ATP tootmisel (Campbell, 1993). Proliferatsioonile kalduvatele rakkudele on see kasulik, kuna tollega suureneb metaboliitide teke. Neid saab kasutada biosünteesilistes radades, sealhulgas ka nukleosiide ja aminohappeid sünteesivatesse radades, edendades seeläbi uute rakkude koostamiseks vajalike makromolekulide ja organellide biosünteesi (Deberardinis et al., 2008; Heiden & Cantley et al., 2009; Hsu & Sabatini, 2008;).

Glükolüüsi toimimiseks vajaliku glükoosi transpordivad rakku läbi plasmamembraani glükoosi transporterid (GLUT). Inimkehas esineb 14 tüüpi GLUT valke (GLUT1-GLUT14). GLUT1 isovorm

ekspresseerub tugevalt erinevat tüüpi kasvajakudedes ja on seotud halva elulemusega (Zhang et al, 2020; Li et al., 2020).

Monokarboksülaadi transporterid (MCT) ülesandeks on juhtida rakust välja glükolüüsi läbinud laktaati (Halestrap, 2012; Pavlova et al., 2022). Uuringute käigus leiti, et vähis ülesreguleeritakse MCT 1, 2 ja 4 isovorme (Leu et al., 2021; Pértega-Gomes et al., 2012). Üleekspresseerunud MCT on seotud kasvaja levimise ja metastaseerumisega kolorektaalvähis (Ganapathy-Kanniappan & Geschwind, 2013; Nakayama et al., 2012; Pinheiro et al., 2008).

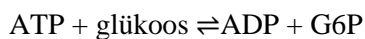
Warburg pakkus välja, et glükolüüs aeroobsetes tingimustes toimub mitokondrilise OXPHOS-i kahjustuse tõttu, ning see ongi vähi tekkepõhjuseks (Warburg, 1956). OXPHOS on peamine eukarüootsete rakkude energiaallikas ja tekitab rohkem ATP-d kui glükolüüs. On selgunud, et glükolüüs on paljudes kasvajates ülesreguleeritud ilma mitokondriaalse kahjustusteta (Hayashi et al., 1992; Lim et al., 2011; Viale et al., 2014). Tänapäeval arvatakse, et kasvaja pahaloomulikuks transformeerumise ajendiks on onkogeenide ja tuumor supressor geenide mutatsioonid ning Warburgi efekt on nende muudatuste tagajärjeks (Bertram, 2000; Grandér, 1998).



**Joonis 3.** Warburgi efekti kohaselt liigub terves rakus glükoos raku läbi plasmamembraani GLUT vahendusel, kus koheselt fosforüleeritakse heksokinaasi poolt glükoos-6-fosfaadiks, kasutades ära ATP fosfaatrühma. Seejärel lõppedes püruvaadi täieliku oksüdeerimisega hapniku olemasoluga CO<sub>2</sub>-ks läbi tsitraaditsükli ja OXPHOS-i andes kokku ligikaudu 36 ATP molekuli. Hapniku puudumisel tekkinud laktaati saab kas väljutada, või tagasi transportida MCT4 vahendusel ning läbi LDH uuesti püruvaadiks muundada. Vähirakud muundavad enamus glükoosi laktaadiks olenemata hapniku kättesaadavusest (Warburgi efekt). Sedasi suunavad nad glükoosi metaboliite energia tootmiselt anaboolsetele protsessidele, kiirendades proliferatsiooni, ning andes vaid 2 molekuli ATP-d. (Marie & Shinjo, 2011). Loodud BioRender.com vahendusel.

### 1.2.3 Heksokinaas

Heksokinaas (HK) on glükolüüsis osalev ensüüm, mis katalüüsib rakkudes glükolüüsi esimest etappi. Reaktsiooni käigus fosforüülib HK glükoosi glükoos-6-fosfaadiks (G6P) pakkudes glükolüütilise protsessi käivitamiseks piisavalt aktiveerimisenergiat. Reaktsiooni valem on:

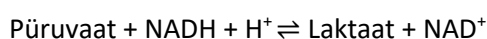


Rakkudes esineval HK-l on viis erinevat struktuurivormi. HK1, HKDC1 ja HK2 asuvad põhiliselt mitokondri välimembraanil (MOM), HK3 perinukleaarses ruumis ja HK4 raku tsütosoolis (Mathupala et al., 2009; Wilson, 2003; Zapater et al., 2021). HK1, HK2, ja HKDC1 saavad seonduda pingest sõltuvad anioonikanalidele (VDAC) mitokondrites (Krasnov et al., 2013). VDAC-id ekspordivad ATP-d mitokondritest tsütosooli, suurendades seega HK1- ja HK2-katalüüsitud reaktsioone. G-6-P seondub suurtes kontsentratsioonides HK1 ja HK2-ga, põhjustades konformatsioonilisi muutusi, dissotsieerumist mitokondrite välismembraanist ja glükolüüsi inhibeerimist (Robey & Hay, 2006).

Üleekspressioneeritud HK2 seondumine VDAC-le soodustab Warburgi efekti ja seega ka kasvaja rakkude metabolismi (Bustamante & Pedersen, 1977; Pedersen, 2007). Et hoiduda inhibeerimisest HK2 reaktsiooni produkti G6P poolt, seondub ensüüm tavaliselt MOM-il VDAC1 isovormiga (Pedersen, 2007; Reinsalu et al., 2021). VDAC1 on rakutsükli ja apoptoosi reguleeriv ning  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi, metaboliitide, ionide ja signaalmolekulide mitokondritesse ja välja liikumist kontrolliv valk (Shoshan-Barmatz et al., 2017). HK1 või HK2 seondumine VDAC1-ga on vähirakule kasulik, kuna see võimaldab kõrgema läbilaskvuse MOM-i adeniinnukleotiididele, suurendab aeroobset glükolüüsi, tagab suurema resistentsuse apoptoosile ja pakub kaitset oksüdatiivse stressi eest. 3-bromopüruvaat, millel on vähivastane toime, takistab VDAC ja HK vahelisi interaktsioone (Reinsalu et al., 2021; Shoshan-Barmatz et al., 2017).

### 1.2.4 Laktaat dehüdrogenaas

Laktaat dehüdrogenaas (LDH) katalüüsib glükolüüsi viimast etappi ehk püruvaadi muutmist laktaadiks. Reaktsioon kulgeb järgmiselt:



LDH-l on kaks subühikut: LDHA ja LDHB. LDH-l on viis erinevat isovormi: LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 JA LDH5, mis koosnevad varieeruvatest LDHA ja LDHB kombinatsioonidest. LDH paikneb tavaliselt tsütoplasmas, kuid ensüümi esineb ka mitokondris L-laktaat dehüdrogenaasina (Reddy & Shukla, 2000; Brooks et al., 1999; Passarella & Schurr, 2018). LDHA ebatavaline ekspresseerumine on seotud mitmete vähkkasvajate tekkega (Sheng et al., 2012; Le et al., 2010; Fantin, St-Pierre & Leder, 2006). LDHA hüperaktiivsus soodustab pahaloomuliste kasvajate proliferatsiooni ja rakkude ellujäämist; vähi invasiivsust ja metastaseerumist; võib vallandada angioneesi ja võib aidata vähirakkudel vältida immuunsüsteemi (Feng et al., 2018).

## 2. Töö eesmärgid

Tänase päeva seisuga on vähi, sealhulgas ka soolevähi, glükolüüsi ensüüme uuritud suuresti koekultuuride peal. Vaatamata sellele, et koekultuuridel tehtud uuringud annavad tulemusi ning uusi teadmisi, ei suuda kontrollitud keskkonnas ja tingimustes kasvatatud rakud anda ülevaadet sellest, mis toimub inimese sees. Kuna inimorganismis toimuvad muutused terve elu vältel vastavalt erinevatele tingimustele, on ka patsiendilt saadud kliiniline materjal väga heterogeenne. Suures plaanis tähendab see seda, et läbi on vaja viia suur hulk katseid, mis lõpptulemusena annaksid selgemaid vastuseid ning korrelatsioone. Kuid enne suuremahuliste katseteni jõudmist on vaja välja selgitada kui suurel määral on toimunud muutusi glükolüüsi rajas, ning selleks sai valitud glükolüüsi võtmeensüümideks HK ehk glükolüüsi alguse ning LDH ehk glükolüüsi lõppu mõjutava ensüümi. Sellest tulenevad ka töö järgnevad eesmärgid:

1. Mõõta ning võrrelda HK ja LDH ensüümaktiivsusi soolevähi kliinilise materjali vähis ja kontrollkoes ning Caco-2 koekultuuri vahel.
2. Määrata ning võrrelda glükolüüsis osalevate HK1, HK2, LDHA ensüümide ning GLUT1 ja MCT4 transportvalkude geeniekspressioone kliinilises materjalis.
3. Kirjeldada erinevusi ja sarnasusi ensüümkineetikas ja geeniekspressioonides kliinilise materjali vähi- ning kontrollkoe vahel ning võrrelda neid koekultuuriga.

### 3. Eksperimentaalne osa

#### 3.1 Uuritav materjal

Töös kasutati patoloogi poolt määratud kolorektaalvähi (T) ja vähita soolekoe (C) proove patsientidelt ja soolevähi rakuliini Caco-2. Katsed on kooskõlastatud Tallinna Meditsiiniuuringute eetikakomitee otsuse nr 558 (uuring nr2183). Kliiniline materjal koguti Põhja-Eesti Regionaalhaigla onkoloogia- ja hematoloogiakliinikust. Proovide transportimiseks kasutati Mitomedium B lahust (0,5 mM EGTA, 3 mM K-Laktobionaat, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM tauriin, 20 mM HEPES, 110 mM sukroos; pH 7,1) (Kaambre et al., 2012), lahusesse oli lisatud BSA (5 mg/ml), DTT (0,5 µM) ja leupeptiin (5 µl). Osa proovimaterjali koguti eraldi RNAlater stabiliseerimislahuses (Qiagen) geeniekspressioonide mõõtmiseks.

##### 3.1.1 Rakkude kultiveerimine

Katsetes kasutati Caco-2 rakke mis saadi American Type Culture Collection-ist (ATCC, number: HTB-37). Rakke kasvatati Petri tassil diameetriga 100 mm kuni 80-90% konfluentsuseni. Kasvatamiseks inkubaatoris seati temperatuuriks 37 °C ning CO<sub>2</sub> kontsentratsiooniks 5%. Söötmena kasutati madala glükoosisaldusega (1,0 g/l) DMEM-i, millele lisati 10% FBS seerumit, 1:100 asendatavaid aminohappeid ja antibiootikume. Lisati gentamütsiini (50 µg/ml), penitsiliini (100 U/ml) ja streptomütsiini (100 µg/ml).

##### 3.1.2 Rakkude loendamine

Kasvatatud rakkude loendamiseks kasutati Bürker-Türk kambrit, mis koosneb 9 suuremast ruudust. Iga ruut on 1 mm<sup>2</sup> ja topeltjoontega jagatud 16 väiksemaks 0,0025 mm<sup>2</sup> ruuduks. Rakud võeti Petri tassilt maha trüpsiiniga. Rakke loendati neljal ruudul, võttes arvesse ainult elusaid, ehk paremal ja üleval asuvaid. Rakkude koguarv lahuses arvutati vastavalt valemile:

$$\left(\frac{\text{rakkude arv}}{\text{ml}}\right) = \left(\frac{\sum \text{rakkude arv 4 ruudul}}{4}\right) \times (\text{lahjendus}) \times 1 \times 10^4$$

#### 3.2 Geeniekspressiooni mõõtmine

##### 3.2.1 RNA eraldus

T ja C proovidest eraldati RNA Untergasseri protokoll (Untergasser, 2008) põhiselt. Koeproove homogeniseeriti Trizoli reagentis (Invitrogen). RNA eraldamiseks kasutati RNeasy Mini Kit-i (Qiagen). RNA loputati läbi RW1 (Qiagen) puhvriga. Proove töödeldi DNase I ja puhvri RDD (Qiagen) lahusega genoomse DNA eemaldamiseks. Kolonni pesti biomolekulidest vabaks RW1 puhvriga ning RW1 soolad peastakse ära RPE puhvriga (Qiagen). RNA elueeriti kolonnist RNase-free veega (Qiagen). Tulemusena saadud RNA kontsentratsioon mõõdeti BioSpec-Nano spektrofotomeetriga (Shimadzu). RNA proovid säilitati -80°C juures.

##### 3.2.2 cDNA süntees

Eraldatud RNA põhjal sünteesiti komplementaarne DNA (cDNA). Sünteesi jaoks kasutati High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-i RNAasi inhibiitoriga (Applied Biosynthesis). Järgiti *kit*-i

tootja protokoll. Valmistati RT Master Mix, mis sisaldas 10x RT puhvrit, 25x desoksünukleotiidide (dNTP) segu, 10x RT Random Primers, MultiScribe pöördtranskriptaasi ja RNase inhibiitorit. Reaktsioon viidi läbi Eppendorf 5332 Mastercycler termotsükleris. Pöördtranskriptsioon toimus 3 etapis: inkubeerimine 25 °C juures 10 minutit, reaktsioon 37 °C juures 120 minutit, inaktiveerimine pöördtranskriptaasiga 85 °C juures 5 minutit. Saadud cDNA lahjendati 30x MQ veega. Proovid säilitati temperatuuril -20 °C.

### **3.2.3 Reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon**

Geenide ekspresioonitasemete määramiseks teostati reaalaja kvantitatiivne pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon (qRT-PCR). qRT-PCR viidi läbi LightCycler 480 II masinal (Roche). Reaktsiooniks kasutati TaqMan Gene Expression Master Mix-i (Applied Biosystems). Geeniekspressiooni tuvastamiseks kasutati FAM märkega TaqMan sonde (Applied Biosystems): aktiin- $\beta$  (Hs01060665\_g1), MCT4 (Hs00358829\_m1), HK1 (Hs00175976\_m1), HK2 (Hs00606086\_m1), GLUT1 (Hs00892681\_m1) ja LDHA (Hs03405707\_g1). Proovid pipeteeriti 384 kaevuga plaadile (Applied Biosystems). Reaktsioonisegu puhtuse kontrollimiseks kasutati negatiivse kontrollina MQ vett. Tulemused normaliseeriti aktiin- $\beta$  suhtes.

## **3.3 Ensüümkinetika mõõtmine**

### **3.3.1 Proovide ettevalmistamine**

Rakkude lõhkumiseks lisati T ja C proovidele või Caco-2 rakkudele lüüsilahust (Tris-HCl, DTT, EDTA, Triton-100x, cOmplete™ proteaasi inhibiitorid (Roche), PMSF) ja kaks 3mm metallkuuli ning asetati need purustamiseks Retsch MM 400 homogenisaatorisse 25-30 Hz juures 2-3 minutiks. Rakud külmutati vedelas lämmastikus ja sulatati üles kolm korda. Membraanijäägid tsentrifugeeriti 21000g juures 10 minutit tuubi põhja ning supernatant koguti analüüsiks.

### **3.3.2 Kinetika analüüs**

Analüüsid viidi läbi Varian Cary Bio 100 spektrofotomeetris 340 nm ja 37°C juures. HK Kinetikat mõõdeti 30, 70, 120, 200, 500 ja 100  $\mu$ M glükoosi kontsentratsiooni juures. Analüüsiks lisati küveti 6  $\mu$ l 100 mM NADP, 10  $\mu$ l 0,2M MgSO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ l 1:10 Glc6PDH, 30  $\mu$ l 0,3M ATP, 100mM või 10mM glükoosi, rakuproovi ja KME lahust (120mM KCl, 20mM MOPS, 0,1M EGTA) 1 ml-ni. Reaktsiooni aktiveerimiseks lisati kõige viimasena ATP ja glükoos kiiresti üksteise järel. Iga proovi jaoks leiti katseliselt optimaalne kogus, millega ensüümkinetikat analüüsida. LDHA kinetikat mõõdeti 50, 100, 200, 300, 500 ja 750  $\mu$ M püruvaadi kontsentratsiooni juures. Küveti lisati 10  $\mu$ l 20mM NADH, proovi, 100  $\mu$ M püruvaati ja KME 1 ml-ni. Reaktsiooni aktiveerimiseks lisati püruvaat kõige viimasena.

### **3.3.3 Valgu kontsentratsiooni mõõtmine**

T ja C proovides ja Caco-2 rakkudes valgu taseme määramiseks kasutati Pierce BCA valgu analüüsi *kit*-i (Thermo Scientific). Standardina kasutati BSA lahuseid. 96 well plate kaevudesse, kuhu oli lisatud BCA tööreagenti, pipeteeriti standardlahused ja valguproovid. Kinni kaetud plaati inkubeeriti 37 °C juures 30 minutit. Neelduvuse mõõtmiseks jahutati plaat toatemperatuurini. Valguse

neeldumist mõõdeti FLUOstar Omega (BMG Labtech) plaadilugejaga 562 nm juures. Valgu kontsentratsioon proovides leiti BSA standardkõveraga.

### 3.4 Andmeanalüüs

Spektrofotomeetrist saadud ensüümatalise katalüüsi kiiruse muutused võeti reaktsioonide alguses ning saadud väärtused arvutati ümber  $\text{nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (valgu kohta) kasutades NADH ekstinktsioonikoefitsenti ( $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ). Saadud väärtused iga substraadi kontsentratsiooni kohta kanti tabelisse ning koostati graafik (hüperbool), millelt arvutati  $V_{\text{max}}$  ja  $K_m$  väärtused kasutades mittelinaarset regressiooni võrrandit (Marin-Hernandez et al., 2006). qRT-PCR-l Saadud geeniekspressiooni tasemed normaliseeriti aktiin- $\beta$  geeni suhtes. Andmete töötlemisel rakendati ANOVA t-testi, kus statistiliselt olulisteks loeti p-väärtusi  $< 0,05$ . Tulemused on esitatud aritmeetilise keskmisena  $\pm$  standardviga (SEM). Andmete analüüsimiseks ja graafikute koostamiseks kasutati programme MS Excel ja SigmaPlot 14.0.

## 4. Tulemused ja arutelu

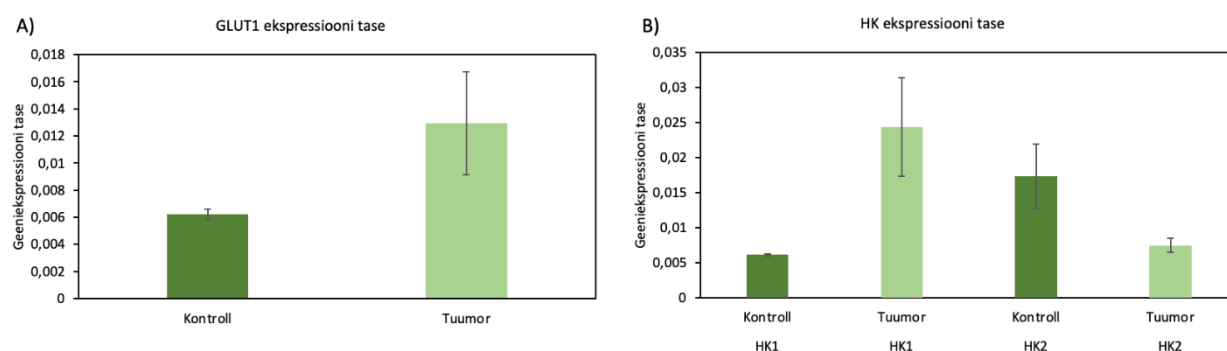
qRT-PCR meetodil mõõdeti glükoosi metabolismis oselavate geenide GLUT1, HK1, HK2, LDHA ja MCT4 ekspressioonitasemed vähikoes (n=9) ja terves soolekoes (n=9).

Glükolüüsi ensüümide LDH ja HK kineetika mõõtmiseks terves soolekoes (n=9), vähikasvaja koes (n=9) ja kultiveeritud Caco-2 rakkudes (n=3) kasutati spektrofotomeetriat ja kvantitatiivset analüüsi. Spektrofotomeetriliselt mõõdetud andmeid kasutati Michaelis-Menteni kõvera koostamiseks. Saadud tulemuste põhjal arutati  $V_{max}$  ja  $K_m$  väärtused.

### 4.1 Muutused glükolüüsi alguses

#### 4.1.1 Geeniekspressioonid

GLUT perekonna valgud vahendavad glükolüüsi kõige esimest etappi - glükoosi transporti rakkudesse läbi rakumembraani. Nende transporterite hulgas esineb GLUT1 kõigis rakkudes, et tagada glükoosi põhiomastamine ja on teadaolevalt kõrgeenenud erinevates patoloogilistes tingimustes (Pragallapati, 2019). Kõige rohkem on seoses vähiga uuritud GLUT1 ja GLUT3 ning on täheldatud nende suurenenud rolli vähi arengus (Ancey et al., 2018). Glükoosi suurenenud tarbimine ei pruugi tingimata viidata glükolüüsi suurenemisele. Heksokinaasidel on oluline roll glükolüüsi reguleerimisel, kasutades ATP-d rakusiseses glükoosi fosforüleerimisel glükoos-6-fosfaadiks (Wilson, 2003).



**Joonis 4.** (A) Glükoositransporter (GLUT1) geeniekspressiooni tasemed soole kontrollkoes (n=9) ja kolorektaalvähi koes (n=9). (B) Heksokinaaside (HK1, HK2) geeniekspressioonide tasemed soole kontrollkoes (n=9) ja kolorektaalvähi koes (n=9). Andmed esitatud keskväärtustena  $\pm$  SEM. Veapostid näitavad standardviga.

Antud töö tulemuste järgi ekspresseerus GLUT1 kliinilise materjali vähikoes umbes kaks korda rohkem kui kontrollkoes, kuigi statistiliselt olulist erinevust välja ei tulnud (joonis 4A), mis siiski viitab vähirakkude suuremale glükoosi tarbimisele. Varasemalt on täheldatud GLUT1 üleekspressiooni ka Caco-2 rakuliinides (Mesonero et al, 1994). Teistes uurimustöodes on pakutud, et GLUT1 võib olla oluline vähimarker, mis annaks kliiniliselt relevantset infot diagnostikas kolorektaalvähi arengu kohta, kuna immunohistokeemilised uuringud viitavad seosele GLUT1 kõrge ekspressioonitaseme ja kasvaja agressivsuse vahel. GLUT1 üleekspressiooni on täheldatud ka soolevähi kehva elulemuse puhul (Haber et al., 1998). GLUT1 viitab kasvaja maliigsusele veel paljudes teistes vähitüüpides, sealhulgas pankrease-, munasarja- ning rinnavähi puhul (Brown & Wahl, 1993; Cantuaria et al., 2000; Yamamoto et al., 1990)

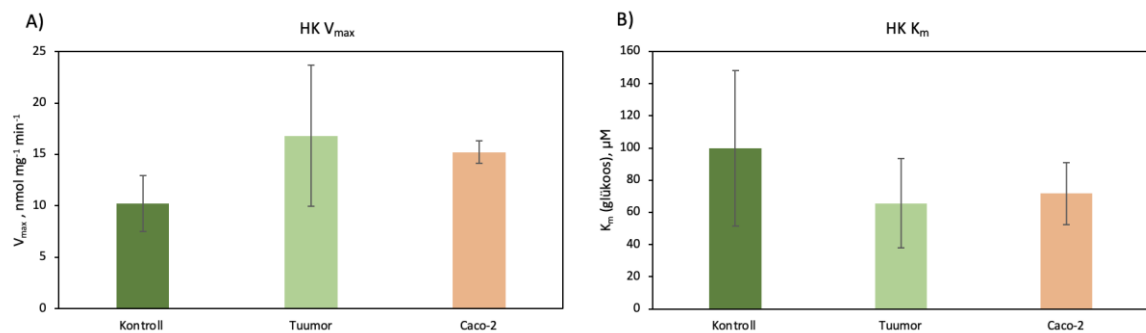


HK1 oli soolevähi koes tunduvalt rohkem ekspresseerunud kui kontrollkoes ning HK2 seevastu kontrollkoes umbes kaks korda rohkem kui kolorektaalvähi koes, seejuures statistiliselt olulist erinevust ei tekkinud (joonis 4B). Teistes uurimustöodes on näidatud, et kolorektaalvähi rakuliinidel on HK2 üleekspresseeritud (Wang et al., 2021), mis antud töö patsientide kolorektaalvähi tulemustega ei samastu. Kirjanduses on vähe andmeid Caco-2 geeniekspressioonide kohta, kuna keerukas on teostada katseid lähedal *in vivo* mudelile, sest antud rakuliinil puuduvad mittevähilised soole koekultuurid võrdluseks. Katsetati Caco-2 rakkudel HK2 regulatsiooni mahasurumist erinevate bakterikultuuridega, kus leiti, et olenemata HK2 maha surumisest ei muutunud glükolüüsi aktiivsus olulisel määral, kuna arvatavasti täidavad katalüüsi ülesandeid teised HK perekonna liikmed, eeskätt HK1 (Hinrichen et al., 2021). Pederseni mudel viitab HK2 ülesregulatsiooniga kõrgelt glükolüütilisele fenotüübile (Bustamante & Pedersen, 1977), kuid antud töö tulemuse järgi võib järeldada, et kolorektaalvähi rakkudes on glükolüüsi rada vähema olulisusega. Seevastu kõrgelt ekspresseerunud HK1 soolevähi koes võrreldes kontrollkoega viitab justkui kõrgemale glükolüütilisele aktiivsusele. Seda toetab ka varasem uurimustöö Chekulayevi poolt, kus üleekspresseeritud HK1-ga kolorektaalvähis mõõdeti kõrgem glükolüütiline aktiivsus kõrgeresolutsiooni oksügraafiaga (Chekulayev et al., 2015). Kuna ekspressioonitulemustes olid suured kõikumised ning statistiliselt olulist erinevust välja ei tulnud oleks otstarbekas tulevikus valimit suurendada, sellisel juhul oleks võimalus ka Pederseni mudeli vastavust kliinilisele materjalile kontrollida.

#### 4.1.2 Ensüümaktiivsused

$V_{max}$  on maksimaalne kiirus, millega ensüüm suudab reaktsiooni katalüüsida ja esineb siis, kui ensüüm on substraadiga küllastunud.  $V_{max}$  näitab, kui tõhusalt muudab ensüüm substraati produktiks.  $K_m$  iseloomustab ensüümi afiinsust substraadi suhtes. Ensüüm, mille  $K_m$  on kõrge, vajab kõrgemat substraadi kontsentratsiooni, et oma maksimaalne kiirus saavutada, ehk on madala afiinsusega. Ensüüm, mille  $K_m$  on madal, vajab väiksemat substraadi kontsentratsiooni, et oma maksimaalne kiirus saavutada, ehk on kõrgema afiinsusega (Cho & Lim, 2018).

HK katalüüsib glükoosi fosforüülimist, muutes selle G6P-ks, ning võtab protsessis ATP fosfaatrühma, mille tulemusel moodustub ADP. Käesoleva töö tulemused näitavad, et terve soolekoe, kasvajakoe ja CaCo-2 rakkude HK maksimaalse reaktsioonikiiruse väärtustes ei esine statistiliselt olulisi erinevusi (Joonis 5A). Kuigi erinevusi ei täheldatud, ilmneb trend, et HK aktiivsus võib olla kõrgem tuumorikoes ( $16.8 \pm 6.9 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) ja Caco-2 rakkudes ( $15.2 \pm 1.2 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) võrreldes terve soolekoega ( $10.2 \pm 2.7 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ).

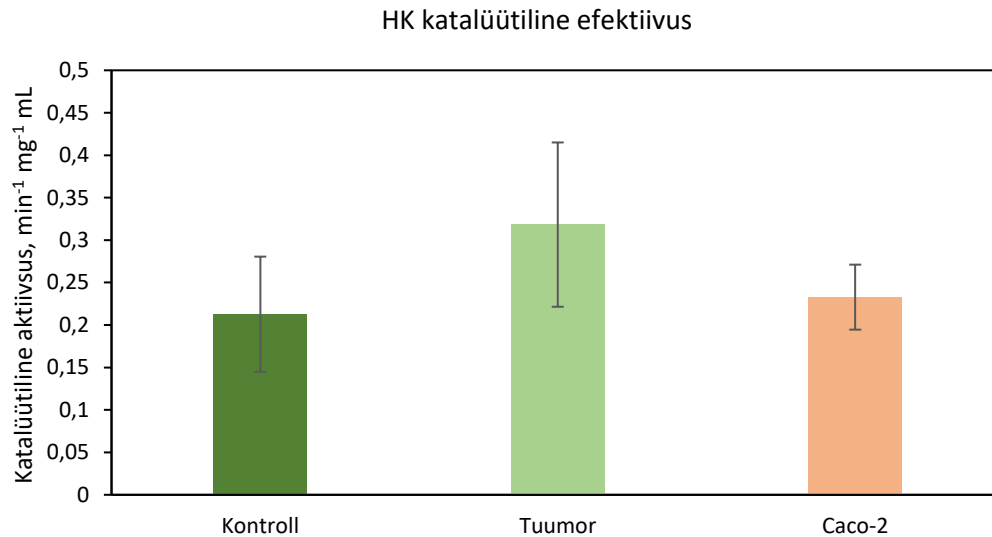


**Joonis 5.** (A) Ensüümi HK  $V_{max}$  terves soolekoes (n=5), vähikoes (n=5) ja Caco-2 rakkudes (n=3). (B) Ensüümi LDH  $K_m$  terves soolekoes (n=5), vähikoes (n=5) ja Caco-2 rakkudes (n=3). Veapostid näitavad standardviga.

Need andmed võivad viidata asjaolule, et kuigi HK  $V_{max}$  ei erine oluliselt, võib vähirakkudes ja Caco-2 rakkudes esineda muutusi HK regulatsioonis või ekspressioonis, mis viib kõrgema ensümaatilise aktiivsuseeni. Vähirakkude ainevahetus on sageli ümber korraldatud, et toetada kiiret kasvumist ja jagunemist, mistõttu võib HK aktiivsus olla suurenenud. Seda kinnitavad ka mõõdetud HK1 ekspressioonid, kus tundus vähikoes täheldatud geeni ekspressioon kõrgem, kui terves soolekoes.

Statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud ka kontrollkoe ( $99,7 \pm 48,3$  (glükoos)  $\mu\text{M}$ ), soolevähi koe ( $65,7 \pm 27,7$  (glükoos)  $\mu\text{M}$ ) ja Caco-2 rakkude ( $71,7 \pm 19,3$  (glükoos)  $\mu\text{M}$ )  $K_m$  väärtuste vahel (Joonis 5B). On näha, et terves soolekoes võib siiski afiinsus substraadi vastu olla madalam, kui vähikoes ja kasvatatud Caco-2 rakkudes. Antud töö sarnaselt ensüümaktiivsust teadaolevalt kliinilisest soolevähi materjalist varem mõõdetud ei ole. Teadusgrupi varasemas töös on mõõdetud HK ensüümaktiivsust vähi kliinilises materjalis, küll aga substraadiga küllastamise meetodil spektrofotomeetris. Leiti, et HK ensüümaktiivsused olid vähikoes ja kontrollkoes peaaegu sama väärtusega, olles pisut kõrgemad kontrollis ning Caco-2 HK aktiivsus antud töö tulemustega lähestikku (Klepinina et al., 2021). Sarnaselt on varem mõõdetud HeLa ja MCF7 rakukultuuride HK aktiivsusi, kus saadi  $V_{max}$  tulemused  $36 \pm 10 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  ja tulemused  $37 \pm 8 \text{ nmol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  HeLa ja MCF7 vastavalt.  $K_m$  mõõdeti vaid HeLa rakkudel mis oli 200 (glükoos)  $\mu\text{M}$  (Marin-Hernandez et al., 2014) ning selle töö mõõtmiste tulemused viitasid sellele, et nii HeLa kui ka MCF7 rakkudel on aktiivsemad HK ensüümid. Selliseid katseid oleks otstarbekas tulevikus rohkem teha saamaks suurema valimi ning väiksema kõikumise.

Ensüümi efektiivsus ( $V_{max}/K_m$ ) on oluline näitaja sellest, kui tõhusalt ensüüm suudab reaktsiooni katalüüsida (Crompton & Waley, 1986; Lewis & Miners, 2013). Selleks arvutatakse ensüümi  $V_{max}$  selle  $K_m$ -i suhtega. Antud uuringus analüüsiti HK efektiivsust, jagades selle  $V_{max}$  väärtuse vastava  $K_m$  väärtusega.



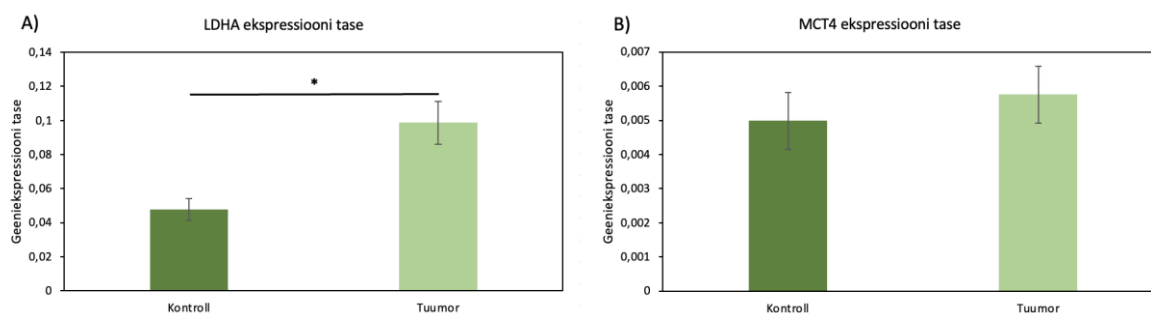
**Joonis 6.** Ensüümi HK katalüütiline efektiivsus terves soolekoes (n=5) , vähikoes (n=5) ja Caco-2 rakkudes (n=3). Veapostid näitavad standarddviiga.

HK katalüütilise efektiivsuse väärtustes statistiliselt olulisi erinevusi ei täheldatud. (Joonis 6). Kuigi erinevused ei olnud statistiliselt olulised, viitavad tulemused siiski võimalusele, et vähikoes võib olla HK katalüüsi efektiivsus pisut suurem. Teadusgrupi varasemas töös on hapnikutarbimisest  $V_{max}$  ja  $K_m$  (ADP) väärtustega arvatud kaudselt OXPPOS-i raja efektiivust, mis viitas sellele, et vähi kliinilises materjalis on antud rada mõnevõrra efektiivsem kui kontrollkoes (Rebane-Klemm et al., 2023). Kui võtta võrdluseks Marín-Hernández-i 2014 aasta uurimustöös mõõdetud HeLa rakkude HK  $V_{max}$ -i, mis viitas aktiivsemale ensüümile, ja  $K_m$ -i, saame tulemuseks  $0.18 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$ , mis viitab sellele, et HeLa rakkude HK katalüüsi efektiivsus näib madalam, kui kõikides mõõdetud proovides.

Kokkuvõttes ilmnesid tulemuste trendides tendentsid, mis viitavad sellele, et vähikoes ( $0,31 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$ ) ja Caco-2 rakkudes ( $0,23 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$ ) on HK efektiivsem kui terves soolekoes ( $0,21 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$ ), kuid antud juhul sarnanes koekultuur efektiivsuse mõttes rohkem kontrollkoele. Kõikumised võivad olla tingitud proovide väikestest valimimahustest (terve soolekude n=5, vähikude n=5 ja Caco-2 rakud n=3), mis võib mõjutada statistilise analüüsi jõudlust ja tundlikkust. Edasised uuringud suurema valimiga on vajalikud, et kinnitada ja täpsustada esialgseid tähelepanekuid.

## 4.2 Muutused glükolüüsi lõpus

### 4.2.1 Geeniekspressioonid



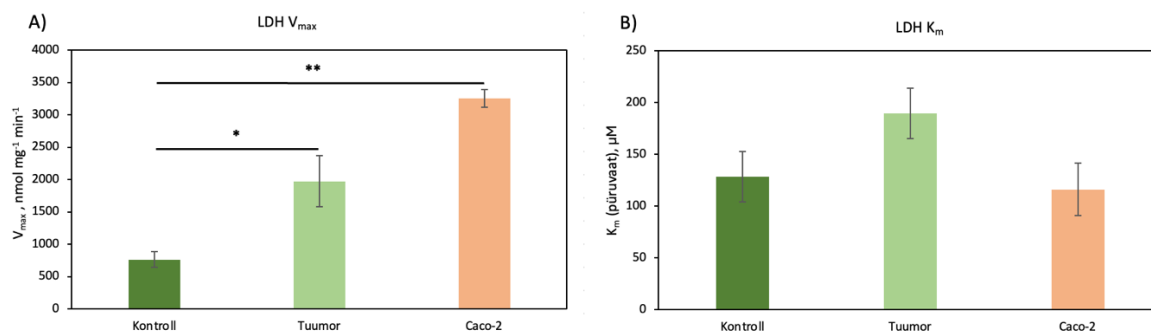
**Joonis 7.** (A) Laktaat dehüdrogenaasi A (LDHA) geeniekspressiooni tasemed soole kontrollkoes (n=9) ja kolorektaalvähi koes (n=9). (B) Monokarboksülaadi transporter 4 (MCT4) geeniekspressioonide tasemed soole kontrollkoes (n=9) ja kolorektaalvähi koes (n=9). Andmed esitatud keskvaärtustena  $\pm$  SEM. Veapostid näitavad standardvigat. \*  $p < 0,05$  (ANOVA).

LDHA ekspresseerub vähikoes umbes kaks korda kõrgemalt kui terves soolekoes ( $p = 0,002$ ) (Joonis 7A). Sellest saab järeldada, et vähikoes on kõrgeenenud laktaadi tootmine ja püruvaat ei suundu OXPHOS-i (Pavlova et al., 2022). Tulemused on kooskõlas kirjandusega, kus on täheldatud suhe vähikasvaja metastaseerumise ja LDHA ekspressiooni vahel, kus laktaat hõlbustab vähirakkude migreerumist ja kasvufaktorite reguleerimist (Koukourakis et al., 2006; Walenta et al., 2000). Koekultuurides on varasemates töodes uuritud Caco-2 LDHA ekspressioonitaseme muutusi, nimelt suruti maha eelmainitud ekspressioonitase RT2 katioonilise peptiidi abil, mis aeglustas vähirakkude moodustumist ja progressiooni, lisaks soodustas ka hävinemist ROS-ide (hapnikku sisaldavad reaktiivsed osakesed) abil (Maijaroen et al., 2022). See annab alust järeldada, et LDHA ekspressioon on ka Caco-2 koekultuurides tähtsal kohal.

MCT4 ekspressioonitasemetes vähikoe ja terve soolekoe vahel statistiliselt oluline erinevus puudub, kuid on näha, et vähikoes on ekspressioon pisut kõrgem (joonis 7B). MCT4 on vähiga seotud fibroblastide tuumorspetsiifiline marker oksüdatiivse stressi puhul (Whitaker-Menezes et al., 2011), seega on oletatud, et ülesekspressioneeritud MCT4-ga normaalsed rakud toodavad metaboolse sümbioosi teel molekule profileeruvate tuumorirakkude jaoks (Curry et al., 2013). Seega saaks teha järeldused, et soolevähk võib kasutada monokarboksülaadi transporterite vahendatud metaboolset plastilisust. Varasemalt on leitud, et Caco-2 koekultuuris ekspresseeruvad peamiselt MCT 1, 3, 4, 5 ja 6, mille hulgast MCT1 on kõige suurema tasemega (Hadjiagapiou et al., 2000). Kuid töö kontekstis on MCT4-l samuti tähtis roll koekultuuris, nimelt on eelnevas uurimustöös MCT4 Caco-2 rakkudes ülesekspressioneeritud ning täheldatud põletikuliste tsütokiinide IL-1 $\beta$  and IL-18 vabanemist. See põhjustas rakkude püroptooosi, andes aluse edasiste põletikuliste protsesside moodustumisele (Wang et al., 2021). Eelnev võib tähendada, et MCT4 liiga kõrge ekspressioon ei pruugi kuigi kasulik soolevähi koekultuurile olla. Kuid on näidatud, et fluoksetiin antidepressant surub muuhulgas ka MCT4 ekspressiooni alla, pärssides seeläbi kasvujarakkude edasist arengut (Kannen et al., 2015).

## 4.2.2 Ensüümaktiivsused

LDH konverteerib laktaati püruvaadiks ja  $\text{NAD}^+$  NADH-ks. Antud töös mõõdetud LDH  $V_{\max}$  on kasvaja koes rohkem kui 2 korda suurem ( $1973,8 \pm 394,5 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ), kui terves soolekoes ( $765,6 \pm 124 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) ( $p = 0,019$ ) ning Caco-2 rakkudes on LDH  $V_{\max}$  ( $3253,6 \pm 137 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ) terve koega võrreldes oluliselt kõrgem (kusjuures  $p < 0,001$ ) (Joonis 8A). See võib viidata suurenenud laktaadi tootmise tõhususele vähikoos.

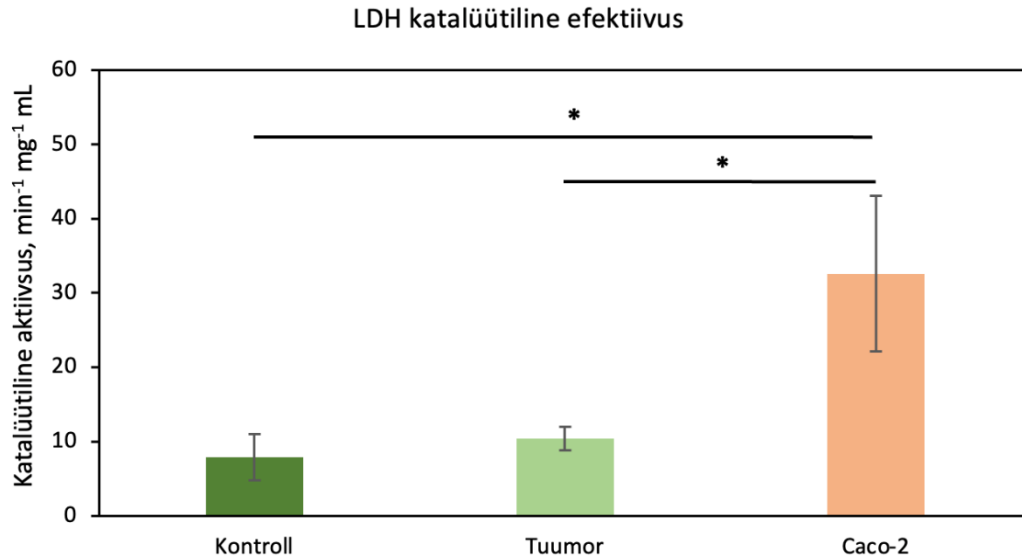


**Joonis 8.** (A) Ensüümi LDH  $V_{\max}$  terves soolekoes ( $n=5$ ), vähikoos ( $n=5$ ) ja Caco-2 rakkudes ( $n=3$ ). (B) Ensüümi LDH  $K_m$  terves soolekoes ( $n=5$ ), vähikoos ( $n=5$ ) ja Caco-2 rakkudes ( $n=3$ ). Veapostid näitavad standarddviaga. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA).

Vaatamata sellele, et LDH  $V_{\max}$ -ide väärtused on kõrgemad nii vähikoos ( $189,8 \pm 24,2$  (püruvaat)  $\mu\text{M}$ ) kui ka rakuliinis ( $116,1 \pm 25,4$  (püruvaat)  $\mu\text{M}$ ), ei esinenud mõõdetud LDH  $K_m$  väärtustes statistiliselt olulisi erinevusi normaalses soolekoes ( $128,7 \pm 24,5$  (püruvaat)  $\mu\text{M}$ ) ning kasvaja koe ja Caco-2 rakkude vahel (Joonis 7B).

Esineva trendi järgi võib arvata, et Caco-2 rakkude afiinsus substraadi vastu võiks olla mõnevõrra suurem kui normaalses soolekoes. Soolevähikoos tundub  $K_m$  väärtus olevat kõrgem kui normaalses soolekoes ja kultiveeritud Caco-2 rakkudes. Sellest võiks järeldada, et inimese vähikoos ei ole energia metabolism kuigi efektiivne. Saadud tulemuste üheks põhjuseks võib olla kliinilise materjali heterogeensus, mis võib soodustada kõikumisi tulemustes. Koekultuuri tulemus on ootuspärasem, kuna rakke on kasvatatud pidevalt kindla protokolliga järgi ning ühtemoodi. Samuti saavad tulemust mõjutada ka posttranslatoorsed muudatused ensüümides (Deribe, 2010). Sarnaselt antud tööle on mõõdetud LDH aktiivsusi rinnavähi kliinilistes proovides, kus leiti, et LDH on oluliselt aktiivsem vähikoos, võrreldes lähedal ümbritseva koega (Radenkovic et al., 2012). Kuigi tegemist on teise vähiliigiga, võib oletada, et soolevähk käitub sarnase mustri järgi, mida antud töö tulemustest ka jälgida saab. On tehtud ka uurimustöö, kus mõõdeti HeLa rakukultuurides LDH ensüümaktiivsust, saades tulemuseks  $V_{\max}$   $1440 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$  ja  $K_m$   $300$  (püruvaat)  $\mu\text{M}$  (Marín-Hernández et al., 2011), mis näitab, et HeLa rakukultuuri ensüümaktiivsus on madalam kui antud töö soolevähi ja Caco-2 kultuuri proovides.

Arvutades LDH katalüütilise efektiivsuse ( $V_{\max}/K_m$ ) selgub, et Caco-2 rakkudes ( $32,6 \pm 10,5 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$ ) on LDH oluliselt efektiivsem võrreldes terve soolekoega ( $7,9 \pm 3,08 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$ ) ( $p = 0,030$ ) ning samuti võrreldes ka soolevähi koega ( $10,4 \pm 1,6 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$ ) (Joonis 9).



**Joonis 9.** Ensüümi LDH katalüütiline efektiivsus terves soolekoes (n=5) , vähikoes (n=5) ja Caco-2 rakkudes (n=3). Veapostid näitavad standarddviga. \*  $p < 0,05$  (ANOVA).

Tuumori koe ja terve soolekoe LDH katalüütilise efektiivsuse vahel pole olulist statistilist erinevust. Saadud  $K_m$  väärtuste põhjal näis, et vähikoes on LDH afiinsus substraadi vastu madalam kui terves koes. Arvutatud katalüütilise efektiivsuse tulemustest on näha, et vähikoes võib see siiski olla mõnevõrra kõrgem, kuna LDHA geen on samuti vähis üleekspressioonitud. LDH katalüütiline aktiivsus on Caco-2 rakkudes ka mitu korda kõrgem, kui vähikoes ( $p = 0,032$ ). Saadud erinevus võib tuleneda inimese kliinilise materjali suurest heterogeensuse ulatusest. Kui kõrvutada Marín-Hernández-i 2011 uurimustöö HeLa LDH  $V_{max}$ -i ja  $K_m$ -i saadud tulemuse  $4.8 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ml}$  antud töö tulemustega, on näha, et HeLa rakkude LDH katalüütiline efektiivsus on madalam võrreldes kõikide kudedega. Võrdlus näitab seda, et ensüümaktiivsused ja efektiivsused võivad erineda suuresti ka eri tüüpi vähkide rakukultuuride vahel.

Üldjuhul olid mõõdetud geeniekspressioonid ja ensüümide aktiivsused omavahel kooskõlas. Kliinilise materjali tulemustes esinesid kõikumised suure heterogeensuse tõttu. Kõikumisi saaks likvideerida viides läbi suure mahus lisauuringuid, et antud töös saadud tulemusi kinnitada. Töö tulemustest saab näha ka selgelt, et soolevähi kliiniline materjal ning koekultuur võivad küllaltki suurel määral erinevalt käituda, mida kinnitab ka analoogiline uurimustöö rinnavähi kliinilise materjali ja koekultuuri näol (Koit et al., 2017).

## Kokkuvõte

Kolorektaalvähk, tuntud ka kui soolevähk, on pahaloomuline kasvaja, mis areneb jämesoole eri osades. See on üks levinumaid ja ühtlasi ka surmavaid vähivorme. Enamik surmajuhtumeid on tingitud metastaseerunud kasvajatest, mis ei allu tavapärastele ravimeetoditele. Kõrge suremuse tõttu on suur vajadus uute ja tõhusamate ravimeetodite järele.

Pahaloomulised kasvajakud arenevad välja soolepolüüpidest ja läbivad eri kasvustaadiumeid. Nad erinevad tavakoest oma võime poolest kasvada piiramatult ja levida ümbritsevasse kudedesse. Kontrollimatu vohamise võimaldamiseks peab vähirakkudes olema seda soodustav energiametabolism, mille oluline osa on glükolüüsirada. Glükolüüsi reguleerivad ensüümide aktiivsust ei ole varaselt uuritud kliinilises materjalis. Sellel põhjusel oli töö eesmärgiks mõõta ja võrrelda Heksokinaasi (HK) ehk glükolüüsi alguse ensüümi aktiivsust ning selle ja protsessiga seotud transporterite geeniekspressioone ja vastavalt ka Laktaat dehüdrogenaasi (LDH) ehk glükolüüsi lõpu ensüümi aktiivsusi ja geeniekspressioone.

Töö tulemused tõid välja, et inimese soolevähikoes võib olla ülesreguleeritud LDH aktiivsus. LDHA ekspresseerus vähikoes kõrgemalt, kui terves soolekoes ja samuti oli LDH ensüümaktiivsus suurem vähikoes ja Caco-2 rakkudes. Kuigi tulemused ei näidanud suuri erinevusi vähikoes ja kontrollkoes HK ensüümi aktiivsuse ning HK1, HK2, GLUT1, MCT4 geenide ekspressioonide vahel, esinesid tulemustes trendid, mis on kooskõlas kirjandusega. Suuremas osas tulemustes ei esine statistiliselt olulist erinevust, sest kliiniline materjal oli kõrge heterogeensusega lisaks on näha ensüümide aktiivsuste alusel, et vähi kliiniline materjal ja koekultuur võivad suuresti erineda.

Edasisel katsetamisel on kliinilist materjali uurides vaja kasutada suuremat proovide valimit. Läbi on vaja viia suur hulk katseid, mis lõpptulemusena annaksid selgemaid vastuseid ning korrelatsioone.

## Abstract

Colorectal cancer, also known as bowel cancer, is a malignant tumor that develops in various parts of the large intestine. It is one of the most common and also one of the deadliest forms of cancer. The majority of fatalities are due to metastasized tumors that do not respond to conventional treatments. The high mortality rate creates a significant need for new and more effective treatment methods.

Malignant tumors develop from intestinal polyps and progress through various growth stages. They differ from normal tissue in their ability to grow indefinitely and invade surrounding tissues. To sustain uncontrolled proliferation, cancer cells must have an active energy metabolism that supports this growth, one crucial part of it being the glycolysis pathway. The regulation of glycolysis by enzyme activity has not been extensively studied in clinical materials. Therefore, the aim of this study was to measure and compare the activity of Hexokinase (HK), the enzyme initiating glycolysis, and the gene expressions of associated transporters, as well as the activity and gene expressions of Lactate Dehydrogenase (LDH), the enzyme concluding glycolysis.

The study results revealed that LDH activity may be upregulated in human colorectal cancer tissue. LDHA was expressed at higher levels in cancerous tissue compared to normal colon tissue, and LDH enzyme activity was also greater in cancerous tissue and Caco-2 cells. Although the results did not show significant differences in HK enzyme activity or the expression of HK1, HK2, GLUT1, and MCT4 genes between cancerous and control tissues, trends observed in the data are consistent with prior studies. The lack of statistically significant differences in most results is attributed to the high heterogeneity of the clinical material, also the results of the given research, regarding enzyme activities, show that colorectal cancer clinical material can differ largely from cell cultures.

Future studies should involve a larger sample size when examining clinical material. A large number of experiments are necessary to obtain clearer answers and correlations in the final results.



## Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Sten Millerit nii eksperimentaalsete tööde kui kirjandusliku töö juhendamise eest. Olen tänulik meie sujuva koostöö üle. Ta oli alati abiks ja piisavalt kannatlik, et leida minu igale murele lahendused.

Samuti soovin tänada Leenu Reinsalut, kes aitas mul geeniekspressioone mõõta ja andis ka kasulikke nõuandeid. Soovin kindlasti tänada KBFi keemilise bioloogia uurimisrühma juhti Tuuli Käämbret ja teisi liikmeid, kes olid mulle abiks. Lisaks tänan ka perekonda ja sõpru, kes alati hoidsid mulle põialt ja tundsid huvi minu tegemiste vastu.

## Kasutatud kirjandus

Amin, Mahul B.; Greene, Frederick L.; Edge, Stephen B.; Compton, Carolyn C.; Gershenwald, Jeffrey E.; Brookland, Robert K.; Meyer, Laura; Gress, Donna M.; Byrd, David R.; Winchester, David P. (2017). "The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 67 (2): 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>

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>

Bertram JS (December 2000). "The molecular biology of cancer". *Molecular Aspects of Medicine*. 21 (6): 167–223. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8)

Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M. R., & 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)

Brooks, G. A., Dubouchaud, H., Brown, M., Sicurello, J. P., & Butz, C. E. (1999). Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1129–1134. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.1129>

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)

Bujanda, L., Cosme, A., Gil, I., & Arenas-Mirave, J. I. (2010). Malignant colorectal polyps. *World journal of gastroenterology*, 16(25), 3103–3111. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i25.3103>

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>

Campbell, P. N. (1993). "Principles of biochemistry second edition, by A L Lehninger, D L Nelson and M M Cox. Pp 1013. Worth, New York. 1993. £30 ISBN 0-87901-500-4." *Biochemical Education* 21(2): 114-114.

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., ... 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>
- Cho, Y. S., & Lim, H. S. (2018). Comparison of various estimation methods for the parameters of Michaelis-Menten equation based on in vitro elimination kinetic simulation data. *Translational and clinical pharmacology*, 26(1), 39–47. <https://doi.org/10.12793/tcp.2018.26.1.39>
- Crompton, I. E., & Waley, S. G. (1986). The determination of specificity constants in enzyme-catalysed reactions. *The Biochemical journal*, 239(1), 221–224. <https://doi.org/10.1042/bj2390221>
- 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>
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
- De Berardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Deribe, Y., Pawson, T. & Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol* 17, 666–672. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1842>
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., & Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer cell*, 9(6), 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>
- Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 368(6487). <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>
- Feng, Y., Xiong, Y., Qiao, T., Li, X., Jia, L., & Han, Y. (2018). Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer medicine*, 7(12), 6124–6136. <https://doi.org/10.1002/cam4.1820>
- 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>
- Grandér D (April 1998). "How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?". *Medical Oncology*. 15 (1): 20–6. <https://doi.org/10.1007/BF02787340>
- 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)

Hadjiagapiou, C., Schmidt, L., Dudeja, P. K., Layden, T. J., & Ramaswamy, K. (2000). Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(4), G775–G780. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.279.4.G775>

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. (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>

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., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation." *Science (New York, N.Y.)* 324(5930): 1029- 1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>

Hinrichsen, F., Hamm, J., Westermann, M., Schröder, L., Shima, K., Mishra, N., Walker, A., Sommer, N., Klischies, K., Prasse, D., Zimmermann, J., Kaiser, S., Bordoni, D., Fazio, A., Marinos, G., Laue, G., Imm, S., Tremaroli, V., Basic, M., Häslner, R., ... Sommer, F. (2021). Microbial regulation of hexokinase 2 links mitochondrial metabolism and cell death in colitis. *Cell metabolism*, 33(12), 2355–2366.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.11.004>

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>

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>

Kannen, V., Garcia, S. B., Silva, W. A., Jr, Gasser, M., Mönch, R., Alho, E. J., Heinsen, H., Scholz, C. J., Friedrich, M., Heinze, K. G., Waaga-Gasser, A. M., & Stopper, H. (2015). Oncostatic effects of fluoxetine in experimental colon cancer models. *Cellular signalling*, 27(9), 1781–1788. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.05.008>

Klepinina, L., Klepinin, A., Truu, L., Chekulayev, V., Vija, H., Kuus, K., Teino, I., Pook, M., Maimets, T., & Kaambre, T. (2021). Colon cancer cell differentiation by sodium butyrate modulates metabolic plasticity of Caco-2 cells via alteration of phosphotransfer network. *PLoS one*, 16(1), e0245348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245348>

Koit, A., Shevchuk, I., Ounpuu, L., Klepinin, A., Chekulayev, V., Timohhina, N., Tepp, K., Puurand, M., Truu, L., Heck, K., Valvere, V., Guzun, R., & 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>

Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Lakunina, V. A., Kirpiy, A. A., & Kudryavtseva, A. V. (2013). Targeting VDAC-bound hexokinase II: a promising approach for concomitant anti-cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(10), 1221–1233. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.833607>

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>

Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., Royer, R. E., Vander Jagt, D. L., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2037–2042. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914433107>

Leu, M., Kitz, J., Pilavakis, Y. *et al.* Monocarboxylate transporter-1 (MCT1) protein expression in head and neck cancer affects clinical outcome. *Sci Rep* 11, 4578 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84019-w>

Lewis, B. C., & Miners, J. O. (2013). Generation, validation, and application of a P450 homology model. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(18), 2233–2240. <https://doi.org/10.2174/15680266113136660156>

Li, C., Chen, Q., Zhou, Y., Niu, Y., Wang, X., Li, X., Zheng, H., Wei, T., Zhao, L., & Gao, H. (2020). S100A2 promotes glycolysis and proliferation via GLUT1 regulation in colorectal cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(10), 13333–13344. <https://doi.org/10.1096/fj.202000555R>

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>

Maijaroen, S., Klaynongsruang, S., Roytrakul, S., Konkchaiyaphum, M., Taemaitree, L., & Jangpromma, N. (2022). An Integrated Proteomics and Bioinformatics Analysis of the Anticancer Properties of RT2 Antimicrobial Peptide on Human Colon Cancer (Caco-2) Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4), 1426. <https://doi.org/10.3390/molecules27041426>

Marie, S. K., & Shinjo, S. M. (2011). Metabolism and brain cancer. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66 Suppl 1(Suppl 1), 33–43. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011001300005>

Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., Rodríguez-Enríquez, S., Encalada, R., Moreno-Sánchez, R., & Saavedra, E. (2011). Modeling cancer glycolysis. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(6), 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.006>

Marín-Hernández, A., López-Ramírez, S. Y., Del Mazo-Monsalvo, I., Gallardo-Pérez, J. C., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., & Saavedra, E. (2014). Modeling cancer glycolysis under hypoglycemia, and the role played by the differential expression of glycolytic isoforms. *The FEBS journal*, 281(15), 3325–3345. <https://doi.org/10.1111/febs.12864>

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, 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>

Mesonero, J., Mahraoui, L., Matosin, M., Rodolosse, A., Rousset, M., & Brot-Laroche, E. (1994). Expression of the hexose transporters GLUT1-GLUT5 and SGLT1 in clones of Caco-2 cells. *Biochemical Society transactions*, 22(3), 681–684. <https://doi.org/10.1042/bst0220681>

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>

Passarella, S., & Schurr, A. (2018). L-Lactate Transport and Metabolism in Mitochondria of Hep G2 Cells-The Cori Cycle Revisited. *Frontiers in oncology*, 8, 120. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00120>

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>

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>

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>

Pragallapati, S., & Manyam, R. (2019). Glucose transporter 1 in health and disease. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 23(3), 443–449. [https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP\\_22\\_18](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_22_18)

Pretzsch, E., Bösch, F., Neumann, J., Ganschow, P., Bazhin, A., Guba, M., Werner, J., & Angele, M. (2019). Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *Journal of oncology*, 2019, 7407190. <https://doi.org/10.1155/2019/7407190>

Pérttega-Gomes, N., Vizcaíno, J. R., Gouveia, C., Jerónimo, C., Henrique, R. M., Lopes, C., & Baltazar, F. (2013). Monocarboxylate transporter 2 (MCT2) as putative biomarker in prostate cancer. *The Prostate*, 73(7), 763–769. <https://doi.org/10.1002/pros.22620>

Radenkovic, S., Milosevic, Z., Konjevic, G., Karadzic, K., Rovcanin, B., Buta, M., Gopcevic, K., & Jurisic, V. (2013). Lactate dehydrogenase, catalase, and superoxide dismutase in tumor tissue of breast cancer patients in respect to mammographic findings. *Cell biochemistry and biophysics*, 66(2), 287–295. <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9482-7>

Rebane-Klemm, E., Reinsalu, L., Puurand, M., Shevchuk, I., Bogovskaja, J., Suurmaa, K., Valvere, V., Moreno-Sanchez, R., & Kaambre, T. (2023). Colorectal polyps increase the glycolytic activity. *Frontiers in oncology*, 13, 1171887. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1171887>

Reddy, M. A., & Shukla, S. D. (2000). Nuclear activation and translocation of mitogen-activated protein kinases modulated by ethanol in embryonic liver cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1497(2), 271–278. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(00)00058-6)

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>

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>

Sheng, S. L., Liu, J. J., Dai, Y. H., Sun, X. G., Xiong, X. P., & Huang, G. (2012). Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *The FEBS journal*, 279(20), 3898–3910. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08748.x>

Shoshan-Barmatz, V., Maldonado, E. N., & Krelín, 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>

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>

Tervise Arengu Instituut. (2023). SD21: Surmad põhjuse, soo ja vanuserühma järgi. [https://statistika.tai.ee/pxweb/et/Andmebaas/Andmebaas\\_\\_01Rahvastik\\_\\_04Surmad/SD21.px/](https://statistika.tai.ee/pxweb/et/Andmebaas/Andmebaas__01Rahvastik__04Surmad/SD21.px/)

- 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](http://www.untergasser.de/lab/protocols/rna_prep_comb_trizol_v1_0.htm)
- Viale, A., Pettazoni, 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>
- 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 Cancers<sup>1</sup>. *Cancer Research*, 60(4), 916–921.
- 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.
- Weiser, M.R. (2018). AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 25, 1454–1455. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6462-1>
- Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Birbe, R. C., Howell, A., Pavlides, S., Gandara, R., Pestell, R. G., Sotgia, F., Philp, N. J., & Lisanti, M. P. (2011). Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(11), 1772–1783. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15659>
- 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>
- Zapater, J. L., Lednovich, K. R., Khan, M. W., Pusec, C. M., & Layden, B. T. (2022). Hexokinase domain-containing protein-1 in metabolic diseases and beyond. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 33(1), 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.10.006>
- Zhang, Z. J., Zhang, Y. H., Qin, X. J., Wang, Y. X., & Fu, J. (2020). Circular RNA circDENND4C facilitates proliferation, migration and glycolysis of colorectal cancer cells through miR-760/GLUT1 axis. *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(5), 2387–2400. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202003\\_20506](https://doi.org/10.26355/eurrev_202003_20506)



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.

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>

# Lisad

## 1. Lihtlitsents

Lisa  
rektori 07.04.2020 käskkirjale nr 1-8/17

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina Jaanika Annuk

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Glükolüüsis osalevad võtmeensüümid soolevähi kliinilises materjalis ja rakukultuuris, mille juhendaja on Sten Miller,

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.

---

\_\_\_\_\_ (kuupäev)

---

<sup>1</sup> 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 kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.