

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Raku metabolismi hindamine normoksias ja anoksias CO₂-e järgi Sf9 rakuliinis

Magistritöö

(30 EAP)

Hans Vellama

Juhendajad Ph.D Hendrik Luuk

M.Sc Kattri-Liis Eskla

Ph.D Tambet Tõnissoo

TARTU 2017

Raku metabolismi hindamine normoksias ja anoksias CO₂-e järgi Sf9 rakuliinis

Rakkude metabolismi on palju uuritud, kuid hüpoksilis-isheemilistes seisundites tekkivate koekahjustuste mehhanismid ei ole tänaseni selged. Mõõtes rakkudest eralduvat CO₂-te on võimalik saada hea ülevaade tsitraaditsükli toimimisest, mis on bioenergeetiliselt keskne rada. Ometi pole CO₂ mõõtmisi varajasemalt eriti palju tehtud. Käesolevas töös uuriti erinevate tsitraaditsükli talitlust mõjutavate süsinikuallikate mõju CO₂ eraldumisele rakkudest anoksias ja normoksias. Anoksilistes tingimustes säilis keskmiselt 10% normoksilisest CO₂ eraldumisest. Söötmesse lisatud glutamiin vähendas anoksilist CO₂ tootmist ning aeglustas selle taastumist anoksiast normoksiasse üleminekul. Peamise süsinikuallikana glükoosi tarbinud rakkudes oli anoksias CO₂ jääktootmine kõrgem ja taastumine peale anoksiat kiirem, mis tekitas lühiajalise CO₂ väljalöögi üle baastaseme. Tähelepanuväärsed olid fumaraadiga täiendatud söötmetel kasvanud rakud, milles CO₂ tootmine reageeris vastupidiselt glutamiinile.

Märksõnad: CO₂, tsitraaditsükkel, metabolism, reduktiivne stress, Sf9

CERCS kood: B470 Füsioloogia

Evaluating metabolism through CO₂ production in normoxia and anoxia in Sf9 cell line.

Metabolism of cells is a thoroughly studied subject, but mechanisms producing hypoxic-ischemic cell damage remain to be elucidated. Measuring CO₂ from the cells gives a good overview of how the central energy metabolism pathway, citrate cycle works. Yet little research measuring CO₂ has been done before on cell cultures. The effect of different carbon sources on CO₂ production by the citric acid cycle was examined. On average 10% of CO₂ production was retained in anoxia. Cells in media supplemented with glutamine produced less CO₂ in anoxia (compared to average) and showed slower recovering from 30 min anoxia. Glucose on the other hand, gave higher CO₂ production in anoxia and quicker recovery with a short CO₂ outburst after restoring normoxic O₂. Interestingly fumaric acid raised the anoxic CO₂ production and shortened the recovery time from anoxia and might be studied further.

Key words: CO₂, citrate cycle, metabolism, reductive stress, Sf9

CERCS code: B470 Physiology

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Mitokonder.....	8
1.2 Mitokondri metabolism.....	9
1.2.1 Tsitraaditsükkel.....	9
1.3 Hüpoksia.....	10
1.3.1 NADH.....	11
1.3.2 AMPK - AMP-aktiveeritud proteiini kinaas.....	12
1.3.3 HIF - hüpoksiast indutseeritud faktor.....	13
1.3.4 Tsitraaditsükkel anoksias.....	13
1.3.5 Pentoosfosfaadi rada.....	14
1.4 Hüpoksia ja normoksia piir.....	14
1.5 Rakuhingamise uurimine.....	15
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	17
2.1 Töö eesmärgid.....	17
2.2 Meetodid.....	17
2.2.1 Töö rakkudega.....	17
2.2.2 Söötmed.....	17
2.2.3 CO ₂ mõõtmisüsteem.....	19
2.2.4 Hingamise Km määramine.....	20
2.2.5 Katse ülesehitus.....	21
2.2.6 Tsütokroomi optilise neeldumise mõõtmine.....	22
2.2.7 Andmete kogumine ja töötlus.....	23
2.3 Tulemused.....	24
2.3.1 Sf9 rakkude hingamise Km.....	24
2.3.2 Optilise neeldumise ja rakkude hulga lineaarne regressioon.....	25
2.3.3 Rakkudest eralduva CO ₂ mõõtmine normoksias.....	26
2.3.4 Rakkudest eralduva CO ₂ mõõtmine anoksias.....	27
2.3.6 CO ₂ eraldumise taastumine peale anoksiat.....	29

ARUTELU.....	31
KOKKUVÕTE.....	34
Abstract.....	35
Tänuõnad.....	36
Kasutatud kirjandus.....	37
Kasutatud veebiaadressid.....	42
Lisa 1.....	43
Lisa 2.....	44
Lisa 3.....	45
Lisa 4.....	46
Lih litsents.....	47

Kasutatud lühendid

AMPK	AMP-aktiveeritud proteiini kinaas
COX	Tsütokroom c oksüdaas
G6PD	Glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas
HIF	Hüpoksiast indutseeritud faktor
HRE	Hüpoksia vastuselement
PDC	Püruvaadi dehüdrogenaasi kompleks
PDH	Püruvaadi dehüdrogenaas
PDK	Püruvaadi dehüdrogenaasi kinaas
pO ₂	Hapniku osarõhk
PPP	Pentoosfosfaadirada
VHL	Ingl von <i>Hippel–Lindau tumor suppressor</i>

Sissejuhatus

Kõik elusorganismid koosnevad rakkudest, mida iseloomustavad paljunemine, kohanemine, toitumine, kasvamine ning hingamine. Raku hingamine on protsess, mis lubab ära kasutada keskkonnas leiduvat energiat rakustruktuuride säilitamiseks ja paljundamiseks. Aeroobse raku hingamise puhul on viimaseks oksüdeeriks hapnik, mis on ühtlasi hingamisahela viimaseks elektronakseptoriks. Hingamisahel kasutab mitokondris tsitraaditsükli toodetud reduktiivset jõudu, et luua prootongradient, mida kasutatakse ATP sünteesiks. Just ATP kujul salvestatakse enamuse raku elutegevuseks vajalikust energiast ning hapniku puudmisel peab rakk kasutama teisi strateegiaid, et elus püsida.

Kuna hingamine on elutegevuseks äärmiselt vajalik, siis on seda ka põhjalikult uuritud. Olulisus ilmneb ka raku hingamise seotuses paljude haigustega nagu vähk, mitokondriaalsed haigused, kesknärvisüsteemi degeneratiivsed haigused jne. Raku hingamisega seotud haigused võivad olla seotud metaboolse regulatsiooni talitushäirega, mitokondriaalsete ja hingamisahela ensüümide mutatsioonide ja geeniekspressiooniga. Raku hingamise mõistmine on vajalik ka paraku laialt levinud patoloogiates nagu infarkt ja insult, kus hapniku ligipääs rakkudeni on takistatud tingituna verevarustuse häiretest. Maailma tervise organisatsiooni andmete kohaselt olid need kaks tervisehäiret ka kõige levinumad surmapõhjused 2015. aastal (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). Vähesel juhul ei saa rakk tavapäraselt toimida ning reaktsioonirajad reguleeritakse ümber kineetiliselt ja geeniekspressiooni tasemel, et tagada rakkude elumus. Hapnikupuuduses aset leidvad metaboolsed kohastumused pole kaugeltki mitte lõplikult ära kirjeldatud ja nende parem mõistmine võib anda uusi väljavaateid infarkti ja insuldi poolt põhjustatud isheemia reperfusiooni kahjustuste leevendamiseks. Nende süsteemide täpsem kirjeldamine on kasulik ka kasvajate arengu paremaks mõistmiseks ning teiste hapniku vähesusest või hingamisahela talitushäirest tingitud haiguste ravimiseks.

Käesoleva töö eemärgiks oli kirjeldada tsitraaditsükli kohanemist hapnikupuudusega. Teoreetilises osas antakse ülevaade uuritud tsitraaditsükli tähtsusest ja uuritud muutustest metabolismis hapniku puuduses. Eksperimentaalses osas hinnati tsitraaditsükli aktiivsust, mõõtes rakkude poolt eraldatud CO₂-te spetsiaalselt selleks tarbeks arendatud mõõtesüsteemis. Tsitraaditsükli mõjutati lisaks hapniku kontsentratsiooni muutmisele erinevate süsinikallikate lisamisega söötmesse. Töö viidi läbi TÜ Bio- ja Siirdemeditsiini instituudi füsioloogia osakonnas

ja TÜ Tehnoloogia instituudis koostöös Agu Laisk'i uurimisrühmaga.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mitokonder

Mitokondrid on kahekordse membraaniga, 0,75-3 μm suurused rakuorganellid (Wiemerslage ja Lee, 2016). Mitokondri funktsioonide seas on Ca^{2+} tasakaalu regulatsioon (Nicholls, 2005), apoptoosi ja rakutsükli kontroll ja palju muud. Üheks keskseks mitokondri rolliks on energiametabolism ja raku hingamine (Brand ja Nicholls, 2011). Lihas- ja närvikude sõltub oksüdatiivsel fosforüülimisel saadavast ATP-st ja hapniku osarõhust (pO_2), mille langemine alla kriitilise piiri võib tekitada pöördumatuid kahjustusi (Percy, 2014). Lähtuvalt mitokondri kesksest rollist metabolismis on selle funktsioneerimisega seotud mitmed haigused nagu vähk, mitokondriaalsed haigused, kesknärvisüsteemi degeneratiivsed haigused jne (Nunnari ja Suomalainen, 2012; Warburg, 1956; Wu *et al.*, 2007). Seetõttu on üha olulisem hinnata uute ravimite mõju mitokondrile (Brand ja Nicholls, 2011; Lin ja Beal, 2006).

Oksüdatiivse fosforüülimise puhul on keskse tähtsusega nähtuseks prootongradient mitokondri membraanidevahelise ruumi ja mitokondri maatriksi vahel (mitokondri membraanpotentsiaal), mida kirjeldati 1961 aastal Peter Mitchell'i poolt (Mitchell, 1961). Tegu on elektrokeemilise potentsiaaliga, mis luuakse prootonite ehk vesinkioonide kontsentratsioonigradiendi tekitamisel mitokondri sisemembraani erinevatel külgedel (Mitchell, 1961). Vesinikioonide kontsentratsiooni erinevus kummalgi pool mitokondri sisemembraani loob elektrokeemilise potentsiaali, mis koosneb elektrilisest jõust ja prootongradiendist ($\Delta\psi$ ja ΔpH). Seda potentsiaali kasutatakse ära ATP-süntaasi poolt, mis sünteesib ATP-d prootonite liikumisel mitokondri maatriksisse.

Prootonite gradiendi loovad elektrone transportivad kompleksid, mis oksüdeerivad (eemaldavad elektroni) tsitraaditsükli sünteesitud NADH-i ja suktsinaati ja sellega kaasneb prootonite liikumine maatriksist membraanidevahelisse ruumi (Garlid, 2004). Redoksreaktsioonide ahela lõpus kantakse elektron hapnikule ning tekib vesi.

Prootongradient on reguleeritud respiratsiooni (O_2 redutseerimine), fosforüülimise (ATP sünteesimine) ja prootonlekke (H^+ liikumine tagasi maatriksisse muul moel kui ATP süntaasi vahendusel) poolt (Hafner *et al.*, 1990). Selleks, et oksüdatiivne fosforüülimine toimuda saaks, metaboliseerib rakk toitained nagu suhkrud, rasvad ja aminohapped.

1.2 Mitokondri metabolism

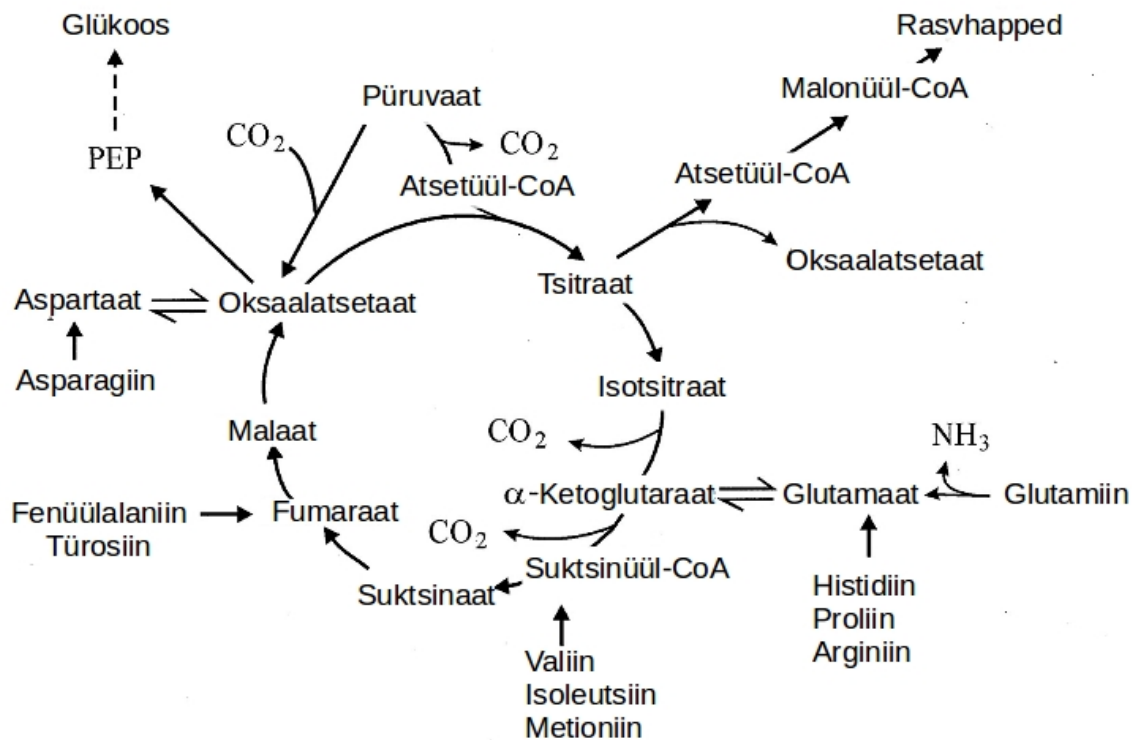
Selleks, et rakk saaks toota eluks vajalikku energiat peab ta seda keskkonnast omastama läbi kataboolsete reaktsioonide, kus molekulide vahelised kõrge energiaga sidemed vahetatakse välja väiksema vaba energiaga sidemete ehk tugevamate sidemete vastu ning tekitatakse makroergilisi ühendeid, mis salvestavad endasse keskkonnast saadavate keemiliste ühendite sidemeenergia. Läbi erinevate metabolismiradade saadakse suhkrutest, rasvadest ja aminohapetest ühendid, mis suunatakse mitokondrisse, kus nad on substraadiks tsitraaditsüklile, mis toodab NADH-d ja suktsinaati elektrontransportahela toimimiseks. Glükolüüsis, mis on üks peamisi energiametabolismi radu lõhutakse glükoos kaheks püruvaadi (püroviinamarjahape) molekuliks, mille käigus vabaneb summaarselt 2ATP-d, 2NADH-d (+vesi, +H⁺, +soojus) (Berg *et al.*, 2002). Püruvaat transporditakse mitokondrisse mitokondriaalse püruvaadi transporteri poolt (Vanderperre *et al.*, 2015).

Püruvaat oksüdeeritakse atsetüül-CoA-ks (atsetüül-koensüüm-A) ja CO₂-ks PDC (ingl *pyruvate dehydrogenase complex*) poolt, ja eraldub 1 NADH. Selle pöördumatu reaktsioon järel ei pääse polaarne atsetüül-CoA enam läbi membraani ja kasutatakse tsitraaditsükli. Lisaks võidakse mitokondrisse transportida juba tsütosoolis redutseeritud molekulid läbi malaat-aspartaat vaheti või lülitada nende reduktiivne potentsiaal elektrontransportahelasse läbi glütserool-fosfaat ahela.

1.2.1 Tsitraaditsükkel

Alves *et al.* kirjeldab tsitraaditsükli kui *cantus firmus* (ladina keeles 'kindel laul'), mille peale on loodud kogu ülejäänud organismi metabolism (Alves *et al.*, 2015). Laialt levinud vaade tsitraaditsüklist kui ühesuunalisest energiast tootvast katabolismist on primitiivne, kui ei arvestata tsüklist väljuvate eelühenditega. Raku elus püsimiseks vajab ta metabolismiradu, mis toodaksid energiat, eelühendeid teiste makromolekulide sünteesiks ja substraate teiste oluliste funktsioonide jaoks (Vander Heiden *et al.*, 2009). Seetõttu peab peab tsitraaditsükli nägema kui kataplerootiliste (ühendite väljumine biosünteesiks) ja anaplerootiliste (tsükli ühendite tootmine) reaktsioonide tasakaalulist seisundit (Owen *et al.*, 2002). Kuna tsitraaditsükkel vahendab nii rakkude energiavajadust läbi NADH oksüdeerimise, kui ka raku kasvamiseks vajalike metaboolseid eelasmolekule, siis mõlemad protsessid mõjutavad tsükli tasakaalulist seisundit ja selle kiirust.

Tsitraaditsükli otsustavaks reaktsiooniks on tsitraadi moodustamine atsetüül-CoA'st ja oksaloatsetaadist. Esimest sünteesitakse püruvaadi dehüdrogenaasi poolt, β -oksüdatsioon, vaba atsetaadi ligeerimisel või osadest aminohapetest. Oksaloatsetaati saadakse malaadi oksüdeerimisel, aspartaadi deamineerimisel ja püruvaadi karboksüleerimisel (Alves *et al.*, 2015). Peale nende anaplerootiliste reaktsioonide on mõned olulisemad anaplerootilised reaktsioonid toodud joonisel 1. Imetajates on glükoos ja glutamiin kaheks peamiseks anaplerootiliseks toitaineks, mis tsitraaditsükli toetavad ja seeläbi energia ning anabolismi vajadusi rahuldavad (Cantor ja Sabatini, 2012).



Joonis 1: Tsitraaditsükli anaplerootilised ja kataplerootilised reaktsioonid. Modifitseeritud Owens *et al.*, 2002 järgi.

1.3 Hüpoksia

Erinevates olukordades võivad rakud kogeda hüpoksiat ehk madalat hapniku taset. Suurima osa hapnikust tarvitab rakus mitokonder oksüdatiivsel fosforüülimisel, mis on põhiline ATP tootmise viis (Solaini *et al.*, 2010). Hüpoksia pärsib seda rada ja lõpuks võib ATP puudus viia rakusurmani (Santore *et al.*, 2002).

1.3.1 NADH

Oksüdatiivset fosforüülimist seob metaboolsete protsessidega mitokondris olev NADH, mis kannab elektronid hingamisahela esimesele kompleksile (Osellame *et al.*, 2012). Kuna NAD⁺ on kataboolsetes radades elektroni akseptor, siis glükolüüsi ja tsitaraaditsükli toimimiseks on vajalik tema oksüdeeritud vorm ja seetõttu hoitakse NADH/NAD⁺ suhe rakus madalana (Sun *et al.*, 2012). Tsütosoolis paikneva NAD⁺ varu on fosfofruktokinaasi kõrval peamine glükolüüsi ja seetõttu ka mitokondrisse jõudva püruvaadi reguleerija (Stanley *et al.*, 1997). NADH tase tsütosoolis hoitakse madal tänu malaat-aspartaat vahetile, mis redutseerib NADH-d kasutades oksaalatsetaadi malaadiks, mis transporditakse mitokondrisse, kus malaat lülitub tsitraaditsükli (Chen *et al.*, 2015; Nielsen *et al.*, 2011). Teine variant, kuidas rakud NADH-d oksüdeerivad on läbi laktaadi dehüdrogenaasi, mis redutseerib püruvaadi laktaadiks hüpoksia olukorras ja ka vähirakkudes aeroobsel glükolüüsil (Fan *et al.*, 2011; Spriet *et al.*, 2000).

Kuigi madal NADH tase mitokondris võib rakule olla kahjulik, kuna viitab tsitraaditsükli alatalitlusele, on samuti ohtlik väga kõrge NADH tase. Kõrge NADH tase viib mitokondri membraanpotentsiaali üles, mis omakorda takistab elektronide liikumist hingamisahela komplekside vahel, kuna see protsess on seotud prootonite liikumisega elektrookeemilise gradiendi vastu. Kõrge NADH taseme juures, mis tekib näiteks hapniku puuduses, kuna tsütokroom c oksüdaasil (hingamisahela kompleks IV) puudub substraat (hapnik), võivad elektronid hingamisahelast liikuda teistele ühenditele (Sun *et al.*, 2012). Nii tekib olukord, kus madala hapniku juures tekivad redoksreaktiivsed ühendid (paardumata elektroniga molekulid), mis võivad reageerida valkude, lipiidide ja muude struktuursete molekulidega ja sellega raku elutegevust häirida (Murphy, 2009). NADH ja suktsinaadi kogunemist hüpoksias on juba ammu täheldatud ja see pidurdab tsitraaditsükli toimimist (Chouchani *et al.*, 2014; Foster *et al.*, 2005; Taegtmeyer, 1978)

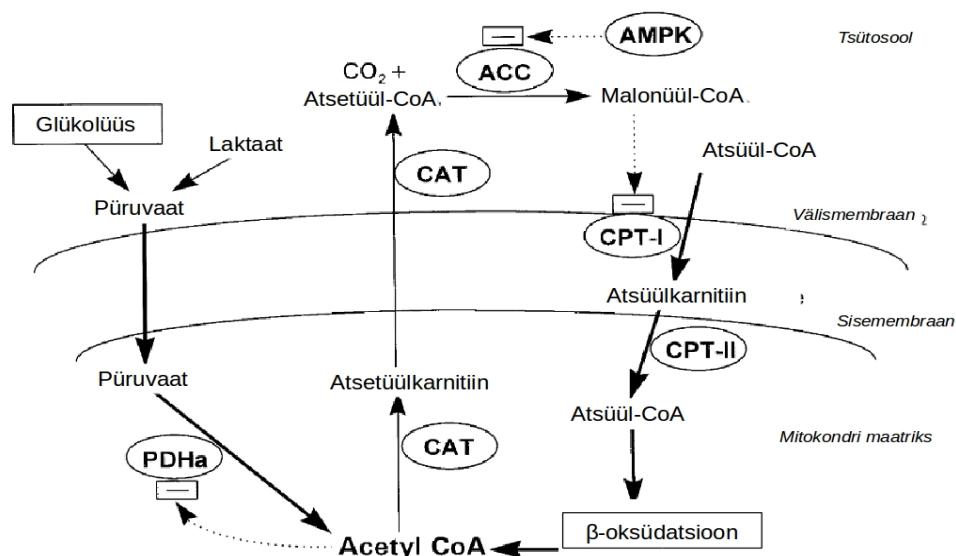
Reageerimine hapniku puudusele toimub mitmeefaasiliselt (kiire ja aeglane kohanemine). Kiirema kohanemise puhul mängivad rolli reaktsioonitasakaalud, allosteerilised tasakaalud ja nende toimivate muutuste tõttu reageerivad ensüümid nagu AMPK (AMP-aktiveeritud proteiini kinaas)(Solaini *et al.*, 2010). AMPK on heterotrimeerne kompleks, mis koosneb katalüütilisest α subühikust ja kahest regulaatorsest subühikust β ja γ (Viollet *et al.*, 2009). Pikemajalise hüpoksia korral on peamine raku metabolismi regulaator hüpoksiast indutseeritud faktor (HIF - ingl

Hypoxia Inducible Factor) (Semenza ja Wang, 1992), mis suurendab anaeroobse glükolüüsi aktiivsust ja vähendab mitokondrite arvukust ja osakaalu energiatootmises.

1.3.2 AMPK - AMP-aktiveeritud proteiini kinaas

Hüpoksia mõjutab metabolismi biokeemiliste reaktsioonide tasakaalu (metaboliitide kontsentratsioonid), ensüümide aktiivsuse ning taseme kaudu (Solaini *et al.*, 2010). Madal hapniku kontsentratsioon vähendab hingamise kiirust esiteks läbi COX-i (tsütokroom c oksüdaas) mitteküllastava hapniku kontsentratsiooni ja teiseks läbi COX-i allosteerilise modulatsiooni (Chandel *et al.*, 1996). See tingib prootograndiendi vähenemise ning väheneb ATP süntees läbi oksüdatiivse fosforülatsiooni. ATP ja AMP kontsentratsioonide suhtele rakus reageerib AMPK. AMP seondumine γ subühikule aktiveerib AMPK (Viollet *et al.*, 2009). Adenülaadi kinaaside erilise aktiivsuse tõttu hoitakse reaktsioon $2ADP \leftrightarrow AMP + ATP$ peaaegu alati tasakaalulises seisundis, mis tõttu AMP/ATP suhe reageerib ADP/ATP suhtest umbes kaks korda kiiremini ja teeb AMP-st tundliku indikaatori raku energiavajadusest (Hardie ja Hawley, 2001). AMPK lülitab sisse kataboolsed rajad nagu glükolüüs (ja glükooosi omastamine) ning lülitab välja ATP-d tarbivad anaboolsed rajad nagu rasvhapete, glükogeeni ja valkude süntees (Towler ja Hardie, 2007).

Püruvaadi dehüdrogenaas (PDH) aktiivsust negatiivselt reguleeriv PDH kinaas (PDK) on aktiivne raku kõrge reduktiivse potentsiaali juures kui NADH/NAD⁺ ja atsetüül-CoA/CoA suhted tõusevad (Hansford ja Cohen, 1978). NADH ja atsetüül-CoA mõjutavad PDH aktiivsust ka



Joonis 2: AMPK mõju rasvhapete metabolismile. Punktiriga jooned tähistavad inhibitoorset mõju. Lühendid: ACC, atsetüül-CoA karboksülaas; AMPK, AMP-aktiveeritud proteiini kinaas; CPT-I, karnitiin palmotüül transferaas 1; CPT-II, karnitiin palmotüül transferaas; CAT, karnitiin atsetüül transferaas; PDHa, aktiivne fosforüülmata püruvaadi dehüdrogenaas. Modifitseeritud Stanley *et al.*, 1997 järgi.

otseselt (Hansford ja Cohen, 1978). AMPK kaudu suureneb β -oksüdatsioon, mis varustab mitokondrit atsetüül-CoA-ga ja seeläbi inhibeerib PDH vahendusel toimuvat süsiniku voolu (joonis 2; Stanley *et al.*, 1997). Aktiivse anaeroobse glükolüüsi kaudu koguneb rakus laktaat, mis hakkab lõpuks raku pH-d alla viima (Solaini ja Harris, 2005). Alternatiivne võimalus on, et hapniku puuduses aitab malaadi dehüdreerimine fumaraadiks oksüdeerida tsütosooli NADH-d (Wiesner *et al.*, 1988).

1.3.3 HIF - hüpoksiast indutseeritud faktor

Hüpoksiale reageerimisel ja metabolismi ümberseadistamisel, kohanemaks madala hapniku kontsentratsiooniga, on keskne roll HIF valgul. HIF-1 heterodimeer koosneb hapnikutundlikust alfa subühikust, mis koos beeta subühikuga on võimeline seostuma DNA-le. Normaalse hapniku kontsentratsiooni korral HIF-1 α hüdroksüleeritakse prolüül-hüdroksülaaside poolt, kasutades α -ketoglutarati. Hüdroksüleeritud HIF-1 α interakteerub VHL (ingl *von Hippel-Lindau tumor suppressor*) valguga, mis HIF-1 α ubiquitineerib ja suunab lagundamisele proteasoomide poolt (Semenza, 2003). Hüpoksia olukorras ei toimu HIF-1 α hüdroksüleerimist ja stabiilne HIF seondub HRE (ingl *hypoxia response element*) järjestusele, mis paiknevad mitmete glükoosi transporterite, glükolüüsi ensüümide ja metabolismi reguleerivate geenide ees (Semenza, 2007). HIF stabiliseerimises on olulised ka tsitraaditsükli vaheühendid ja reaktiivsed hapniku ühendid (ROS-id) (Lin *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2007). HIF-1 aktiveerib ka PDK, mis inhibeerib PDH tööd, reguleerides seeläbi tsitraaditsükli substraadi kättesaadavust ja hingamise aktiivsust (Kim *et al.*, 2006). See on oluline, et säilitada ATP süntees läbi glükolüüsi ja vähendada rakule kahjuliku ROS-i teket (Kim *et al.*, 2006). Samuti suurendab HIF-1 mitokondrite autofaagiat, vähendades mitokondrite hulka ja seeläbi ROS-ide teket ja rakusurma (Zhang *et al.*, 2008).

1.3.4 Tsitraaditsükkel anoksias

Tsitraaditsükkel toimib ka anoksias kui rakkude juures puudub hapnik (Scott *et al.*, 2011), kuid siiani pole veel selge kuidas. Mõned omadused nagu suktsinaadi ja NADH kogunemine on küll üpris universaalsed nähtused, kuid mehhanismid, mis neid seisundeid hoiavad või tasakaalustavad pole veel täielikult teada. Näiteks on kirjeldatud, et glutamiin on oluline substraat tsitraaditsükklisse ja α -ketoglutaradi ning aspartaadi lisamine vähendab isheemia reperfusiooni

kahjustust läbi anaeroobse tsitraaditsükli toimimise ATP sünteesiks (Scott *et al.*, 2011; Weinberg *et al.*, 2000).

Olukorras, kus HIF1 on indutseeritud, toimub tsitraadi ja lipiidide süntees peamiselt glutamiinist läbi reduktiivse karboksüleerimise (Filipp *et al.*, 2012; Gameiro *et al.*, 2013; Metallo *et al.*, 2011). Samas on kirjeldatud ka olukorda, kus glutamiini panus tsitraaditsükli vaheühenditesse on väike (Chouchani *et al.*, 2014). Samas uurimistöös on kirjeldatud isheemias suktsinaadi kogunemist fumaraadist läbi suktsinaadi dehüdrogenaasi, kui olulist mehhanismi isheemia reperfusiooni kahjustuse tekkes. Fumaraadi kogunemisesse panustab aspartaat läbi malaat aspartaat vaheti ja püriini nukleotiid tsükli (Chouchani *et al.*, 2014). Peale hüpoksiat mitokondris leiduvad vaheühendid on olulised ka ROS-i põhjustatud kahjustuste tekkel. Isheemiajärgses mitokondris tekkis vähem ROS-i kui substraadiks oli suktsinaat ja rohkem kahju tegi rakule glutamaat ja malaat (Madungwe *et al.*, 2016).

1.3.5 Pentoosfosfaadi rada

Pentoosfosfaadirada (PPP) on oluline rakkude antioksidatiivse kaitse, nukleotiidide ja lipiidide sünteesi jaoks (Jiang *et al.*, 2014). Mitmete vähirakkude puhul on PPP rada oluliselt üles reguleeritud, et tagada anaboolsed reaktsioonid ja redokstasakaal (Lucarelli *et al.*, 2015; Patra ja Hay, 2014). Anoksia olukorras toimub raja kiirust limiteeriva ensüümi G6PD (ingl *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) glükosüleerimine, mis suurendab glükoosi suunamist PPP rajale (Rao *et al.*, 2015).

On võimalik, et hüpoksilistes tingimustes aitab glükoosi metabolism läbi PPP raja stabiliseerida HIF-i (Osada-Oka *et al.*, 2010). Varasemalt on näidatud, et oksidatiivse PPP raja inhibeerimine südamerakkudes aitab vähendada isheemia reperfusiooni kahjustust (Zuurbier *et al.*, 2004).

1.4 Hüpoksia ja normoksia piir

Hapniku kontsentratsioon õhu käes küllastunud 37° C vees on umbes 200 µM ((Reynafarje *et al.*, 1985). Keharakud on enamasti oluliselt madalama hapniku kontsentratsiooniga tingimustes sõltudes nii koetüübist kui füsioloogilisest seisundist (Solaini *et al.*, 2010). Sissehingatavas õhus on hapniku osarõhk umbes 160 mmHg, kuid alveolaarsete kapillaaride vere hapniku osarõhk on umbes 104 mmHg (Brahimi-Horn ja Pouysségur, 2007).

Erinevates kudedes võib hapniku osarõhk varieeruda vahemikus 25 mmHg kuni 0.4 mmHg (Brahimi-Horn ja Pouysségur, 2007). Rakkudest eraldatud mitokondrite puhul on mõõdetud hapniku osarõhk 50%-se hingamise juures ~0.19 mmHg, kuid näiteks endoteelirakkude puhul on see 0.45-0.60 mmHg (Gnaiger *et al.*, 1995). Hüpoksiias indutseeritud transkriptsioonifaktori HIF1- α puhul on rakukultuuride puhul kirjeldatud selle aktivatsiooni 5% (40 mmHg) hapniku juures ning enamus hüpoksiakatseid on tehtud 1-2% (8–16 mmHg) hapniku juures, kus HIF1- α tase rakutuumas tõuseb märgatavalt juba mõne tunni jooksul (Brahimi-Horn ja Pouysségur, 2007).

1.5 Rakuhingamise uurimine

Rakuhingamise uurimisel võib katseid teha erinevatel struktuuritasemetel nagu eraldatud mitokondrid, rakukultuurid, koekultuurid või tervikorganism. Vastavalt uuringu eesmärgile tuleks valida kõige sobivam variant. Loetletud järjekorras kasvavad ka üldistuse tasemed ning selleks, et öelda midagi täpsemalt molekulaarsete mehhanismide kohta, mis rakuhingamist loovad, kasutatakse enamasti mitokondreid ja rakukultuure. Nende kahe lähenemise võrdlus on toodud

Tabel 1: Mitokondrite ja rakkudega töötamise eelised ja puudused. Modifitseeritud Brand ja Nicholls, 2011 põhjal.

Isoleeritud mitokondrid		Terved rakud	
Eelised	Puudused	Eelised	Puudused
Küllaltki lihtne ja hästi kirjeldatud; sobilik mehhanismide uurimiseks; ei ole mõjutatud tsütosooli poolt	Puudub rakuline kontekst	Füsioloogiline relevantsus; interaktsioonid teiste raku osadega säilivad	Kompleksem ja rohkem võimalusi tõlgendamise vigadeks; puudub organismi kontekst
Lihtne isoleerida erinevatest täiskasvanud looma kudedest	Isoleerimine on valikuline ja põhjustab kahjustusi; osadest kudedest keeruline kätte saada	Pole mitokondri isoleerimisest tulenevaid artefakte; rakuliinid alluvad geneetilistele manipulatsioonidele	Raske või võimatu isoleerida täiskasvanud looma kudedest
Reagente ja substraate saab otse lisada; teadlasel on tingimuste üle kontroll	Teadlane peab ise valima kohased tingimused	Rakk kohandab mitokondrile sobiliku keskkonna	Paljud reagentid ja substraadid ei pääse raku, piirates võimalikke katseid; teadlane valib rakuvälised substraadid, hormoonid ja tingimused
Meetodid on üldiselt hästi paigas ja kirjeldatud	Olemasolevad meetodid nõuavad suuri proovi koguseid; mitokondrid erinevatest rakutüüpidest võivad agregeeruda	Plaadipõhised analüüsid võimaldavad väikeste koguste või üksikute rakkude mõõtmist	Mitmed meetodid pole piisavalt spetsiifilised või kvantitatiivsed

tabelis 1. Hingamisest tuleneva hapniku kontsentratsiooni analüüs annab meile informatsiooni, millisel määral töötab elektrontransportahel. Nagu varem mainitud, on see võimalik tänu tihedale seosele prootongradiendi ja hapniku redutseerimise vahel (Hafner ja Brand, 1991; Porter ja Brand, 1995). Hapniku signaali mõõtmisel on hiljem oluline andmed korrigeerida ja arvestada 1) sensori reageerimise ajaga 2) gaaside lekke ja tühja mõõtmise signaaliga 3) nulljoone nihkumisega ajas (Gnaiger et al., 1995).

Põhiliseks hapniku kontsentratsiooni mõõtmise tööriistaks on olnud Clark'i elektrod (Chance ja Williams, 1955; Gnaiger *et al.*, 1995), kuid hapniku mõõtmiseks on kasutatud ka optilisi meetodeid (Gerencser *et al.*, 2009; Gnaiger *et al.*, 1995; Vajrala *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2007). Tsitraaditsükli uurides korreleeruvad selle aktiivsusega tavaliselt ka hapniku tarbimine, CO₂ eraldumine, mitokondri membraanipotentsiaal ja ATP süntees (Alves *et al.*, 2015). See-eest anoksiat uurides ei ole hapniku mõõtmine võimalik ning mitokondri membraanipotentsiaali ja ATP tootmine on häiritud. Selleks, et paremini mõista, mis toimub mitokondris tuleb kasutada teisi meetodeid, näiteks CO₂ eraldumise mõõtmist.

Hingamise uurimistööde võrdlusel tuleb täheldada arvestatavat varieeruvust eri guppide tööde tulemuste vahel. Tulemusi võivad mõjutada seejuures kasutatud mudellooma liik ja vanus, anoksia määr erinevates mudelites ja ka erinevused andmete kogumisel (Solaini ja Harris, 2005).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud töö eesmärk oli hinnata kättesaadavate süsinikuallikate mõju rakkude CO₂ eraldamitele ja seeläbi ka raku metabolismiradadele nii normoksias kui anoksias. Lisaks oli töö eesmärk kirjeldada kättesaadavate süsinikuallikate mõju CO₂ eraldumise kineetikale normoksia taastamisel peale 30.-ne minutilist anoksiat.

2.2 Meetodid

2.2.1 Töö rakkudega

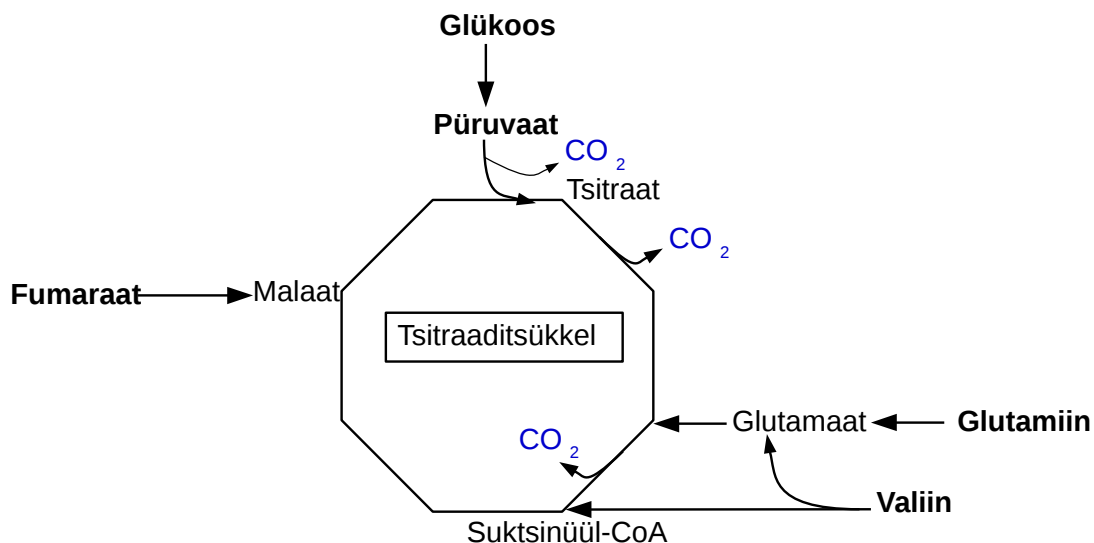
Katsetes kasutati uitöölase *Spodoptera frugiperda* munasarjarakkude rakuliini Sf9 (ATCC[®] CRL-1711[™]). Rakud kasvatati üles 8.8 cm suurustes Petri tassides seerumivabas rakusöötmes Ex-Cell420 (Sigma-Aldrich), millele oli lisatud penitsilliin (40 U/ml) ja streptomütsiin (40 µg/ml) (Smart Media). Rakke inkubeeriti 27° C juures atmosfääri CO₂ kontsentratsiooniga inkubaatoris. 16 tundi enne katset eemaldati rakkude pealt vana sööde ja suspendeeriti üles söötmes, milles toimus CO₂ mõõtmise katse. 8ml söödett koos ~20 miljoni rakuga tõsteti seejärel Petri tassi, kuhu oli eelnevalt sisestatud autoklaavitud klaasist plaat 83 mm diameetriga. Rakkude loendamiseks kasutati eelnevalt Countess[™] (Invitrogen) rakuloendurit. Seejärel inkubeeriti rakke 16 tundi 27° C juures, õhu CO₂ kontsentratsioonil (0.04%). Vahetult enne katset lisati 40µl (10mg/ml) karboanhüdraasi (Sigma-Aldrich) selleks, et saavutada CO₂ ja bikarbonaadi kiire tasakaal kogu katse vältel.

2.2.2 Söötmed

Erinevad söötmed rakkude hingamisaktiivsuse mõõtmiseks tehti DMEM (D5030, Dulbecco Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich[®]) söötme baasil, milles puudus glükoos, l-glutamiin, fenoolpunane, Na-püruvaat ja Na-bikarbonaat. pH 6.8 stabiliseerimiseks lisati liitrile DMEM söötmele 20ml (1M) HEPES puhvri lahust (Capricorn). Vastavalt katsele, lisati söötmele erinevaid süsinikuallikaid. Kasutatud söötmed on toodud tabelis 2. Iga söötmega sooritati vähemalt kolm korduskatset. Erinevad süsinikuallikad valiti nende erinevate tsitraaditsükklisse sisenemise radade kaudu. Kasutatud süsinikuallikate tsitraaditsükklisse sisenemisteede lihtsustus on toodud joonisel 3.

Tabel 2. Töös kasutatud söötmed ja nende kontsentratsioonid.

C-allika konts.	C-allika nimetus	C-allika konts.	C-allika nimetus
- C (söötmesse ei lisatud süsinikuallikaid)	-C allikad	5,5mM D-glükoos, 4mM L-glutamiin ja 1mM Na-püruvaat	Täissööde
5,5mM D-glükoos (Smart Media)	5.5 mM glükoos	25mM D-glükoos	25 mM glükoos
5,5mM D-glükoos ja 4mM L-glutamiin	Glükoos+glutamin	4mM L-glutamiin (Capricorn scientific)	Glutamiini sööde
5,5mM D-glükoos ja 1mM Na-püruvaat	Glükoos+püruvaat	1mM Na-püruvaat (NPY-B, Capricorn)	Püruvaadi sööde
5,5mM D-glükoos ja 4mM Na-fumaraat	Glükoos+fumaraat	4mM L-glutamiin ja 1mM Na-püruvaat	Glutamiin+püruvaat
4mM L-valiin (Sigma-Aldrich) ja 5,5mM D-glükoos	Glükoos+valiin	4mM Na-fumaraat (Alfa Aesar)	Fumaraadi sööde

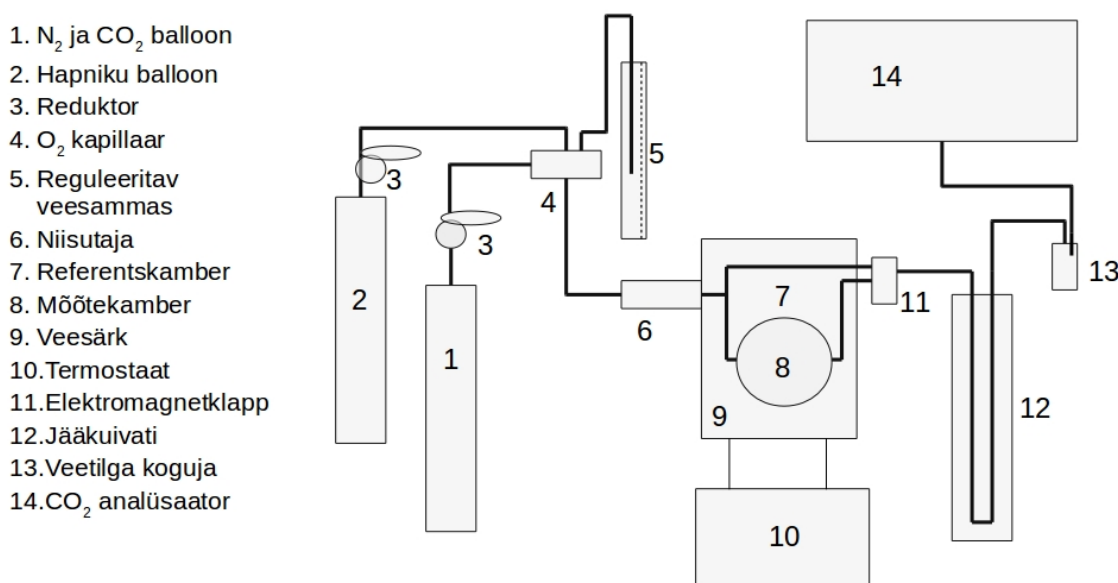


Joonis 3: Katsetes kasutatud C-allikate otsesed sisenemisteed tsitraaditsükklisse. Jämedas kirjas on märgitud kasutatud toiteallikad.

2.2.3 CO₂ mõõtmissüsteem

Mõõtmised tehti süsteemis, kus üle rakkude voolav gaas suunati CO₂ analüsaatorisse Li-7000 (LiCor, Lincoln, Ne) (joonis 4). ~99% N₂ (AGA, Eesti) ja 460-480 ppm CO₂ (AGA, Eesti) gaasisegu valmistati 10 l gaasiballooni rõhu juurde 10 bar'i, kasutades standartseid 50 l, 200 bar gaasiballoone (AGA, Eesti). O₂ lisati gaasisegule kapillaari kaudu ja kontsentratsioon saavutati reguleeritava veesamba vasturõhuga. Anoksias ühendati O₂ toru lahti (O₂ jääkkontsentratsioon oli alla 3 ppm-i). "Normoksia" olukorras oli hapniku kontsentratsioon gaasisegus ~1.75%. Balloonist tulev gaas suunati kambri ees asuvasse niisutajasse, kus gaasisegu küllastus veeauruga veesärgi temperatuuri juures, mis kõikide katsete puhul oli 27° C. Peale niisutajat sai gaas liikuda läbi kapillaari, kas mõõtmiskambrisse või referentskambrisse (roostevabast terasest toru).

Gaasi suunamine toimus elektromagnetilise klappiga, mis sulges mõõtmiskambrist väljuva



Joonis 4: CO₂ hingamise mõõtmise süsteem.

gaasivoolu selleks ajaks, kui mõõdeti referentsjoont, ja referentskambrist selleks ajaks, kui mõõdeti mõõtmiskambrist tulevat gaasi. Kui mõõdeti mõõtmiskambrist tulevat gaasi, siis referentskambris gaas seisis ning kui mõõdeti referentskambrist tulevat gaasi siis seisis gaas mõõtekambris. Kambrid läbinud gaas liikus sealt edasi kuivatisse, milleks oli jäävette (0° C) termostateeritud roostevabast terasest toru (gaasi veeauru rõhk oli ~6 mbar). Enne analüsaatorit oli lisatud ka veetilga koguja, vältimaks vee jõudmist analüsaatoritesse süsteemi rikke korral. CO₂ analüsaator Li-7000 töötab eristaval viisil, võrreldes mõõdetavat gaasi referentsgaasi suhtes, milleks oli puhas N₂. Tulenevalt

aeglasest gaasivoost ja väikestest erinevustest gaaside kontsentratsioonis oli ülimalt oluline, et süsteem oleks hermeetiline ja isoleeritud atmosfäärist. Rakkudega klaasplaadi sisestamiseks lahti käiva mõõtmiskambri metallservad olid seetõttu määratud vaakumäärdega (*Apiezon[®] -Fett N*).

2.2.4 Hingamise Km määramine

Selleks, et tuvastada rakkude elutegevuseks sobiv hapniku kontsentratsioon tehti rida katseid erineva hapniku kontsentratsiooniga, mis võimaldaks leida hingamise Km (Michaelise konstant, hapniku kontsentratsioon reaktsiooni ½ maksimaalkiiruse juures) ja Vmax (reaktsiooni maksimaalkiirus). Nende kontsentratsioonide juures olev hapniku teoreetiline kontsentratsioon rakkude juures arvutati valemiga.

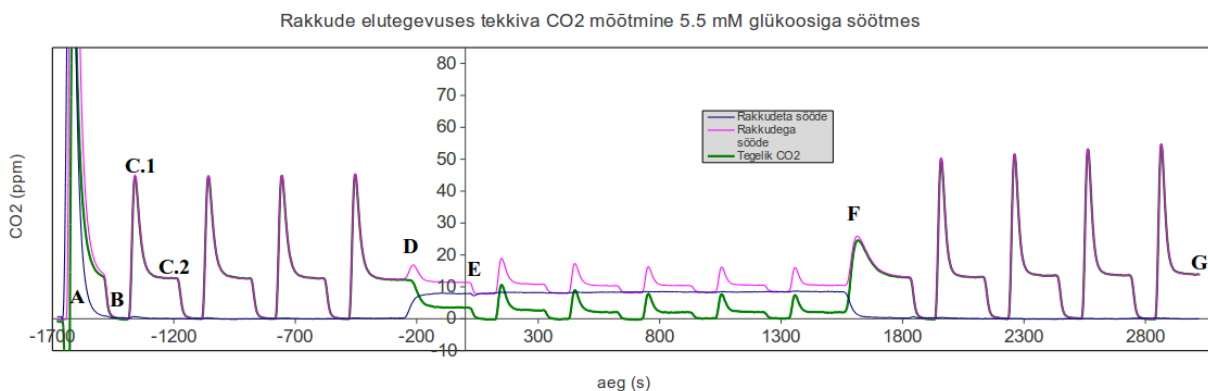
$$\text{Valem 1: } [O_2 \mu M]_{\text{söötmes}} = [O_2 \mu M]_{\text{pinnal}} - [R_v] * v_{O_2}$$

Kus $[O_2 \mu M]_{\text{pinnal}}$ on kambri oleval hapniku kontsentratsioon, $[R_v]$ on rakkudel oleva söötmekihi difusioonitakistus hapnikule ja v_{O_2} on hingamisest tulenev hapniku tarbimise kiirus. Hapniku tarbimise kiirus nmol/cm²/s arvutati neelduva O₂ järgi valemiga 2.

$$\text{Valem 2: } v_{(O_2)}(\text{nmol/cm}^2/\text{s}) = v_{\text{gaas}} * \frac{\text{ppm}}{1\,000\,000}$$

Kus $v_{\text{gaas}}=536$ nmol/cm²/s on gaasivoolu kiirus üle klaasplaadi ja ppm on mõõdetud CO₂ signaal, millest on lahutatud 0 hapniku juures olev CO₂ signaal (eeldatud on 1:1 suhet CO₂ eraldumise ja O₂ neeldumise vahel rakkude hingamisel). Hapniku kontsentratsiooni ja neeldumise kiiruse graafiku järgi leiti kõige parema sobivusega mittelineaarne lähend, mille pealt tuletati Km ja Vmax. Katseteks valiti ~1.75% hapnikuga gaasisegu, sest sellise kontsentratsiooni juures oli rakkude hingamine hapniku neeldumise järgi praktiliselt platoon (lähedal maksimaalkiirusele) ning madal hapniku kontsentratsioon lihtsustab ühtlasi ka hapniku tarbimise mõõtmist.

2.2.5 Katse ülesehitus



Joonis 5: 5.5 mM glükoosiga söötmes mõõdetud Sf9 rakkude CO₂ signaali graafik. A - rakkude sisestamine mõõtekambrisse; B - 100 sekundit referentskambril mõõtmine; C.1 - referentsi mõtmise ajal kogunenud CO₂-e tekitatud piik mõõtmiskambrile lülitumisel; C.2 - mõõtmiskambril statsionaarne CO₂ signaal; D - hapniku eemaldamine (anoksia); E - esimene referentskambril mõõtmine anoksias; F - normoksia taastamine; G - rakud võetakse välja, katse lõpp.

Rakkudega klaasplaat võeti Petri tassist välja, sööde kallati klaasi pealt maha ning klaas sisestati mõõtekambrisse, kus lisati 500 µl sama söödet, milles rakud olid kasvanud. Arvestades klaasile jäänud söödet ja lisatud söödet oli söötmekihi paksus rakkude peal ~0,12 mm. Katseobjekti sisestamisel suleti mõõtmiskamber (joonis 5, A) ja mõõdeti mõõtekambrist väljuvat CO₂ signaali 100 sekundit. Peale seda hakkas süsteem tegema tsükleid, kus 100 sekundit mõõdeti referentskambril CO₂ signaali (joonis 5, B) ja 200 sekundit mõõtekambril signaali (joonis 5, C). Peale neljandat tsüklit 200. sekundil kambrivahetust ei toimunud, vaid eemaldati hapnik (joonis 5, D). Peale hapniku eemaldamist oodati 300 sekundit (joonis 5, E), enne kui süsteem jälle saja ja kahesaja pikkuseid tsükleid tegema hakkas. Peale 30. minutit anoksiat tehti samasugune vahetus normoksia peale tagasi (joonis 5, F) ja mõõdeti veel 25 minutit rakkude CO₂ eraldumise taastumist. Seejärel võeti klaasplaat mõõtekambrist välja ja asetati tagasi Petri tassi (joonis 5, G). Referentsi mõõtmisel mõõtekambril gaas seisis ja rakkude elutegevuse tõttu kogunes sinna CO₂. Referentsilt mõõtekambrile üleminekul tekkis mõõtetulemustes CO₂ seisupiik (joonis 5, C.1), mis näitab mõõtekambrisse kogunenud CO₂ kontsentratsiooni samal ajal, kui registreeriti referentskambril signaali. Seega süsteem mõõdab nii integraalselt (ehk kumulatiivselt ajaperioodi jooksul, mil gaasivool läbi mõõtekambril on peatatud) kui diferentsiaalselt (kontsentratsioon üle rakkude voolanud gaasis, joonis 5, C.2). Kapillaari kaudu lisatava hapniku tõttu oli CO₂ kontsentratsioon rakkudeni jõudvas gaasisegus võrdeliselt seotud sellega, kui palju hapniku gaasisegule lisati. Lahutades rakkudeta söötmes mõõdetud CO₂ signaal rakkudega söötmes

mõõdetud sigaalilt saadi tegelik CO₂ eraldumine rakkudest (joonis 5). Ajaline nihe rakkudeta ja rakkudega söötme CO₂ kontsentratsiooni muutumises hapniku eemaldamisel ja lisamisel võimaldas hinnata rakkude reageerimise kiirust hapniku kontsentratsiooni muutustele (lisa 2).

2.2.6 Tsütokroomi optilise neeldumise mõõtmine

Tsitraaditsükkel on otseselt seotud hingamisahelaga, kus toimub O₂ neeldumine. Kuna hingamisahela ensüümid cyt-b ja -c (tsütokroomid b ja c) ning tsütokroomi oksüdaas neelavad valgust spektri sinises alas, siis normaliseeriti hingamisaktiivsus 418...422 nm lainepikkusega valguse neeldumise maksimumi suhtes rakuplaadil. Mõõtmised sooritati kerakujulises valgete seintega kambris, mida valgustati kahe LED valgusallikaga. Valgusallikate emissiooni maksimumid olid 408 ja 455 nm ja need katsid oma spektriga nii referentsala (395...400 nm ja 465...470 nm), cyt-b ja -c neeldumismaksimumi (418...422 nm) kui tsütokroomi oksüdaasi neeldumisvahemiku (435...450 nm). Optilise kambri kasutegur oli umbes 98%, seega läbis valgus kambrisse asetatud rakuplaati umbes 10 korda, võimendades neeldumissignaali märksa suuremaks kui rakkude optilise neeldumise mõõtmisel küvetis. Optilisest klaasist (1 mm paksusega, 83 mm läbimõõduga) valmistatud nummerdatud, kaalutud ja teada neeldumisega plaat asetati koos rakkude ja kaasatuleva söömtekogusega optilise kambri ekvaatorile mõõtmiseks. Valguse neeldumine registreeriti CCD (ingl Charge Coupled Device) spektro-radiomeetriga PS2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) fiiberoptilise kaabli kaudu.

Sooritati kolm paari mõõtmisi. Esiteks tühi kamber, teiseks kamber koos rakuplaadil olevate rakkude ja söötmega ja kolmandaks lisati kindel kogus söödet (500 µl). Igas paaris on kaks mõõtmist: kinnine kamber, kus mõõdeti kogu neeldumine ja teiseks avatud kamber kaetud musta karbiga – registreeris valguse, mis sattus otse detektorisse (ilma rakuplaati läbimata) ja mis lahutati mõõdetud signaalist maha. Viimase mõõtmisena mõõdeti spektroradiomeetri pimevool, mis lahutati samuti signaalist maha. Kolmanda ja teise paari vahest saame söötme neeldumise. Kuna me teame rakkudega kaasatulevat söötme kogust (kaalumise teel 0.2...0.3 g) saame nendest kolmest paarist vahena kätte rakkude neeldumise. Valguse neeldumine on kalibreeritud 1 mm² musta ruudu suhtes. Seega optiline neeldumine rakkude pealt oli vastavalt võrdeline x mm² musta pinnaga, mis neelaks antud lainepikkuste vahemikus. Erineva rakuarvuga saadud optilised mõõtmised on esitatud lisa 1.

2.2.7 Andmete kogumine ja töötlus

Hingamise signaalid registreeriti arvutiga, kasutades 12-bit A/D konverterit ADIO 1600 (Kontron, San Diego, CA). Süsteemi opereeriti programmiga RECO (Fast-Est, Tartu, Estonia). Esmane andmetöötlus toimus programmis RDA (Fast-Est, Tartu, Estonia) ja edasine töötlus Excelis. Rakkude CO₂ eraldumise ja optilise neeldumise ning CO₂ eraldumise ja rakkude arvu vahelised regressioonanalüüsid tehti programmis RStudio.

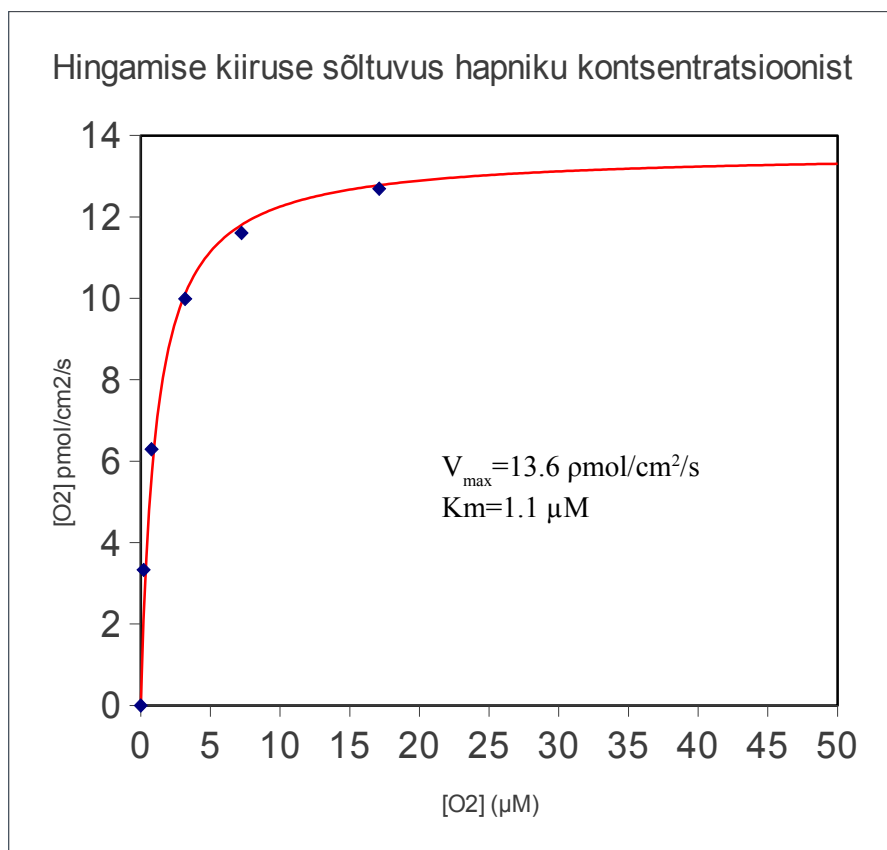
2.3 Tulemused

2.3.1 Sf9 rakkude hingamise K_m

Erinevate hapniku kontsentratsioonide juures saadud hapniku tarbimise kiirused on paigutatud graafikule joonisel 6. Hapniku kontsentratsioonist sõltuvat hapniku tarbimise kiirust

väljendab joonisel punane joon, mida kirjeldab võrrand $V = \frac{V_{max} * [O_2]}{K_m + [O_2]}$. V_{max} tähendab

reaktsiooni maksimaalset kiirust, kui hapniku kontsentratsioon on küllastav (st. reaktsiooni kiirus ei ole piiratud substraadi saadavusega). K_m on antud katsete järgi hapniku kontsentratsioon, mille juures kulgeb hapnikku tarbiv reaktsioon poole kiirusega maksimaalsest (V_{max}). Katseteks valitud 1.75% hapnikuga gaasisegu oleks andnud rakkude juures hapniku kontsentratsiooniks $18.29 \mu M$ ja hapniku tarbimise kiiruseks seega $12.83 \text{ pmol/cm}^2/\text{s}$. Valitud hapniku kontsentratsiooni lugesime oma katsetes normoksiliseks.

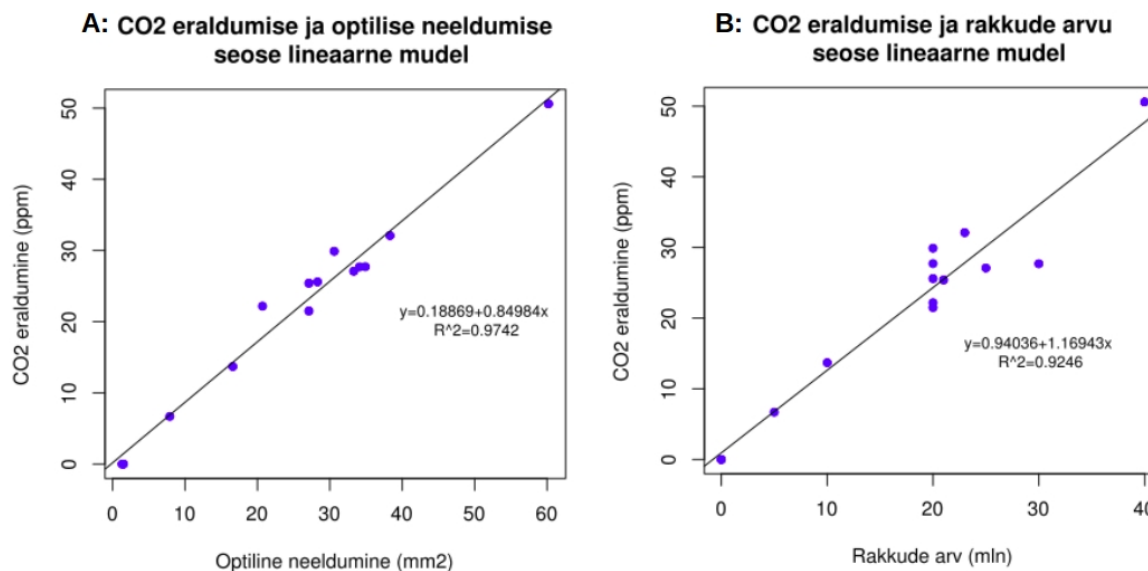


Joonis 6: Hapniku tarbimise kiiruse sõltuvus hapniku kontsentratsioonist. ♦ on erinevate katsetega saadud hingamise kiirused vastavatel hapniku kontsentratsioonidel.

2.3.2 Optilise neeldumise ja rakkude hulga lineaarne regressioon

Rakkude poolt eraldatud CO₂ mõõtmisel saadi hingamise aktiivsuse graafikud, mis kirjeldasid hingamise kiirust (joonis 5). Mõõtekambris registreeritud hingamisaktiivsus normaliseeriti sama rakuplaadi optilise neeldumise suhtes, mis on korrelatsioonis mõõdetud rakkudes leiduvate mitokondrite hulgaga. Et hinnata, kuidas on rakukultuuri optiline neeldumine seotud hingamise aktiivsusega ning selgitamaks, kas tegu on piisavalt hea rakumassi indikaatoriga, koostati lineaarse regressiooni mudelid nende tunnuste vahel.

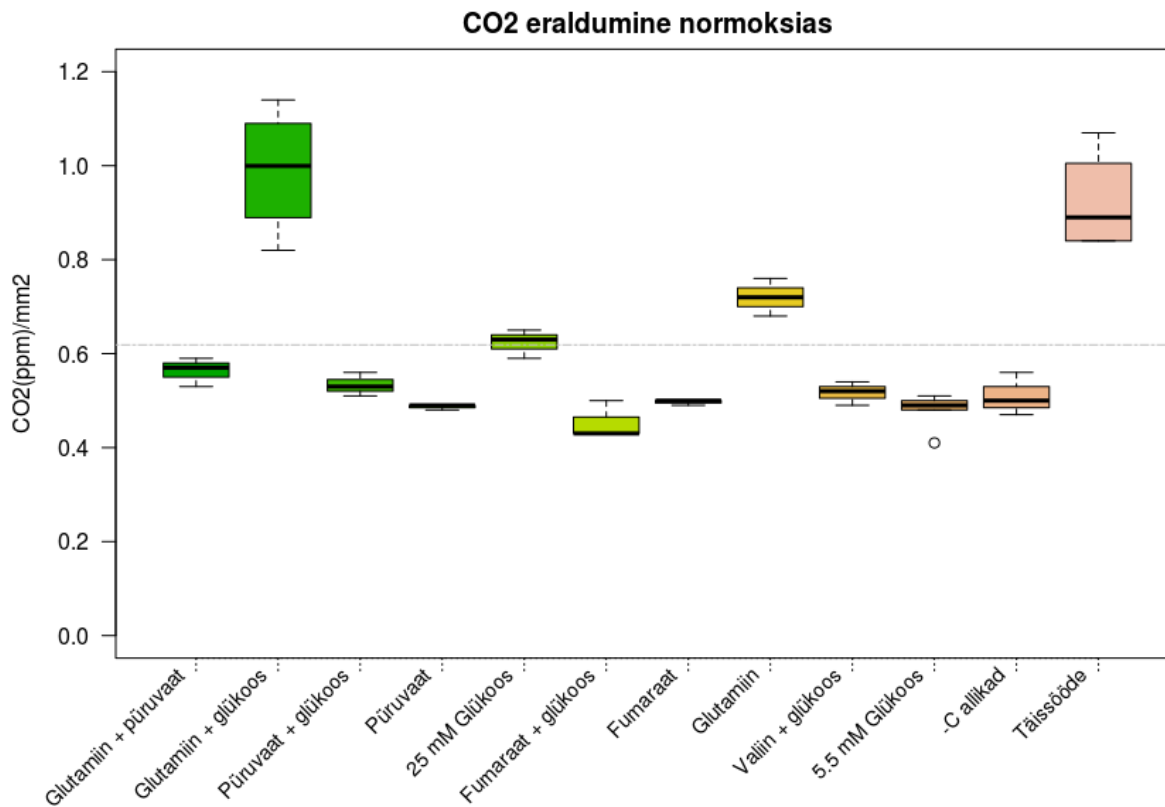
Regressioonanalüüs näitas (joonis 7), et optilises kambris määratud rakumass on paremas vastavuses hingamisaktiivsusega kui rakkude arv enne klaasile külvamist (R² väärtused vastavalt 0.96 ja 0.87).



Joonis 7: Lineaarsed mudelid rakkude CO₂ hingamise prognoosimiseks. ● - katsete punktid.

2.3.3 Rakkudest eralduva CO₂ mõõtmine normoksias

Kõige suuremat hingamisaktiivsust näitasid normoksias rakud (joonis 6), mis kasvasid söötmel, kus peamiseks süsinikuallikaks olid korraga glutamiin ja glükoos (0.99 ppm/mm²). Kõige väiksem hingamisaktiivsus registreeriti rakkudes, mis kasvasid glükoos+fumaraat söötmes (0.45 ppm/mm²). Ilma täiendava süsinikuallikata söötmes (sööde, mis sisaldab raku elutegevuseks vajalike aminohapete baassegu) oli hingamisaktiivsus 0.51 ppm/mm². Enamus süsinikuallikate kombinatsioonidest andsid hingamisaktiivsuse vahemikus 0.45 ja 0.56 ppm/mm².

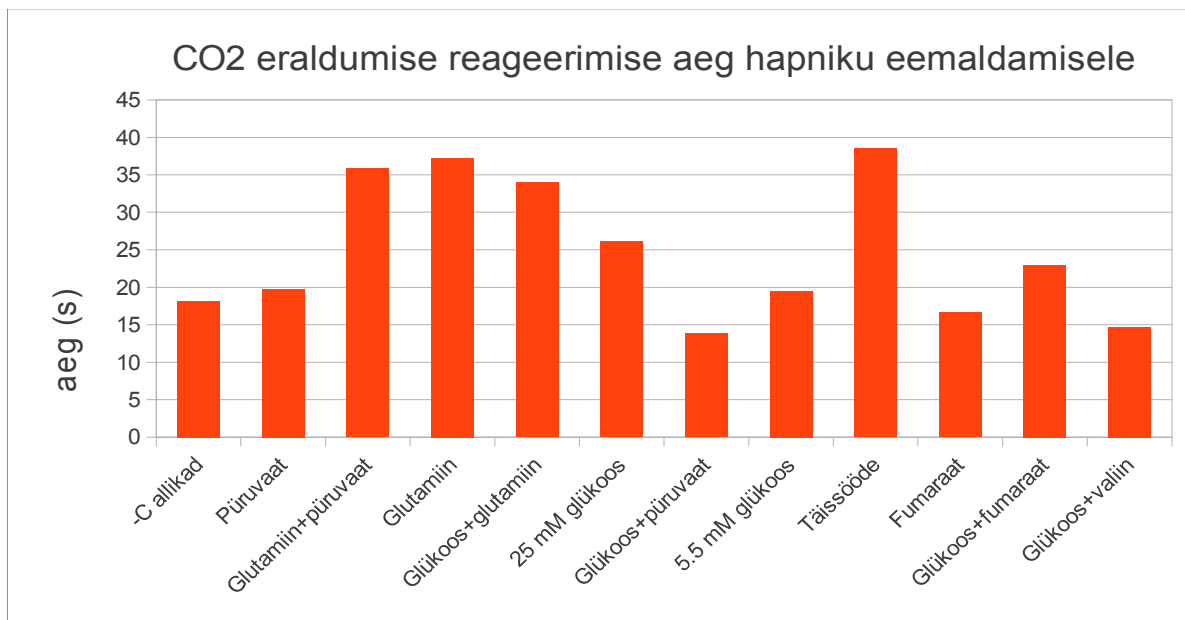


Joonis 8: Optilise neeldumise järgi normaliseeritud rakkude hingamine erinevates söötmetes normoksias.

Keskmisest kõrgemat hingamisaktiivsust näitasid rakud kõrge glükoosisaldusega (25 mM) söötmes (0.62 ppm/mm²) ja glutamiiniga täiendatud söötmes (0.72 ppm/mm²). Suurem CO₂ eraldumine viitab aktiivsemale tsitraaditsüklile ja ühtlasi ka suuremale hingamisahela aktiivsusele, mida väljendab O₂ neeldumine (seda antud katses ei registreeritud). Kõige suuremat hingamisaktiivsust näitasid rakud seega söötmetes, kuhu oli lisatud nii glükoosi kui glutamiini, mis varustavad tsitraaditsükli substratidega erinevate sisendite kaudu.

2.3.4 Rakkudest eralduva CO₂ mõõtmise anoksias

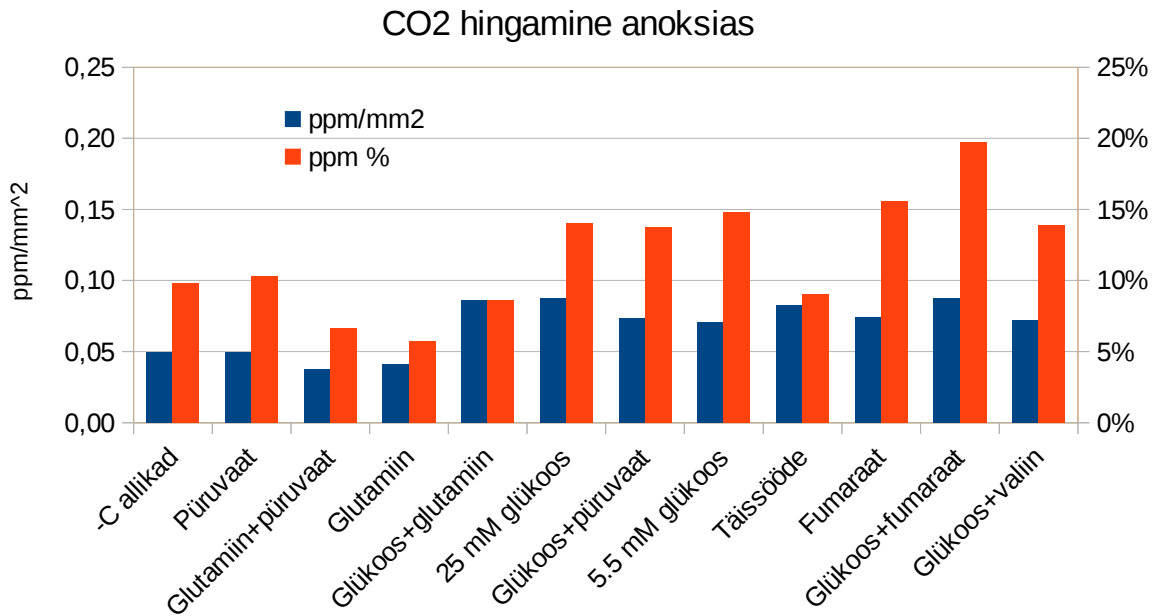
Ootuspäraselt vähenes hapniku eemaldamisel gaasivoost rakkude poolt väljutatud CO₂ kogus ehk langes hingamisaktiivsus. Rakkude hingamine reageeris erinevates söötmetes hapniku eemaldamisele ja lisamisele erineva kiirusega. CO₂ eraldumise reageerimise aja erinevus hapnikutaseme muutusele leiti CO₂ eraldumise languse ja O₂ kontsentratsiooni languse keskpunktide vahena (CO₂ kontsentratsiooni muutus vastab O₂ kontsentratsiooni muutusele) ja normaliseeriti hingamise kiiruse suhtes (lisa 2). Hapniku eemaldamisele reageerisid kõige aeglasemalt rakud, mis kasvasid peamise süsinikuallikana glutamiini sisaldavatel söötmetel (34-39 s) (joonis 9). Ülejäänud söötmetel kasvanud rakkude reageerimine anoksiale jäi vahemikku 14-26 s. Söötmetes, kus rakkude hingamisaktiivsus reageeris anoksiale suhteliselt aeglaselt esines tihti ka suur varieeruvus, mis raskendas söötme koostise mõju statistilise olulisuse hindamist hapniku kadumisele reageerimises (lisa 4).



Joonis 9: CO₂ eraldumise reageerimise aeg hapniku eemaldamisel.

Normoksias keskmisest madalamat hingamisaktiivsust põhjustanud söötmetes jäi anoksias järgi umbes 10% normoksilisest hingamisaktiivsusest (joonis 10). Glutamiiniga täiendatud söötmetes (glutamiin ja glutamiin+püruvaat) oli anoksiline hingamisaktiivsus 6-7% normoksilisest aktiivsusest. Glükoosiga täiendatud söötmetes oli CO₂ eraldumine 14-15% normoksilisest baastasemest samas kui glükoosi ja glutamiiniga täiendatud söötmes oli see 9% (glutamiin vähendab glükoosi aktiveerivat mõju CO₂ eraldumisele). Ka täissöötmes (sisaldab glükoosi, glutamiini ja püruvaati) kasvanud rakud säilitavad anoksias 9% normoksilisest

baasaktiivsusest ja 1mM püruvaat praktiliselt mõju ei avalda. Positiivselt mõjub anoksias CO₂ eraldumisele kasvamine fumaraadiga täiendatud söötmetel. Söötmes, kus peamine süsinikuallikas oli fumaraat oli anoksiline hingamisaktiivsus CO₂ alusel mõõdetuna 16% ja glükoos+fumaraat söötmes (tundub, et nende mõju osaliselt liitub) 20% normoksilisest tasemest. Valiini lisamine glükoosi sisaldavale söötmele ei omanud positiivset mõju kuigi valiin võib tsitraaditsükklisse siseneda süksinüül-CoA kaudu.

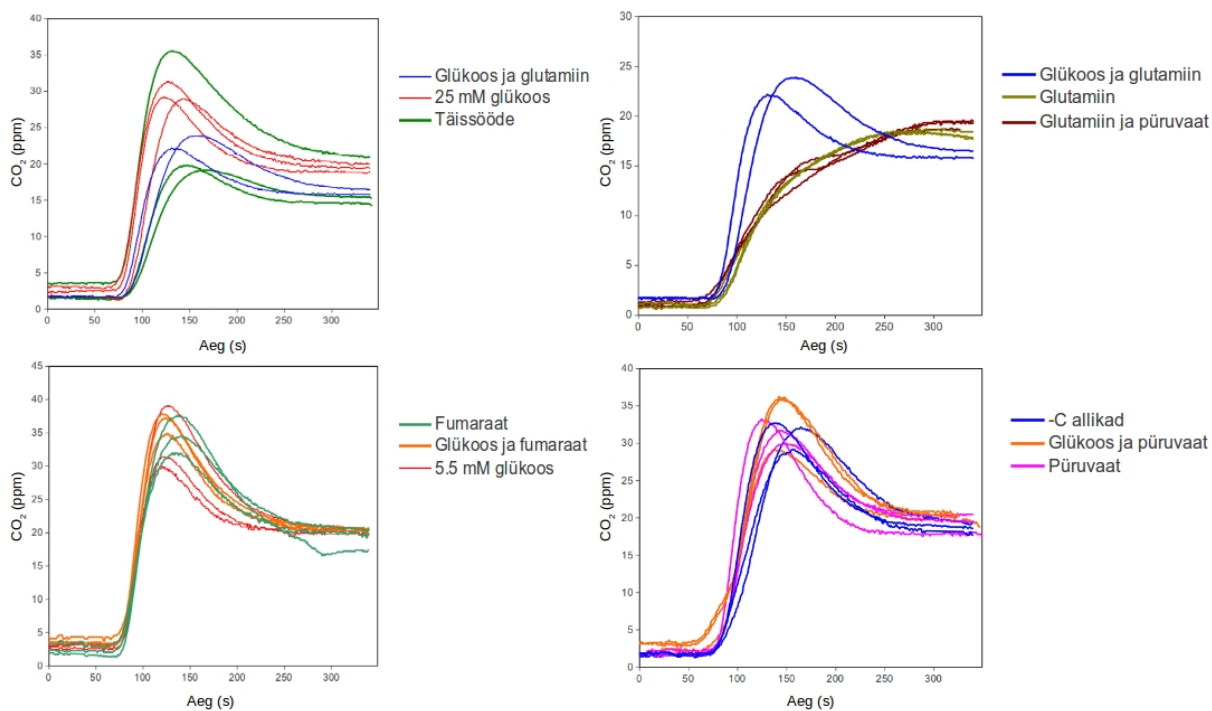


Joonis 10: CO₂ hingamine anoksias. ppm% - anoksia ja normoksia suhe. ppm/mm² - optilise neeldumise järgi normaliseeritud hingamine (ppm) anoksias.

Anoksias eristusid hingamise intensiivsuse järgi kaks gruppi. Söötmetes, kus puudus glükoos jäi hingamisaktiivsus 0.041-0.05 ppm/mm² vahemikku (joonis 10). Ülejäänud söötmete puhul jäi hingamisaktiivsus vahemikku 0.07-0.09 ppm/mm². Seost normoksia ja anoksia hingamise intensiivsuse vahel ei tuvastatud.

2.3.6 CO₂ eraldumise taastumine peale anoksiat

Anoksiast taastumisel (üleminek anoksiast normoksiasse) oli glutamiinil negatiivne mõju CO₂ eraldumisele. See toimus aeglasemalt söötmetes, mida täiendasid glutamiin või glutamiin+püruvaat (vastavalt 34 s ja 29 s) (lisa 4). Glükoos neutraliseeris glutamiini mõju suurel määral tuues taastumise 11 sekundi peale. Lisanditeta söötme puhul oli taastumine 10 s ja glükoosiga söötmes alla 10 sekundi alla. Fumaraadil paistis olevat positiivne mõju hingamisaktiivsuse taastumisele, mis võimaldas rakkudel praktiliselt samaaegselt hapniku peale tulemisega CO₂ eraldumine taastada. Glutamiini ja glutamiin+püruvaat kombinatsiooni sisaldavad söötmed olid erilised ka teisest aspektist. Nendes söötmetes ei esinenud anoksiast normoksiasse üleminekul lühiajalist CO₂ väljalööki (baastasemest suuremat CO₂ eraldumist) nagu teiste söötmete puhul vaid taastumine oli sujuvam (joonis 11).



Joonis 11: CO₂ eraldumise taastumine peale 30 minutit anoksiat erinevates söötmetes.

Väljalöögi integraal (CO₂ kumulatiivne eraldumine väljalöögi vältel) normaliseerituna raku massi suhtes oli praktiliselt sama (~15 ppm/mm²). Taastumine võrreldes baastasemega (normoksiline aktiivsus enne anoksiasse minekut) oli kõigil keskmiselt üle 92%. Glükoos+valiin, glutamiini, 25 mM glükoosi ja glutamiin+püruvaat täiendusega söötmetes taastus hingamine 95% - 100% ulatuses. Kõige kehvemat taastumist näitasid rakud, millel oli olnud kõrge baasaktiivsus st. rakud, mis kasvasid täissöötmes (taastumine 92.6%) ja glükoos+glutamiin söötmes

(taastumine 92.1%). Teiste söötmetes oli hingamine isegi suurenenud baastasemega võrreldes, kusjuures fumaraadiga täiendatud söötmes moodustas hingamine ~107% baastasemest (lisa 3).

ARUTELU

Rakkude elutegevuse käigus eralduva CO₂ mõõtmine iseloomustab ennekõike tsitraaditsükli toimimist, kuna sinna kuulub kolm dekarboksüleerimisreaktsiooni, mille kõrvalproduktiks on CO₂. Lisaks tsitraaditsüklile eraldub CO₂ ka pentoosfosfaadiraja ühes reaktsioonis, kuid käesoleva töö metoodikaga ei ole võimalik tuvastada eraldunud CO₂ biokeemilist päritolu. Ülejäänud CO₂ produtseerivate biokeemiliste reaktsioonide panus CO₂ tootmisesse rakkudes on tõenäoliselt marginaalne. Kuna tsitraaditsükli sisenavad süsinikühendid on hästi kirjeldatud, siis lisasime rakkude kasvusöötmesse vastavaid ühendeid, et tuvastada tsitraaditsükli toimimist normoksia ja anoksia tingimustes.

Söötmes, kus puudusid täiendavad C-allikad peale standardse aminohapete segu, jäi hingamisaktiivsus 0.51 ppm/mm² juurde. Selle taseme juures oli CO₂ eraldumine ka enamuse lisatud süsinikallikate puhul. Võib arvata, et süsinikuallikad, mis ei omanud mõju CO₂ eraldumisele ei täiendanud tsitraaditsükli toimimist olulisel määral. Kõige rohkem suurendasid CO₂ eraldumist ja eelduste kohaselt ka tsitraaditsükli aktiivsust söötmed, kuhu oli lisatud nii glutamiini kui glükoosi, mis on kaks peamist tsitraaditsükli toetavat süsinikuallikat läbi püruvaadi ja α-ketoglutaradi (Cantor ja Sabatini, 2012). Madalam CO₂ eraldumine glutamiini ja püruvaadi kombinatsiooniga täiendatud söötmes võis tuleneda sellest, et 1 mM püruvaat oli 16 tunni jooksul, mis katsele eelnes, juba suure osas ära tarbitud ja ei toetanud tsitraaditsükli toimimist. Samas omas püruvaat metabolismile siiski mõju, vähendades CO₂ eraldumist glutamiin+püruvaat täiendusega söötmes. Samuti võis püruvaadiga täiendatud söötmetes näha anoksiast taastumisel omapärast taastumise dünaamikat. Kõrge glükoosi kontsentratsiooniga (25 mM) ja glutamiiniga täiendatud söötmetes esines minimaalsest aktiivsusest suurem hingamisaktiivsus, mis viitab sellele, et need ühendid suurendavad tsitraaditsükli substraatide saadavust.

Hapniku eemaldamisel saab tsitraaditsükli toimimisele kõige suuremaks takistuseks redutseeritavate ühendite nagu NAD⁺ ja NADP⁺ puudus, kuna oksüdatiivne fosforüülimine lakkab hapniku puuduses töötamast ning reduktiivset jõu tarbimine väheneb (Sun *et al.*, 2012). Võimalik, et suurema hingamisaktiivsusega söötmetes kestis CO₂ eraldumine just seetõttu kauem, et rakkude NADH ja NADPH kontsentratsioonid hoiti pidevalt madalal ja neile sai hapniku kadumisel kauem elektrone kanda. Hingamisaktiivsus langes aeglaselt glutamiini sisaldavates söötmetes, mis viitab glutamiini olulisele mõjule NADH tasakaalule. Lähtudes sellest, et NAD⁺ puudusel tekkiv raku ülereadutseerumine pirdudab tsitraaditsükli toimimist ja sellega

CO₂ eraldumist, siis võib spekuloida, et glutamiini süsinikuallikana kasutavad rakud ei lähe nii kiiresti reduktiivsesse stressi, kui näiteks glükoosi tarbivad rakud.

See, et kõigi söötmete puhul säilis anoksias CO₂ tootmine teataval määral viitab sellele, et isegi hapniku puudumisel jätkub rakus toitainete oksüdeerimine kas tsitraaditsükli või pentoosfosfaadi rajas (või mõlemas). Anoksias oli CO₂ eraldumine alati baastasemest väiksem, mis viitab reduktiivse stressi tsitraaditsükli inhibeerivale mõjule (reduktiivset stressi otseselt käsitlevas töös ei hinnatud). Baastasemega võrreldes säilis CO₂ eraldumine suuremal määral rakkudes, mis kasvasid fumaraadi ja glükoosiga täiendatud söötmetel. Glutamiiniga täiendatud söötmetel oli täheldatav keskmisest madalam hingamisaktiivsus anoksias baastasemega võrreldes. Põhimõtteliselt on võimalik, et glükoosiga täiendatud söötmes eraldub märkimisväärne osa CO₂-e pentoosfosfaadi raja kaudu. Seda toetab fakt, et anoksias inhibeeritakse PHD-d, mis takistab glükoosil tsitraaditsükli kaudu CO₂-ks oksüdeeruda (Kim *et al.*, 2006; Stanley *et al.*, 1997).

Fumaraat mõjutab positiivselt CO₂-e eraldumise jääkaktiivsust anoksias kui ka hingamise taastamise kiirust üleminekul anoksiast normoksiasse. Võimalik, et see tuleneb võimest vastu võtta üleliigset reduktiivjõudu ning sellega vähendada reduktiivjõu inhibeerivat mõju tsitraaditsükli aktiivsusele.

Kuna glutamiin ei ole otseselt pentoosfosfaadi raja substraadiks siis on tema panus CO₂ tootmisesse anoksias on väiksem ja sõltub eelkõige tsitraaditsükli aktiivsusest. Vastuoluline on aga asjaolu, et glutamiini juuresolekul väheneb ka glükoosi mõju CO₂ eraldumisele. Kui glutamiini kasutatakse läbi reduktiivse karboksüleerimise lipiidide sünteesiks võiks NADPH vajaduse tõttu kasvada ka pentoosfosfaadi raja kaudu tulev CO₂ hulk, kuid siin me seda ei näe, kuna antud töös puuduvad andmed CO₂-e biokeemilise päritolu kohta (Filipp *et al.*, 2012; Gameiro *et al.*, 2013).

Glutamiin mõjutab tõenäoliselt siiski oluliselt anoksias raku metabolismi, sest normoksia taastamisel on CO₂ peale tulek oluliselt aeglasem nendes söötmetes, kus esineb glutamiini. Võib oletada, et glutamiini kaudu püsib anoksias mitokondri [NADH] kõrgem kui teistes söötmetes, mis ei lase tsitraaditsükli kiirelt tööle hakata normoksia taastamisel. Samas on võimalik ka teine stsenaarium, kus tsitraaditsükli toitmisel glutamiiniga koguneb mitokondrisse vähem reduktiivse potentsiaaliga vaheühendeid, mistõttu normoksilise hapniku kontsentratsiooni taastamisel on tsitraaditsükli saadaval vähem oksüdeeritavat substraati ja seetõttu näeme aeglasemat CO₂

eraldumist. Sellise stsenaariumi puhul võiks eeldada, et üleminekul anoksiast normoksiasse tekib vähem oksüdatiivset stressi, kuna vabu elektrone on vähem. Glutamiinile vastupidise efektiga on fumaraat, mille toime oli normoksias hingamisaktiivsus võrdlemisi madal, anoksias jääk hingamise osakaal suhteliselt suur ja taastumine kiire. Kui glutamiin on anaplerootiline tsitraaditsükli substraat siis tundub, et fumaraat mõjutab tsitraaditsükli kataplerootilisi reaktsioone ja vähendab mitokondri reduktiivset potentsiaali. Kindlasti on hingamisaktiivsuse taastumise kiirus sõltuv ka mitokondrivälistest teguritest nagu glükolüütilise raja ensüümid aktiivsus ja laktaat-pürivaat tasakaal, mis on omakorda mõjutatud hapniku kontsentratsioonist ja mitokondriaalsest redokstasakaalust.

Hingamise osaline taastumine baastasemega võrreldes peale anoksiat võis tuleneda rakkude kahjustumisest näiteks anoksias kogunenud reduktiivse jõu või normoksiasse üleminekul tekkinud oksüdatiivse stressi tõttu. Samuti võib eeldada, et anoksias toimub mitokondrite hulga vähenemine, kuna HIF-1 aktiveerib mitofaagiat (Zhang *et al.*, 2008). Täissöötmes ja glükoos+glutamiin täiendusega söötmes kõrget hingamisaktiivsust näidanud rakud paistsid anoksiale tundlikumad ja taastusid sellest halvemini. Normoksia taastamisel võisid kahest punktist tsitraaditsükli toitvad substraadid hingamisahela üle koormata suure hulga vabade elektronidega, mis hingamisahelast pääsemisel võivad viia rakku kahjustavate reaktiivsete hapnikuühendite tekkimiseni (Madungwe *et al.*, 2016).

Katseteks valitud Sf9 rakuliin pole ideaalne mudel inimese rakkude metabolismi uurimiseks. Käesolevas töös tehti valik selle kasuks, kuna tal on suur hingamisaktiivsus, mis lihtsustas TÜTI teadlaste poolt ehitatud CO₂ ja O₂ voogude analüüsisüsteemi testimist loomsetel rakukultuuridel. Edaspidi soovime analüüsida inimese ja teiste imetajate rakuliine, kus on eemaldatud olulised hüpoksiaregulatsiooniga seotud faktorid (näit HIF-1 ja VHL), et paremini mõista kuidas regulatoorsed mehhanismid metabolismi (sh. Hingamisaktiivsust) ümber kujundavad. Käesolevas töös saadud tulemused on üldistatavad metodoloogilisest aspektist, mis tähendab, et sarnast katseskeemi saab kasutada ka teistes rakutüüpides tsitraaditsükli aktiivsuse ja hapnikupuuduse koosmõjude hindamiseks.

KOKKUVÕTE

Antud magistritöö tulemused näitavad, et raku säilib ka anoksia tingimustes toitainete oksüdeerimine CO₂-ks sõltumata toitainetest. Samuti leidis kinnitust, et rakk vajab tsitraaditsükli efektiivsemaks toimimiseks rohkem kui ühte tsitraaditsükli substraadina toimivat süsinikuallikat. Süsinikuallikate valikust ja kättesaadavusest sõltub, kuidas tsitraaditsükkel anoksiast taastumisel tööle hakkab. Glükoosi ja glutamiini erinev mõju tulemustele tekitab küsimuse nende kahe metaboliidi radade kattuvusest ja omavahelisest mõjust anoksias. Et metabolismivõrgustikud on väga suured ja kompleksed tuleks edaspidi kasutada metabolismi mudeldamist kui tööriista, millega leida asjakohased ja spetsiifilised reaktsioonid, mis aitaksid neid kattuvusi anoksias kirjeldada.

Kui glutamiiniga söötme aeglane CO₂ eraldumise taastumine tuleneb kogunenud reduktiivsest potentsiaalst (NADH ja tsitraaditsükli vaheühendid), mis kasutatakse enne ära kui CO₂-te tootvad reaktsioonid saavad tööle hakata siis võiks eeldada ka suuremat hapniku tarbimist kui teistes söötmetes. Selle kontrollimiseks tuleks samaaegselt mõõta hapniku tarbimist, mis on ka edaspidistes katsetes plaanis.

Sf9 rakkude võimalike anoksias toimivate metabolismiradade kirjeldamine viib parema mõistmiseni ka inimese rakkudes võimalikest radadest. Kõigi võimalike radade täpsem kirjeldamine annab võimaluse paremini sekkuda ka terapeutiliselt olukordades, kus rakkude elumus tuleb säilitada ka anoksilistes tingimustes või ennetada rakkude suuremist hapniku taastumisel. Antud töö ei olnud aga oluline ainult tulemuste poolest, vaid aitas lihvida meetodit, millega oleks ka inimese rakkudel võimalik hingamist mõõta.

Evaluating metabolism through CO₂ production in normoxia and anoxia in Sf9 cell line.

Hans Vellama

Abstract

Cells get their energy from nutrition and respiration. Citrate cycle uses carbon rich metabolites to create reductive potential which can be used to synthesise ATP through oxidative phosphorylation. In doing so, cells produce CO₂ and consume O₂. When oxygen is absent, oxidative phosphorylation no longer works, but citrate cycle still does. As the reductive potential is not fully used it accumulates and causes reductive stress. Recently it has emerged that the reductive stress plays a key role in producing damage in pathologies like ischemia reperfusion injury.

While measuring oxygen to understand metabolism is common, then measuring of CO₂ is quite rare. This study was focused on measuring CO₂ emission from *Spodoptera frugiperda* cell line Sf9 to evaluate the metabolic activities of the citric cycle in normoxia and anoxia. Experiments were done in media with selectively chosen carbon sources.

For all different culture media the cells gave of some amount of CO₂ in 30 minute anoxia. The remaining portion of CO₂ emission was in correlation with the media used to grow the cells in, but not with the respiration rate in previous normoxia. The two main carbon sources for cells, glutamine and glucose together gave the best CO₂ emission in normoxia, but had very different influences on anoxic CO₂ emission and the recovery from anoxia when used separately. Cells in media supplemented with glucose gave higher CO₂ emission in anoxia and created a short peak in CO₂ emission when respiration was restored with normoxic O₂. Glutamine on the other hand lowered the CO₂ production in anoxia and didn't create a CO₂ peak when oxygen was restored. This suggests that the reductive potential is high in those cells and the citric acid cycle cannot resume work before this potential is used. The least effective recovery was measured in media where cells respired the best, having both glucose and glutamine in it.

Tänuõnad

Minu suur tänu läheb ennekõike juhendajale Hendrik Luukile, kes pakkus välja võimaluse teha magistritöö nii huvitavas ja lõputult komplekses teemas nagu seda on metabolism. Tema ratsionaalne lähenemine aitas nii mõnigi kord kaoses korda luua. Tänan oma juhendajat Kattri-Liis Esklat, kes alati abivalmilt kõigile küsimustele vastas ja rakukultuuridega toime tulemist õpetas.

Ma tänan alati rõõmsameelset Eva Žusinaitet, kes alati abivalmilt nõu ja tarkusega toetas minu toimetamisi.

Suur tänu läheb Agu Laisale, Hillar Eichelmannile ja Vello Ojale, ilma kelleleta poleks need katsed võimalikud olnud. Tänan, et kannatasite ära noore tuulepea nagu mina ja selgitasite probleeme ka peale kümnendat küsimist.

Suur tänu ka kõigile keda eraldi ei maininud, kuid kes aitasid kaasa ja tegid võimalikuks selle töö valmimise.

Kasutatud kirjandus

- Alves, T.C., Pongratz, R.L., Zhao, X., Yarborough, O., Sereda, S., Shirihai, O., Cline, G.W., Mason, G., and Kibbey, R.G. (2015). Integrated, step-wise, mass-isotopomeric flux analysis of the TCA Cycle. *Cell Metab.* 22, 936–947.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Glycolysis Is an Energy-Conversion Pathway in Many Organisms.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 581, 3582–3591.
- Brand, M.D., and Nicholls, D.G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297–312.
- Cantor, J.R., and Sabatini, D.M. (2012). Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discov.* 2, 881–898.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem.* 217, 383–393.
- Chandel, N.S., Budinger, G.R.S., and Schumacker, P.T. (1996). Molecular Oxygen Modulates Cytochrome c Oxidase Function. *J. Biol. Chem.* 271, 18672–18677.
- Chen, H., Wang, C., Wei, X., Ding, X., and Ying, W. (2015). Malate-Aspartate Shuttle Inhibitor Aminooxyacetate Acid Induces Apoptosis and Impairs Energy Metabolism of Both Resting Microglia and LPS-Activated Microglia. *Neurochem. Res.* 40, 1311–1318.
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., et al. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431–435.
- Fan, J., Hitosugi, T., Chung, T.-W., Xie, J., Ge, Q., Gu, T.-L., Polakiewicz, R.D., Chen, G.Z., Boggon, T.J., Lonial, S., et al. (2011). Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 31, 4938–4950.
- Filipp, F.V., Scott, D.A., Ronai, Z.A., Osterman, A.L., and Smith, J.W. (2012). Reverse TCA cycle flux through isocitrate dehydrogenases 1 and 2 is required for lipogenesis in hypoxic melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 375–383.
- Foster, K.A., Beaver, C.J., and Turner, D.A. (2005). Interaction between tissue oxygen tension and NADH imaging during synaptic stimulation and hypoxia in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 132, 645–657.
- Gameiro, P.A., Yang, J., Metelo, A.M., Pérez-Carro, R., Baker, R., Wang, Z., Arreola, A., Rathmell, W.K., Olumi, A., López-Larrubia, P., et al. (2013). In Vivo HIF-Mediated Reductive Carboxylation Is Regulated by Citrate Levels and Sensitizes VHL-Deficient Cells to Glutamine Deprivation. *Cell Metab.* 17, 372–385.

- Garlid, K.D. (2004). Chemiosmotic Theory. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, W.J. Lennarz, and M.D. Lane, eds. (New York: Elsevier), pp. 405–412.
- Gerencser, A.A., Neilson, A., Choi, S.W., Edman, U., Yadava, N., Oh, R.J., Ferrick, D.A., Nicholls, D.G., and Brand, M.D. (2009). Quantitative Microplate-Based Respirometry with Correction for Oxygen Diffusion. *Anal. Chem.* *81*, 6868–6878.
- Gnaiger, E., Steinlechner-Maran, R., Méndez, G., Eberl, T., and Margreiter, R. (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.* *27*, 583–596.
- Hafner, R.P., and Brand, M.D. (1991). Effect of protonmotive force on the relative proton stoichiometries of the mitochondrial proton pumps. *Biochem. J.* *275*, 75–80.
- Hafner, R.P., Brown, G.C., and Brand, M.D. (1990). Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the “top-down” approach of metabolic control theory. *Eur. J. Biochem.* *188*, 313–319.
- Hansford, R.G., and Cohen, L. (1978). Relative importance of pyruvate dehydrogenase interconversion and feed-back inhibition in the effect of fatty acids on pyruvate oxidation by rat heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* *191*, 65–81.
- Hardie, D.G., and Hawley, S.A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays* *23*, 1112–1119.
- Jiang, P., Du, W., and Wu, M. (2014). Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell* *5*, 592–602.
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* *3*, 177–185.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* *443*, 787–795.
- Lin, X., David, C.A., Donnelly, J.B., Michaelides, M., Chandel, N.S., Huang, X., Warrior, U., Weinberg, F., Tormos, K.V., Fesik, S.W., et al. (2008). A chemical genomics screen highlights the essential role of mitochondria in HIF-1 regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 174–179.
- Lucarelli, G., Galleggiante, V., Rutigliano, M., Sanguedolce, F., Cagiano, S., Bufo, P., Lastilla, G., Maiorano, E., Ribatti, D., Giglio, A., et al. (2015). Metabolomic profile of glycolysis and the pentose phosphate pathway identifies the central role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in clear cell-renal cell carcinoma. *Oncotarget* *6*, 13371–13386.
- Madungwe, N.B., Zilberstein, N.F., Feng, Y., and Bopassa, J.C. (2016). Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* *6*, 93–108.

- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380–384.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Nicholls, D.G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* 38, 311–317.
- Nielsen, T.T., Støttrup, N.B., Løfgren, B., and Bøtker, H.E. (2011). Metabolic fingerprint of ischaemic cardioprotection: importance of the malate-aspartate shuttle. *Cardiovasc. Res.* 91, 382–391.
- Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* 148, 1145–1159.
- Osada-Oka, M., Hashiba, Y., Akiba, S., Imaoka, S., and Sato, T. (2010). Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α under hypoxia: contribution of the pentose phosphate pathway to this stabilization. *FEBS Lett.* 584, 3073–3079.
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., and Duchen, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 711–723.
- Owen, O.E., Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2002). The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *J. Biol. Chem.* 277, 30409–30412.
- Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., and Simon, M.C. (2007). Multiple Factors Affecting Cellular Redox Status and Energy Metabolism Modulate Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Activity In Vivo and In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* 27, 912–925.
- Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39, 347–354.
- Percy, A.K. (2014). Respiratory Chain Disorders. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (Second Edition), (Oxford: Academic Press), pp. 17–21.
- Porter, R.K., and Brand, M.D. (1995). Mitochondrial proton conductance and H⁺/O ratio are independent of electron transport rate in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 310, 379–382.
- Rao, X., Duan, X., Mao, W., Li, X., Li, Z., Li, Q., Zheng, Z., Xu, H., Chen, M., Wang, P.G., et al. (2015). O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth. *Nat. Commun.* 6, 8468.

- Reynafarje, B., Costa, L.E., and Lehninger, A.L. (1985). O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal. Biochem.* *145*, 406–418.
- Santore, M.T., McClintock, D.S., Lee, V.Y., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2002). Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *282*, L727–L734.
- Scott, D.A., Richardson, A.D., Filipp, F.V., Knutzen, C.A., Chiang, G.G., Ronai, Z.A., Osterman, A.L., and Smith, J.W. (2011). Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines. *J. Biol. Chem.* *286*, 42626–42634.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 721–732.
- Semenza, G.L. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. J.* *405*, 1–9.
- Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 5447–5454.
- Solaini, G., and Harris, D.A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem. J.* *390*, 377–394.
- Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G., and Sgarbi, G. (2010). Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1797*, 1171–1177.
- Spriet, L.L., Howlett, R.A., and Heigenhauser, G.J. (2000). An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* *32*, 756–763.
- Stanley, W.C., Lopaschuk, G.D., Hall, J.L., and McCormack, J.G. (1997). Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc. Res.* *33*, 243–257.
- Sun, F., Dai, C., Xie, J., and Hu, X. (2012). Biochemical Issues in Estimation of Cytosolic Free NAD/NADH Ratio. *PLoS ONE* *7*.
- Taegtmeyer, H. (1978). Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circ. Res.* *43*, 808–815.
- Towler, M.C., and Hardie, D.G. (2007). AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ. Res.* *100*, 328–341.
- Vajrjala, V.S., Suraniti, E., Garrigue, P., Goudeau, B., Rigoulet, M., Devin, A., Sojic, N., and Arbault, S. (2014). Optical microwell array for large scale studies of single mitochondria metabolic responses. *Anal. Bioanal. Chem.* *406*, 931–941.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.

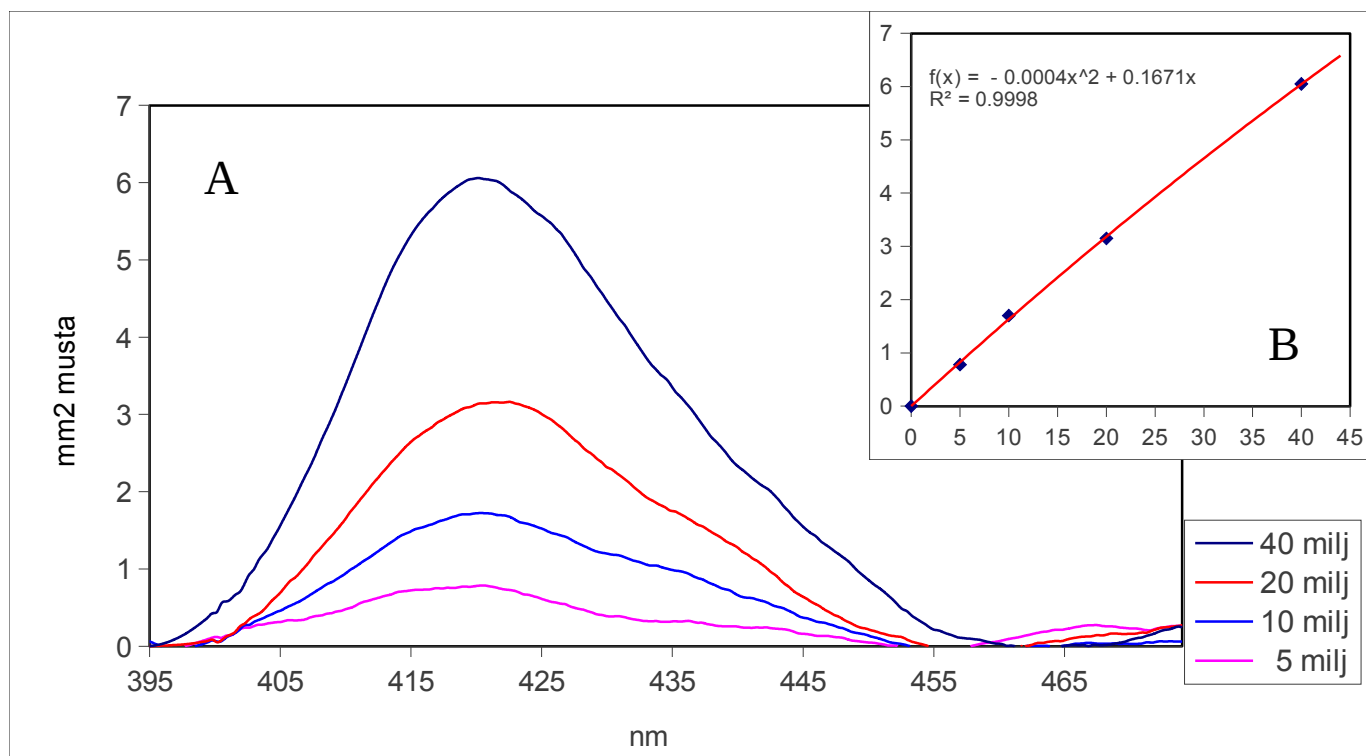
- Vanderperre, B., Bender, T., Kunji, E.R., and Martinou, J.-C. (2015). Mitochondrial pyruvate import and its effects on homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 35–41.
- Viollet, B., Athes, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., Lantier, L., Hebrard, S., Devin-Leclerc, J., Beauloye, C., et al. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 19–44.
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314.
- Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A., Roeser, N.F., and Nissim, I. (2000). Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2826–2831.
- Wiemerslage, L., and Lee, D. (2016). Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters. *J. Neurosci. Methods* 262, 56–65.
- Wiesner, R.J., Rösen, P., and Grieshaber, M.K. (1988). Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 40, 19–34.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., et al. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 292, C125–C136.
- Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283, 10892–10903.
- Zuurbier, C.J., Eerbeek, O., Goedhart, P.T., Struys, E.A., Verhoeven, N.M., Jakobs, C., and Ince, C. (2004). Inhibition of the pentose phosphate pathway decreases ischemia–reperfusion-induced creatine kinase release in the heart. *Cardiovasc. Res.* 62, 145–153.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

Lisa 1

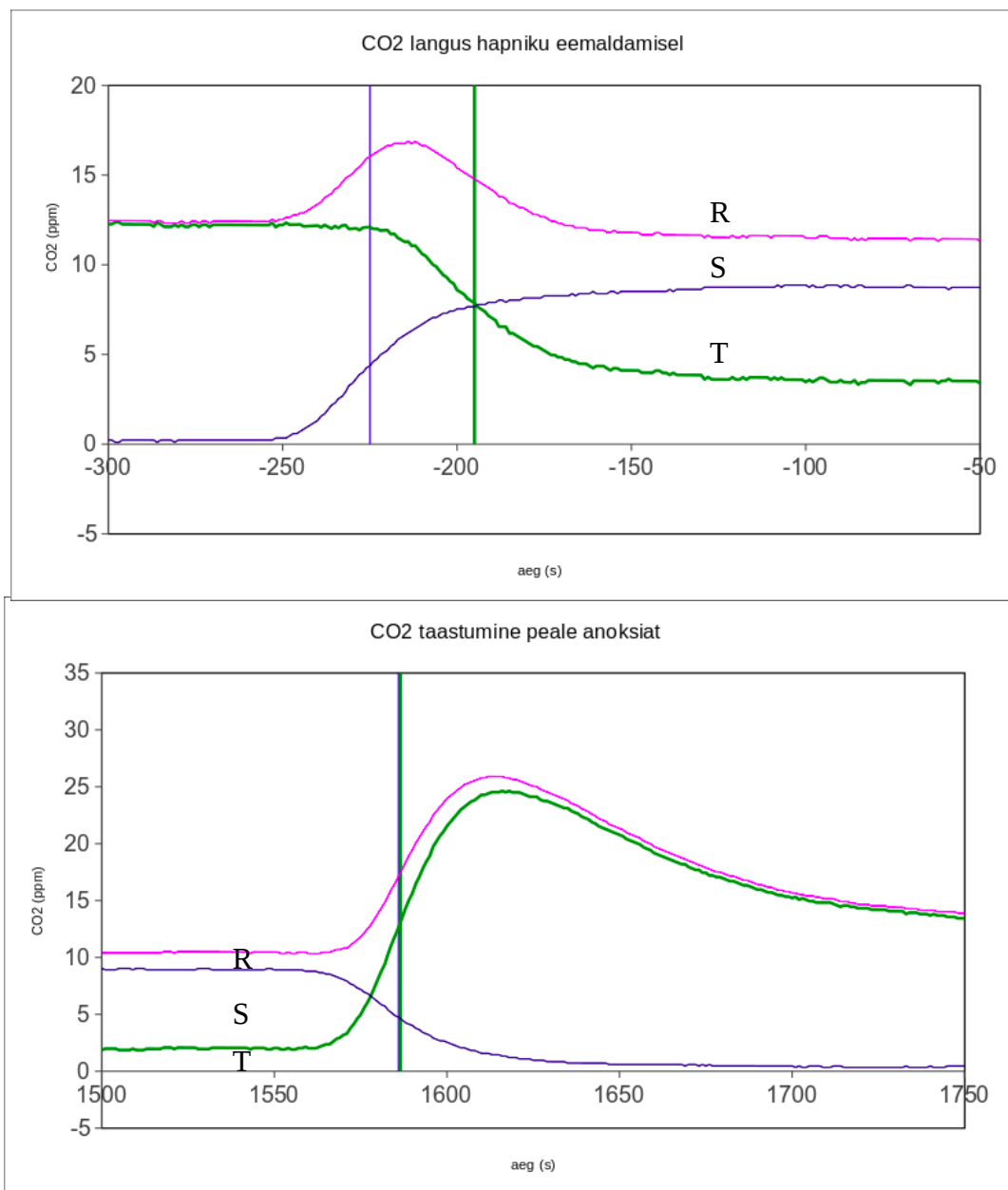
Erineva rakkude arvuga tehtud optilise neeldumise mõõtmised.



Joonis 12: A – Erineva rakkude arvu optiline neeldumine (mm² musta) vahemikus 395-470 nm. B – Rakkude arvu ja optilise neeldumise vaheline seos (y teljel - optiline neeldumine, x teljel - rakkude arv).

Lisa 2

CO₂ üleminekuageade mõõtmine normoksiast anoksiasse ja anoksiast normoksiasse.



Joonis 13: CO₂ hingamise üleminekuageade mõõtmine normoksiast anoksiasse ja anoksiast normoksiasse. – ilma rakkudeta 5.5 mM glükoosi sööde (S). – 5.5 mM glükoosi sööde rakkudega (R). – tegelik CO₂ hingamine (T = R - S)

Lisa 3

Tabel 3: CO2 hingamise andmed (sulgudes on mõõtmiste standardviga)

Sööde	ppm/mm ²	ppm/mm ² anoksias	anoksia/normoksia	Taastumise %
Täissööde	0.93 (0.04)	0.083 (0.01)	0.09 (0.01)	92.6 (2.96)
Glükoos ja fumaraat	0.45 (0.03)	0.09 (0.00)	0.20 (0.01)	104 (2.6)
-C allikad	0.51 (0.032)	0.050 (0.00)	0.10 (0.01)	101.0 (2.5)
Glutamiin ja püruvaat	0.56 (0.019)	0.037 (0.000)	0.07 (0.00)	99.8 (0.7)
Glutamiin	0.72 (0.029)	0.041 (0.003)	0.06 (0.00)	97.0 (1.9)
Glükoos ja glutamiin	0.99 (0.059)	0.086 (0.010)	0.09 (0.01)	92.1 (1.1)
25 mM glükoos	0.62 (0.02)	0.088 (0.01)	0.14 (0.02)	98.3 (0.18)
Glükoos ja püruvaat	0.53 (0.02)	0.073 (0.008)	0.14 (0.02)	101.1 (2.52)
5.5 mM glükoos	0.48 (0.02)	0.071 (0.008)	0.15 (0.02)	101 (2.28)
Püruvaat	0.48 (0.005)	0.050 (0.002)	0.10 (0.00)	105.5 (3.1)
Fumaraat	0.49 (0.00)	0.07 (0.01)	0.16 (0.02)	107 (3.3)
Glükoos ja valiin	0.52 (0.02)	0.07 (0.00)	0.14 (0.00)	95 (4.1)

Lisa 4

Tabel 4: CO₂ reageerimine hapniku kontsentratsiooni muutusele (sulgudes on mõõtmiste standardviga)

Sööde	CO ₂ piik O ₂ taastamisel ppm/mm ²	Hapniku maha võtmisel t(CO ₂)-t(O ₂)	Hapniku taastamisel t(CO ₃)-t(O ₂)
-C allikad	24.69 (3.41)	18.17 (1.25)	10.24 (3.52)
Püruvaat	21.00 (1.19)	19.78 (6.11)	5.94 (3.29)
Glutamiin ja püruvaat	-	35.84 (1.78)	29.08 (3.94)
Glutamiin	-	37.29 (6.78)	34.35 (2.18)
Glükoos ja glutamiin	24.37 (1.15)	33.99 (10.53)	11.00 (11.23)
25 mM glükoos	23.02 (3.43)	26.14 (1.32)	2.97 (4.91)
Glükoos ja püruvaat	26.71 (4.83)	13.83 (1.52)	8.33 (1.21)
5.5 mM glükoos	20.26 (4.41)	19.48 (2.21)	3.07 (3.14)
Täissööde	23.51 (4.54)	38.50 (9.13)	15.34 (12.41)
Fumaraat	31.18 (6.72)	16.63 (2.07)	0.12 (0.48)
Glükoos ja fumaraat	24.90 (2.82)	22.99 (3.92)	-0.80 (0.82)
Valiin	17.54 (3.72)	14.72 (1.03)	-2.14 (0.28)

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Hans Vellama (sünnikuupäev: 05.10.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Raku metabolismi hindamine normoksias ja anoksias CO₂-e järgi Sf9 rakuliinis.”

mille juhendajad on Hendrik Luuk, Kattri-Liis Eskla ja Tambet Tõnissoo

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.2017