

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

VHL geeni puudulikkus põhjustab neerurakkudes reduktiivset stressi

Bakalaureusetöö 12 EAP

Andria Hüva

PhD Kattri-Liis Eskla

PhD Lilian Kadaja-Saarepuu

Tartu 2023

VHL geeni puudulikkus viib neerurakkudes reduktiivse stressini

Von Hippel-Lindau (VHL) sündroom on pärilik haigus, mida põhjustavad mutatsioonid VHL geenis. VHL haigust põdevatel inimestel esineb kõige tihedamini heledarakulist neeru kartsinoomi (ccRCC). VHL-puudulikkus viib rakkudes hüpoksia indutseeritud faktori (HIF-1) kuhjumiseni. Kuna ccRCC ei ole seletatav ainuüksi HIF-1 signaaliraja aktivatsiooniga, siis uuriti käesolevas töös (1) kui palju sõltuvad VHL-puudulikud inimese neerurakud tsitraaditsüklist ja hingamisahelast, (2) mil määral esineb VHL-puudulikes rakkudes reduktiivset stressi ja (3) millised võimalused on selle vähendamiseks. Käesolev uurimistöö näitab, et VHL-puudulikes rakkudes ilmneb reduktiivne stress, mida iseloomustab kõrge NADH/NAD⁺ suhe. Reduktiivse stressiga kaasneb O₂ tarbimise ning CO₂ tootmise vähenemine, mis viitab tsitraaditsükli ja hingamisahela vähenenud aktiivsusele. Reduktiivset stressi vähendasid VHL-puudulikes rakkudes glükoosi eemaldamine ning püruvaadi või resasuriini lisamine söötmesse, mis suurendasid tsitraaditsükli ja hingamisahela aktiivsust.

Märksõnad: VHL, neeru kartsinoom, HIF-1, reduktiivne stress, hingamine

CERCS koodid: B470 Füsioloogia, P330 Bioenergeetika

Reductive stress in VHL deficient renal cells

Von Hippel-Lindau (VHL) is a hereditary cancer syndrome, caused by mutations in the VHL gene. Patients suffering from VHL syndrome frequently develop clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). It is well known that loss of VHL leads to the accumulation of HIF-1. However, ccRCC cannot be explained solely by activation of the HIF-1 pathway. To better understand underlying mechanisms, VHL deficient human renal cells were used as a model for ccRCC. Cellular respiration was monitored by measuring activities of citric acid cycle and electron transport chain. In addition, reductive stress and ways to mitigate it were studied. Present study shows that VHL deficiency leads to reductive stress in the RCC model that is characterised by increased NADH/NAD⁺ ratio and impaired citric acid cycle and electron transport chain activities as measured by CO₂ production and O₂ consumption, respectively. Reductive stress was mitigated by glucose depletion and supplementation with pyruvate or resazurin which augmented citric acid cycle and electron transport chain activities.

Key words: VHL, ccRCC, HIF-1, reductive stress, respiration.

CERCS code: B470 Physiology, P330 Bioenergetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 VHL puudulikkusest põhjustatud heledarakuline neerurakuline kartsinoom	7
1.2 Hüpoksia, pseudohüpoksia ja HIF-1 signaalirada.....	7
1.3 Mitokonder ja HIF-1 mõju hingamisele.....	9
1.4 Reduktiivne stress	11
2. PRAKTILINE OSA	13
2.1 Töö eesmärgid.....	13
2.2 Materjal ja meetodika.....	13
2.2.1 Rakukultuur	13
2.2.2 NADH/NAD ⁺ suhte mõõtmine.....	14
2.2.3 Hingamiskatse-eelsed tegevused rakukultuuridega.....	15
2.2.4 Rakuhingamise mõõtmine reaajas	15
2.3 Tulemused	16
2.3.1 Hingamisahela ja tsitraaditsükli inhibitsioon VHL-puudulikes neerurakkudes	16
2.3.2 VHL puudulikes neerurakkudes esineb glükoosist sõltuv reduktiivne stress.....	17
2.3.3 Püruvaat ja resasuriin vähendavad reduktiivset stressi VHL-puudulikes neerurakkudes	18
2.4. Arutelu.....	19
KOKKUVÕTE	24
Summary	25
KASUTATUD KIRJANDUS	26
LIHTLITSENTS	31

KASUTATUD LÜHENDID

ccRCC- heledarakuline neerurakuline kartsinoom

CBS- tsüklilise AMP vastuselementi siduv valk

DNP- 2,4-dinitrofenool

EPO- erütropoetiin

ETA- elektrontransportahel

FADH₂- flaviin adeniini dinukleotiid

FIH- HIF-1-te inhibeeriv faktor

GAPDH- glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas

GLUT1- glükoosi transporter 1

GPD1- glütserool-3-fosfaat dehüdrogenaas 1

G3PS- glütserool-3-fosfaat süstik

HIF- hüpoksia indutseeritud faktor

HKC8- inimese neeru proksimaaltuubuli rakud

HRE- hüpoksiale reageeriv element

KO- *knock-out*

LDHA- laktaadi dehüdrogenaas A

MAS- malaat-aspartaat süstik

MDH1- malaadi dehüdrogenaas 1

MT- metsiktüüp

PDK1- püruvaadi dehüdrogenaasi kinaas 1

PHD- prolüül-4-hüdroksülaas

ROS- hapnikku sisaldav reaktiivne osake

SDH- suktsinaadi dehüdrogenaas

Sirt3- *sirtuin 3*

TCA tsükkel- tsitraaditsükkel

VHL- Von Hippel Lindau

VEGF- vaskulaarne endoteeli kasvufaktor

SISSEJUHATUS

Von Hippel-Lindau (VHL) sündroom on pärilik haigus, mida põhjustavad mutatsioonid VHL geenis (Binderup, 2018). VHL geeni pealt sünteesitud valgul, pVHL-il, on oluline roll HIF-1 (hüpoksia indutseeritud faktor 1) regulatsioonis. HIF-1 aitab rakul toime tulla hapnikupuuduse ehk hüpoksiaga. VHL valgu puudulikkus põhjustab HIF-1 kuhjumise (Calzada, 2010; Maxwell jt., 1999) mille tagajärjeks on pseudohüpoksiline seisund. Kuna vähirakud on kohanenud hüpoksilise keskkonnaga, siis on neil ka HIF-1 ülesreguleeritud. HIF-1 signaaliraja aktivatsioon vähirakkudes mõjutab angiogeneesi, erütropoeesi ning raku metabolismi (Boutheiliera ja Aragonés, 2020; Calzada, 2010). Siiaamaani on VHL sündroomiga seotud uurimistööd ning ravitaktikad keskendunud peamiselt HIF-1 ja VEGF (vaskulaarne endoteeli kasvufaktor) raja osade inhibeerimisele. Mõistagi on VHL-HIF-VEGF rada VHL sündroomi väljakujunemises oluline, kuid HIF-1 raja inhibeerimine võib põhjustada mitmeid kõrvaltoimeid.

VHL haigust põdevatel inimestel arenevad elu jooksul erinevad vähkkasvajad, millest kõige tihedamini esineb just ccRCC-d (heledarakuline neerurakuline kartsinoom) (Seizinger jt, 1988). See on ka üks peamine surmapõhjus. ccRCC ei ole seletatav ainuüksi HIF-1 signaaliraja aktivatsiooniga ja seetõttu on oluline uurida ka teisi molekulaarseid ja ainevahetuslikke mehhanisme. Vastavate radade mõjutamine võimaldaks jõuda uute ravimeetoditeni, mille eesmärk on parandada VHL haigust põdevate patsientide elukvaliteeti ning elumust. Reduktiivne stress on seotud redutseerivate ekvivalentide (nt NADH ja NADPH) kuhjumisega, mis on viimasel ajal pälvinud märkimisväärset tähelepanu teaduskirjanduses (Cortés-Rojo jt., 2020; Xiao ja Loscalzo, 2020), kuna sellel on oluline roll reaktiivsete hapniku ühendite tekkes.

Käesoleva uurimistöö eesmärk on välja selgitada, kas VHL-puudulikes neerurakkudes esineb reduktiivset stressi ja testida erinevaid viise selle vähendamiseks. VHL-puudulikud neerurakud võimaldavad uurida ccRCC molekulaarseid mehhanisme *in vitro*. Teoreetilises osas antakse ülevaade VHL puudulikkusest tingitud RCC-st, hüpoksiast, raku hingamisest ning reduktiivsest stressist. Eksperimentaalses osas hinnati VHL puudulike ja metsiktüüpi (MT) rakkude hingamist ja mõõdeti NADH/NAD⁺ suhe. NADH/NAD⁺ tasakaalu mõjutamiseks kasutati nelja erinevat moodust: glükoosivaba sööde, resasuriin, püruvaat või DNP (2,4-dinitrofenool). Töö teostati TÜ Bio- ja Siirdemeditsiini instituudis füsioloogia osakonnas.

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

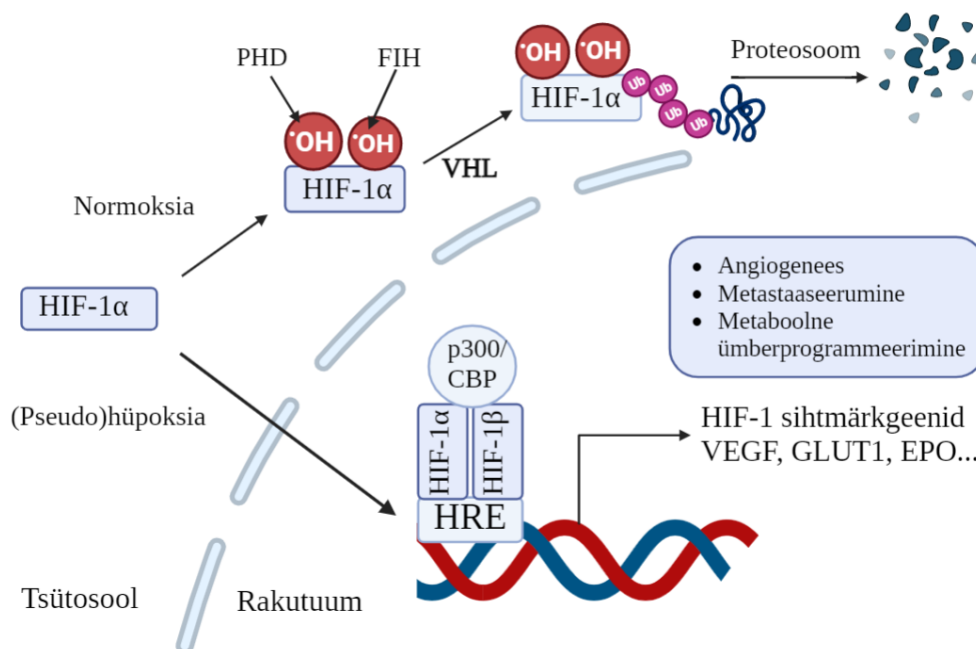
1.1 VHL puudulikkusest põhjustatud heledarakuline neerurakuline kartsinoom

Neeruvähi esinemissagedus on viimaste aastakümnete jooksul tõusnud. 2020. aastal sai maailmas esmakordse neeruvähi diagnoosi 431 288 inimest, millest histoloogiliselt umbes 90% moodustas neerurakuline kartsinoom, peamiselt just ccRCC (70%) (Bukavina jt., 2022). Neerukasvajatest kõige levinum on seega ccRCC (Makhov jt., 2018). Viiekümnel kuni kaheksakümnel protsendil ccRCC-d põdevatest inimestest on leitud mutatsioone VHL geenis. VHL on tuumorsupressorgeen, mis paikneb 3. kromosoomi lühikeses õlas. Mutatsioonid selles geenis põhjustavad VHL sündroomi, mis on kasvujaid põhjustav autosomaalne dominantne pärilik haigus. Selle sündroomi puhul on kirjeldatud erinevaid tuumoreid: silma võrkkesta ja kesknärvisüsteemi hemanigoblastoomid, pankrease neuroendokriintuumorid, tsüstadenoomid ja tsüstid, heledarakuline neeruvähk, neerutsüstid jm (Calzada, 2010; Maher jt., 1991; Seizinger jt., 1988). Just ccRCC on üks sagedasemaid surmapõhjuseid VHL sündroomi põdevate patsientide seas (kuni 70%) (Calzada, 2010). Nagu eelpool mainitud, siis on VHL tuumorsupressorgeen (Maher jt., 1991), aga teisalt on sellel valgul (pVHL-il) tsentraalne roll hapniku kontsentratsiooni tajumisel ning hüpoksia raja käivitamisel (Calzada, 2010; Hudler ja Urbancic, 2022). Kui VHL geeni regulatsioon on puudulik, siis põhjustab see mitmete onkogeensete radade aktivatsiooni nagu erütropoees, glükolüüs ja kontrollimatu angiogenees ehk veresoonte kasv (Calzada, 2010). Viimase tõttu on VHL sündroomi tuumorid hüpervaskulaarse iseloomuga. ccRCC-d on keeruline ravida, sest see ei allu traditsioonilisele kiiritus- ja keemiaravile, mistõttu on uudsete ravivõimaluste väljatöötamine äärmiselt asjakohane (Makhov jt., 2018).

1.2 Hüpoksia, pseudohüpoksia ja HIF-1 signaalirada

Hapniku (O₂) homöostaasi säilitamine on elusorganismide jaoks hädavajalik, mistõttu toimub juba rakutasemel O₂ kontsentratsiooni tajumine ning vajadusel raku elutegevuse korrigeerimine (Semenza, 2000). Lisaks hüpoksiale korraldatakse raku ainevahetus ümber ka VHL geeni/valgu puudulikkuse korral normaalse hapniku taseme juures (Bouthelier ja Aragonés, 2020; Kaelin, 2002). Olukorda, kus rakk aktiveerib hüpoksia vastusega seotud valgud hapniku kontsentratsioonist sõltumatult, nimetatakse pseudohüpoksiaks (Calzada, 2010).

Hüpoksia või VHL geeni inaktivatsioonist põhjustatud pseudohüpoksia korral on olulisel kohal heterodimeerne transkriptsioonifaktor HIF-1 (Wang jt., 1995), mis tavaliselt koosneb HIF-1 α (kuid ka HIF-2 α ja HIF-3 α) ja HIF-1 β subühikust (Bouthelier ja Aragonés, 2020; Kaelin, 2002). Antud töö kontekstis keskendutakse just HIF-1 α ja HIF-1 β heterodimeersele kompleksile, mis on seotud akuutse hüpoksia vastusega (Serocki jt., 2018). Normoksia ehk normaalse hapniku kontsentratsiooni juures hüdroksüleeritakse HIF-1 α valk. HIF-1 α alaühiku poolestusaeg on vaid paar minutit, sest hüdroksüleeritud HIF-1 α tunneb ära VHL, mis suunab HIF-1 α lagundamisele (Hubbi ja Semenza, 2015). Hüpoksia tingimustes väheneb hapnikust sõltuv hüdroksüleerimine. Selle tulemusena pidurdub HIF-1 α lagundamine. HIF-1 α kuhjub, siseneb tuuma ning seostub HRE (hüpoksiale reageeriv element) järjestusega geenide promootorites ja moodustab kompleksi HIF-1 β subühikuga (Bouthelier ja Aragonés, 2020; Calzada, 2010). See viib mitmete hüpoksia poolt reguleeritud geenide aktivatsioonini (nt VEGF, EPO, GLUT1, PDK1, LDHA). Näiteks erütropoetiin (EPO) ja vaskulaarne endoteeli kasvufaktor (VEGF) kontrollivad erütropoeesi ja angiogeneesi (Bouthelier ja Aragonés, 2020). HIF-1 kontrollib ka metabolismi läbi glükoosi transporter 1 (GLUT1), püruvaadi dehüdrogenaasi kinaasi 1 (PDK1) ja laktaadi dehüdrogenaas A (LDHA) geenide ekspressiooni. Ainevahetuse regulatsioon on oluline ka käesoleva töö kontekstis.



Joonis 1. HIF-1 signaalirada. Normoksias toimub HIF-1 α hüdroksüleerimine prolüül-4-hüdroksülaasi (PHD) ja HIF-1 inhibeeriva faktori (FIH) poolt. Seejärel toimub seondumine VHL valguga, mis viib HIF-1 α alaühiku lagundamiseni proteosoomi poolt. (Pseudo)hüpoksia korral liigub HIF-1 α rakutuuma, kus ta seondub hüpoksiale reageeriva elemendiga (HRE-ga) ning moodustab kompleksi HIF-1 β alaühikuga ja transkriptsiooni koaktivaatorite p300/tsüklilise AMP vastuselementi siduva valguga (CBS-iga). HIF-1 kompleks aktiveerib mitmete geenide ekspressiooni. Modifitseeritud Ikeda ja Kakeya, 2021 järgi. Joonis koostatud programmis BioRender.

1.3 Mitokonder ja HIF-1 mõju hingamisele

Mitokonder on organell, mida leidub enamustes imetajate rakkudes (Nazaret jt., 2009). Eriti palju leidub mitokondreid rakkudes, mis vajavad oma elutegevuseks palju energiat (nt lihas-, maksa- ja neerurakud). Mitokondrite peamine ülesanne on toota orgaanilistest ühenditest energiakandjat, adenosiintrifosfaati (ATP) (Nazaret jt., 2009). Ehituslikult on mitokondrid ebaharilikud seetõttu, et neil on 2 membraani, mis jaotavad mitokondri neljaks osaks: välimine membraan, membraanidevaheline ruum, sisemine membraan ning maatriks (McBride jt., 2006; Nazaret jt., 2009). Mitokondris toimuv energia tootmine koosneb kolmest peamisest etapist: tsitraaditsükkel (TCA tsükkel), elektrontransportahel (ETA) ja ATP süntees (Nazaret jt., 2009).

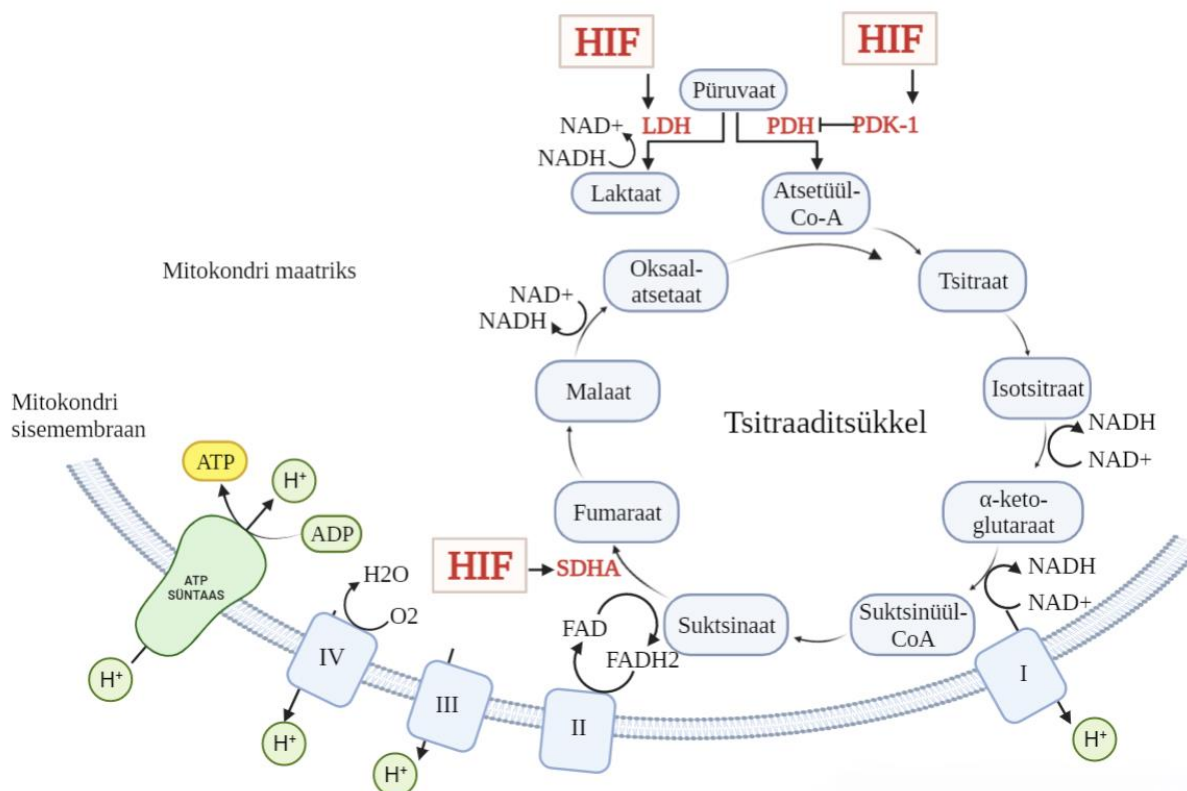
Tsitraaditsükkel, tuntud ka kui Krebse tsükkel, toimib mitokondri maatriksis ning see koosneb mitmetest omavahel seotud reaktsioonidest (Joonis 2) (Infantino jt., 2021; Martínez-Reyes ja Chandel, 2020). Tsitraaditsükli toodetakse redutseerivaid ekvivalente (NADH, flaviini adeniini dinukleotiid (FADH_2), orgaanilised happed), guanosiin trifosfaati (GTP-d) ning süsinikdioksiidi. Ühe FADH_2 molekuli tootmine leiab aset suktsinaadi oksüdeerimisel fumaradiiks (Martínez-Reyes ja Chandel, 2020). Kokku kolme NADH molekuli tootmine toimub kolmes erinevas reaktsioonis:

- 1) isotsitraadi oksüdatiivne dekarboksüleerimine α -ketoglutaraadiiks - 1 NADH molekul;
- 2) α -ketoglutaraadi oksüdatiivne dekarboksüleerimine suktsinüül-CoA-ks - 1 NADH molekul;
- 3) malaadi dehüdrogenisatsioon oksaalatsetaadiiks - 1 NADH molekul (Martínez-Reyes ja Chandel, 2020).

Redutseerivad ekvivalendid on kõrge energiaga elektronide kandjad ja nendelt liiguvad elektronid tsitraaditsükli vahendusel ETA-sse. ETA asub mitokondri sisemembraanis (Greene jt., 2022; McBride jt., 2006) ning koosneb neljast kompleksist (Martínez-Reyes ja Chandel, 2020). Tsitraaditsükli toodetud redutseerivad ekvivalendid kasutatakse ära just ETA I ja II kompleksi poolt, milleks on vastavalt NADH dehüdrogenaas ja suktsinaadi dehüdrogenaas (SDH) (Martínez-Reyes ja Chandel, 2020). NADH ja FADH_2 kannavad elektrone tsitraaditsüklist ETA-sse, mille käigus NADH oksüdeeritakse NAD^+ -iks ja FADH_2 FAD^+ -iks. Elektrone hingamisahela komplekside vahel kannavad ubikinoon ja tsütokroom C. Elektronide liikumise tulemusena pumbatakse samal ajal prootoneid mitokondri membraanide vahelisse ruumi. See tekitab mitokondriaalse membraanipotentsiaali (Greene jt., 2022), mis on vajalik

raku peamise energeetilise ekvivalendi, ATP, tootmiseks. Tekkinud membraanipotentsiaali kasutab ära ATP süntaas, mille kaudu liiguvad prootonid tagasi mitokondri maatriksisse ning $\text{ADP} + \text{P}_i$ reaktsiooni käigus sünteesitakse $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$ (Greene jt., 2022; Infantino jt., 2021).

Glükolüüsi käigus tehakse glükoosist püruvaat. Hapniku olemasolul konverteeritakse püruvaat enamasti atsetüül-CoA-ks, mis siseneb tsitraaditsükklisse (Infantino jt., 2021). Nagu eelnevalt mainitud, toimub HIF-1 kuhjumisel tavapärase raku metabolismi ümberprogrammeerimine (Bouthelier ja Aragonés, 2020). HIF-1 aktiveerib glükoosi transporterite (nt GLUT1) ja glükolüütiliste ensüümide geenide transkriptsiooni, mis suurendavad glükoosist püruvaadi tootmist (Ikeda ja Kakeya, 2021). HIF-1 α mõjutab ka LDHA ja PDK1 geenide ekspressiooni (Bouthelier ja Aragonés, 2020; Ikeda ja Kakeya, 2021). Hüpoksia ja VHL puudulikkus suurendavad LDHA ekspressiooni, mis vahendab püruvaadist laktaadi tootmist (Bouthelier ja Aragonés, 2020). Reaktsiooni käigus oksüdeeritakse NADH NAD⁺-iks. Laktaadi raja aktivatsiooniga suureneb ka hapnikust sõltumatu ATP tootmine (glükolüüs). HIF-1 α indutseerib PDK1-e, mis inhibeerib püruvaadi dehüdrogenaasi (PDH) kompleksi (Infantino jt., 2021). Selle tulemusena väheneb atsetüül-CoA sisenemine tsitraaditsükklisse ja tsitraaditsükli aktiivsus (Bouthelier ja Aragonés, 2020). Lisaks vähendab HIF-1 hingamisahela kompleks I (NADH dehüdrogenaasi) (Infantino jt., 2021) ja kompleks II (SDH) aktiivsusi. SDH on oluline ensüüm ka tsitraaditsükklis (Bouthelier ja Aragonés, 2020). Kõik need metaboolsed muutused loovad eelduse reduktiivseks stressiks.



Joonis 2. HIF-1 mõju raku metabolismile. HIF-1 indutseerib laktaadi dehüdrogenaasi (LDH), mille tulemusena toodetakse püruvaadist laktaat. HIF-1 aktiveerib PDK-1-te, mis inhibeerib PDH-d, mistõttu väheneb atsetüül-Co-A sisenemine tsitraaditsükklisse. HIF-1 inhibeerib suktsinaadi dehüdrogenaasi (SDH), mis on oluline ensüüm nii tsitraaditsükklis kui ETA-s. Modifitseeritud Martínez-Reyes ja Chandel (2020) järgi. Joonis koostatud programmis BioRender.

1.4 Reduktiivne stress

Raku üheks peamiseks redokspaariks on NAD^+ ja NADH . Nad toetavad raku elutegevust ja energia tootmist – NAD^+ toetab glükolüüsi ja tsitraaditsükli, NADH annab elektrone ETA-sse (Bouthelier ja Aragonés, 2020; Xiao ja Loscalzo, 2020). Kuna tegu on asendamatute ühenditega, siis seostatakse nendevahelise tasakaalu kadumist mitmete protsessidega nagu vähk ja vananemine (Xiao ja Loscalzo, 2020). NADH kuhjumine põhjustab rakus reduktiivset stressi ning viib hapniku olemasolul reaktiivsete hapnikuühendite tekkeni (Xiao ja Loscalzo, 2020). Kui NADH osakaal ületab loomuliku tasakaalu, siis hakkab NADH kõrge kontsentratsioon pidurdama selle tekkega seotud reaktsioone tsitraaditsükklis (ilmneb produktinhibitsioon). Produktinhibitsioon on oluline reguleerimismehhanism biokeemilistes reaktsioonides, mis tagab pöörduvate reaktsioonide tasakaalu ja toimimise soodustatud suunas. Tsütosooli ja mitokondri NAD(H) on omavahel tihedalt seotud. Kuna NAD(H) ei ole võimeline läbima mitokondri membraani, siis transporditakse selle ekvivalente malaat-aspartaat süstiku (MAS) ja glütserool-3-fosfaat (G3PS) süstiku abil. Kõrge NADH pidurdab tsitraaditsükli tööd

(Martínez-Reyes ja Chandel, 2020) ja redutseerib ETA, kuna elektronide peamised kandjad ETA-s (ubikinoon ja tsütokroom C) on enamuses redutseerunud ja seetõttu on ka kompleks I ja kompleks II inhibeeritud (Chouchani jt., 2014; Murphy, 2009). Selle tulemusena ei ole ETA võimeline rohkem elektrone vastu võtma. Selle eelduseks on omakorda kompleks IV (tsütokroom-c oksüdaas) või ATP-süntaasi inhibitsioon, mistõttu ei toimu enam elektronide liikumist O₂-le.

Hüüpoksia ja pseudohüüpoksia viivad NADH kuhjumiseni, kuna inhibeeritakse ETA tööd (Bouthelier ja Aragonés, 2020). Käesoleva uurimistöö üheks eesmärgiks on teada saada, kas VHL-puudulikes neerurakkudes on võimalik reduktiivjõudu vähendada kasutades aineid, millel on mõju NADH/NAD⁺ suhtele elus rakus (resasuriin, DNP ja püruvaat). Lisaks testiti, kas glükoosi eemaldamine söötmest võiks olla üks viis, kuidas vähendada reduktiivset stressi. Resasuriin on värv, mis redutseeritakse rakus NADH abil tsütoplasmaatiliste või mitokondriaalsete reduktaaside poolt resorufiiniks (Lavogina jt., 2022). DNP on aine, mis häirib mitokondriaalse prooton gradiendi teket ja ATP süntaasi tööd, mistõttu väheneb ATP tootmine ning suureneb mitokondriaalne vajadus NADH järele (Adamczuk jt., 2022). Kuna HIF-1 ekspressioon vähendab püruvaadi sisenemist tsitraaditsükli ja seeläbi tsitraaditsükli aktiivsust (joonis 2), siis on püruvaadi lisamise eesmärk (1) vähendada tsütosooli reduktiivset stressi läbi püruvaat → laktaat reaktsiooni ning (2) suunata rakud kasutama rohkem tsitraaditsükli ja ETA-t.

2. PRAKTIILINE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Töö üldine eesmärk on teada saada, kas VHL-puudulikes neerurakkudes esineb reduktiivset stressi ja testida erinevaid viise selle vähendamiseks.

Töö spetsiifilisemad eesmärgid on:

- Mõõtes elusrakkude poolt tekitatud gaasivoole, hinnata samaaegselt reduktiivset jõudu tootvate (tsitraaditsükkel, CO₂ voolu mõõtmine) ja tarbivate (hingamisahel, O₂ voolu mõõtmine) protsesside tasakaalu, et teada saada kui palju sõltuvad VHL-puudulikud rakud tsitraaditsükli ja hingamisahela aktiivsustest;
- Hinnata kas VHL-puudulikes (KO, *knock-out*) inimese neerurakkudes on kõrgem reduktiivne stress, kui metsiktüüpi (MT, *metsiktüüp*) neerurakkudes;
- Teada saada, kas VHL KO rakkude potentsiaalselt kõrgemat reduktiivjõudu on võimalik vähendada eemaldades kasvukeskkonnast glükoosi või lisades püruvaati, DNP või resasuriini.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Rakukultuur

HKC8 (inimese neeru proksimaaltuubuli rakud) MT kui ka CRISPR meetodi alusel loodud VHL puudulikud rakuliinid olid kingitus professor Sir Peter J. Ratcliffe poolt. MT rakke käsitleti kui terveid neerurakke ning VHL puudulikke rakke kui ccRCC mudelit. Rakke kasvatati MEM (minimaalne hädavajalik sööde, inglise keeles *minimum essential medium*) (Capricorn, MEM-STA) söötmes, kuhu oli lisatud 10% FBS-i (veise loote seerum, inglise keeles *fetal bovine serum*) (Gibco™, 10270106) ning 1x penitsilliin streptomütsiini lahust (Gibco™, 15140122), mis sisaldas 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 100 mm Petri tassides ning hoiti inkubaatoris, kus temperatuur oli 37°C ja CO₂ sisaldus 5%. Kõik rakukultuuri protseduurid viidi läbi laminaari all.

Katsetele eelneval päeval vaadeldi rakke mikroskoobi all. Rakkudelt aspireeriti sööde, misjärel pesti rakke 1x PBS-iga (fosfaatpuhverdatud soolalahus, inglise keeles *phosphate buffered saline*). Seejärel lisati tassile trüpsiin-EDTA (0.25%) (etüleendiamiintetraädikhape) (Gibco, 25200056) ning tassid asetati viieks minutiks inkubaatorisse. Kui rakud ümardusid ja hakkasid tassi küljest lahti tulema, lisati rakkudele seerumiga MEM sööde. Rakud suspendeeriti ning

koguti kokku 15 ml tuubi. Rakke tsentrifugeeriti 5 min 960 rpm-i juures ning resuspendeeriti sobivas koguses. Rakkude lugemiseks kasutati NanoEntek EVE rakuloendurit.

2.2.2 NADH/NAD⁺ suhte mõõtmine

Rakusisese NADH/NAD⁺ suhte mõõtmiseks kasutati EnzyChrom NAD⁺/NADH mõõtmiskomplekti (BioAssay Systems, E2ND-100). MT ja VHL puudulikud HKC8 rakud külvati 6-auguga plaadile nii, et igas augus oli 400 000 rakku 2 ml-s söötmes. Järgmisel päeval pesti rakke 1x PBS-iga ja MEM kasvusööde vahetati DMEM (ThermoFisher, A1443001) (Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde, inglise keeles *Dulbecco's modified eagle medium*) katsesöötme vastu. Inkubatsiooniaeg oli 4 tundi. Katses kasutatud DMEM sööde on glutamiini, glükoosi ja fenoolpunase vaba baassööde, kuhu lisati 10% FBS, 1x PenStrep ning erinevas kombinatsioonis süsiniku allikaid (Tabel 1).

Tabel 1. Söötmesse lisatud süsiniku allikate lõpp-kontsentratsioonid.

Süsiniku allikas (mM)	Täissööde	Glükoosi vaba sööde	Glutamiini vaba sööde	Püruvaadiga sööde
Glükoos (Gibco™, A2494001)	5,5	X	5,5	5,5
Glutamiin (Sigma Aldrich, G7513)	4	4	X	4
Püruvaat (Gibco™, 11360070)	X	X	X	3

DNP (25 µM) (Sigma-Aldrich, D198501) ja resauriini (10 µM või 50 µM) (Sigma-Aldrich, R7017) katsetes oli inkubeerimise aeg DMEM täissöötmes 1 tund. Negatiivse kontrollina kasutati rotenooni (0,5 µM, 1h) (Abcam, ab143145). Inkubatsiooni aja möödudes pesti rakke uuesti 1x PBS-iga ning NAD⁺ ja NADH eraldati rakkudest vastavalt tootja protokollile. Protokoll põhineb LDH katalüüsitud reaktsioonil, kus laktaat on substraat, mille tulemusena NAD⁺ redutseeritakse NADH-ks. Saadud NADH redutseerib MTT (3-(4,5-dimetüül-2-tiasolüül)-2,5-difenüül-2H tetrasoolium bromiid) reagenti ning lahuse värvus, mida mõõdetakse 565nm lainepikkusel, on proportsioonis raku NADH/NAD⁺ suhtega.

Lühidalt, rakud koguti kokku 1,5 ml Eppendorfi tuubi ning tsentrifugeeriti (200 xg) 4°C juures 5 minutit. Seejärel aspireeriti rakkudest ettevaatlikult sööde ning lisati 100 µl kas NAD⁺ või NADH ekstraktsioonipuhvrit. Rakud lüüsi külmutamise ja sulatamise tehnika abil (külmutus -80°C juures ja sulatus toatemperatuuril). Pärast rakkude lüüsimist asetati tuubid 60°C juurde

5 minutiks. Seejärel lisati tuubidesse 20 µl puhverlahust ning 100 µl vastupidist ekstraktsioonipuhvrit. Rakususpensiooni tsentrifuugiti 5 minutit (750 xg). 96-kannulise plaadi eraldi aukudesse pipeteeriti 40 µl NAD⁺ standardit või uuritavat proovi. Vahetult enne valguse neeldumise mõõtmist lisati proovidele 80 µl töolahust, mis koosnes MTT-st, laktaadist, ensüüm A-st ja B-st. Valguse neeldumise muutus mõõdeti 565 nm lainepikkusel ajapunktides 0 ja 15 minutit.

2.2.3 Hingamiskatse-eelsed tegevused rakukultuuridega

100 mm Petri tassi põhja asetati autoklaavitud klaasketas (Pilkington Microwhite), mis kaeti 0.1% želatiiniga. Tassile külvati 8×10^6 raku ning lasti kinnituda üleöö. Üks tund enne raku hingamise mõõtmist pesti rakke 1x PBS-iga ja rakkudele pipeteeriti bikarbonaadi vaba HEPES (4-(2-hüdroksüületüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape) (20 mM) (Sigma Aldrich, H0887) puhverdatud DMEM (Sigma-Aldrich, D5030) söödet, millele oli lisatud süsinikuallikad (glükoos ja/või glutamiin) vastavalt tabel 1 välja toodud skeemile. Seejärel asetati Petri tass tunniks ajaks 37 °C 0% CO₂ inkubaatorisse. Vahetult enne katse läbiviimist lisati söötmesse ka karboanhüdraasi (Sigma-Aldrich, C2624) (5 mg/ml), et saavutada CO₂ ja bikarbonaadi kiire tasakaal kogu katse vältel.

2.2.4 Raku hingamise mõõtmine reaajas

Raku hingamise mõõtmiseks kasutati innovaatilist seadet, mis on välja töötatud Tartu Ülikoolis Agu Laisa juhitud taimefüsioloogia töögrupi poolt. Hingamisahela ja tsitraaditsükli aktiivsuste samaaegne hindamine on keeruline. Kui O₂ mõõtmiseks on kasutusel Clark-i elektrodid, Oroboros ja Seahorse aparaadid, siis CO₂ mõõtmine on olnud siiaani võimalik ainult läbi kaudsete hinnangute. Gaasivoolude mõõtmisseade võimaldab samaaegselt mõõta O₂ ja CO₂ gaasivoolusid ning hinnata reductiivset jõudu tootvaid (tsitraaditsükkel) ja tarbivaid protsesse (hingamisahel) elusas raku reaajas. CO₂ tootmine peegeldab tsitraaditsükli tööd ja O₂ tarbimine hingamisahela tööd.

Rakkude hulga määramiseks mõõdeti tsütokroomide b ja c ning tsütokroom oksüdaasi optilised neeldumised. Need on hingamisahela ensüümid, mis neelavad valgust spektri sinises alas. Raku hingamise tulemused normaliseeriti tsütokroomide neeldumise maksimumile (418...420 nm). Optilise neeldumise mõõtmiseks kasutati spektromeetrilist kera, kuhu asetati klaasketas. Mõõtmine toimus neljas etapis:

1. tühi kera,
1. kera koos klaaskettal olevate rakkudega,

2. kera koos klaaskettal olevate rakkudega + 500 µl söödet,
3. tühi kera.

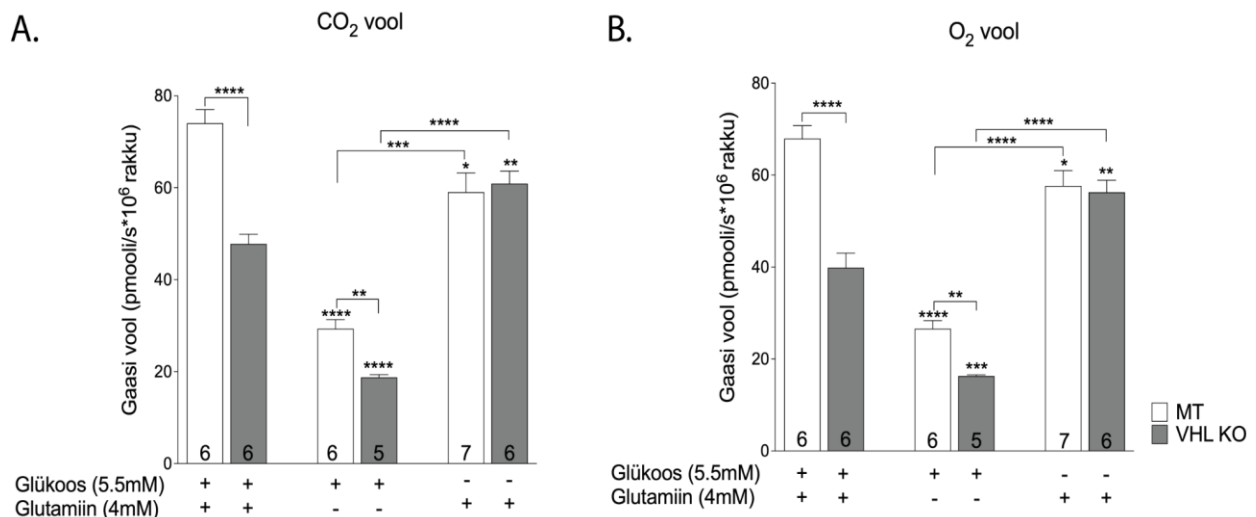
Üleliigne sööde eemaldati ja klaasketas asetati raku hingamismasina kambrisse. Klaaskettale pipeteeriti uuesti 500 µl söödet, et tagada piisav niisutus. Kamber suleti ning kambris säilitati ühtlane temperatuur (37°C), normoksiline hapniku kontsentratsioon ja niiskustase. Baashingamise jaoks teostati viis mõõtmistsükli, kus iga tsükkel kestis 5 minutit. Pärast viiendat tsükli võeti klaasketas kambrist välja, üleliigne sööde eemaldati ning lisati vastavalt kas resasuriini (10 µM/ 50 µM), DNP-d (25 µM) või püruvaati (3 mM) sisaldav täissööde. Seejärel mõõdeti kaheksa tsükli, iga tsükkel kestis taaskord 5 minutit.

Rakukultuuri katsed, optilise neeldumise mõõtmised ning söötme vahetused teostas töö autor, gaasivooludega seotud mõõtmised ning vastava andmeanalüüsi teostas taimefüsioloogia spetsialist Hillar Eichelmann. Joonis 3 tulemused on teostatud koos Hans Vellamaga.

2.3 Tulemused

2.3.1 Hingamisahela ja tsitraaditsükli inhibitsioon VHL-puudulikes neerurakkudes

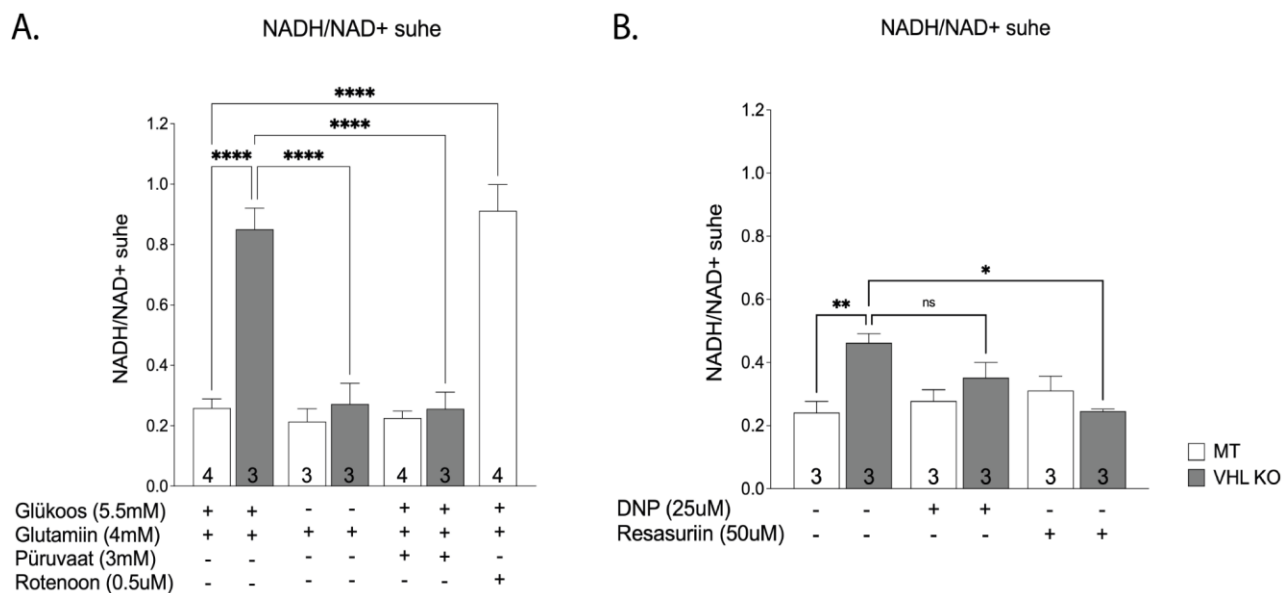
Raku hingamise iseloomustamiseks kasutati unikaalset masinat, mis võimaldab jälgida samaaegselt reduktiivset jõudu tootvate (tsitraaditsükkel, CO₂ voolu mõõtmine) ja tarbivate (hingamisahel, O₂ voolu mõõtmine) protsesside tasakaalu. VHL puudulikes neerurakkudes, kus esineb HIF-1 üleekspressioon, oli täissöötmes oluliselt madalam O₂ tarbimine ja CO₂ eraldumine võrreldes MT rakkudega. See viitab VHL puudulike rakkude tsitraaditsükli ja hingamisahela madalamale aktiivsusele võrreldes MT rakkudega. Järgmiseks tehti katsed tingimustes, kus süsinikuallikaks oli ainult glükoos või glutamiin. Glutamiini väljajätmine söötimest vähendas hingamist mõlemas genotüübis umbes 50% võrreldes täissöötmega. Samas glükoosi väljajätmine tõstis hingamist VHL-puudulikes rakkudes ja vähendas MT rakkudes. Selle tulemuseks oli sarnane hingamise aktiivsus mõlemas genotüübis (Joonis 3 A-B).



Joonis 3. Hingamisaktiivsus täissöötmes ning glükoosi või glutamiini vabas söötmes MT ja VHL puudulikes neerurakkudes mõõdetud CO₂ ja O₂ voolude põhjal. Joonistel on toodud keskmine ± standardmõõteviga (SEM). Tulemused analüüsiti paaritu t-testiga koos Welchi korrigeerimisega. Grupi suurus on näidatud tulpade peal numbritena. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 ****P<0.0001.

2.3.2 VHL puudulikes neerurakkudes esineb glükoosist sõltuv reduktiivne stress

Üks töö hüpoteesidest oli, et tsitraaditsükli supressioon võib viia kõrgema reduktiivse stressini VHL puudulikes rakkudes. Saadud tulemused näitasid, et VHL puudulikes rakkudes on täissöötmes 2-4 korda kõrgem NADH/NAD⁺ suhe võrreldes MT rakkudega. See efekt on glükoosist sõltuv, kuna glükoosi eemaldamine taastas VHL-puudulikes neerurakkudes NADH/NAD⁺ suhte. Rotenooni, mis inhibeerib hingamisahela kompleks I tööd ja NADH → NAD⁺ reaktsiooni, kasutati negatiivse kontrollina (Joonis 4A). Rotenoon tõstis NADH/NAD⁺ suhet MT rakkudes. Saadud tulemused viitavad asjaolule, et VHL puudulikes rakkudes esineb reduktiivne stress.

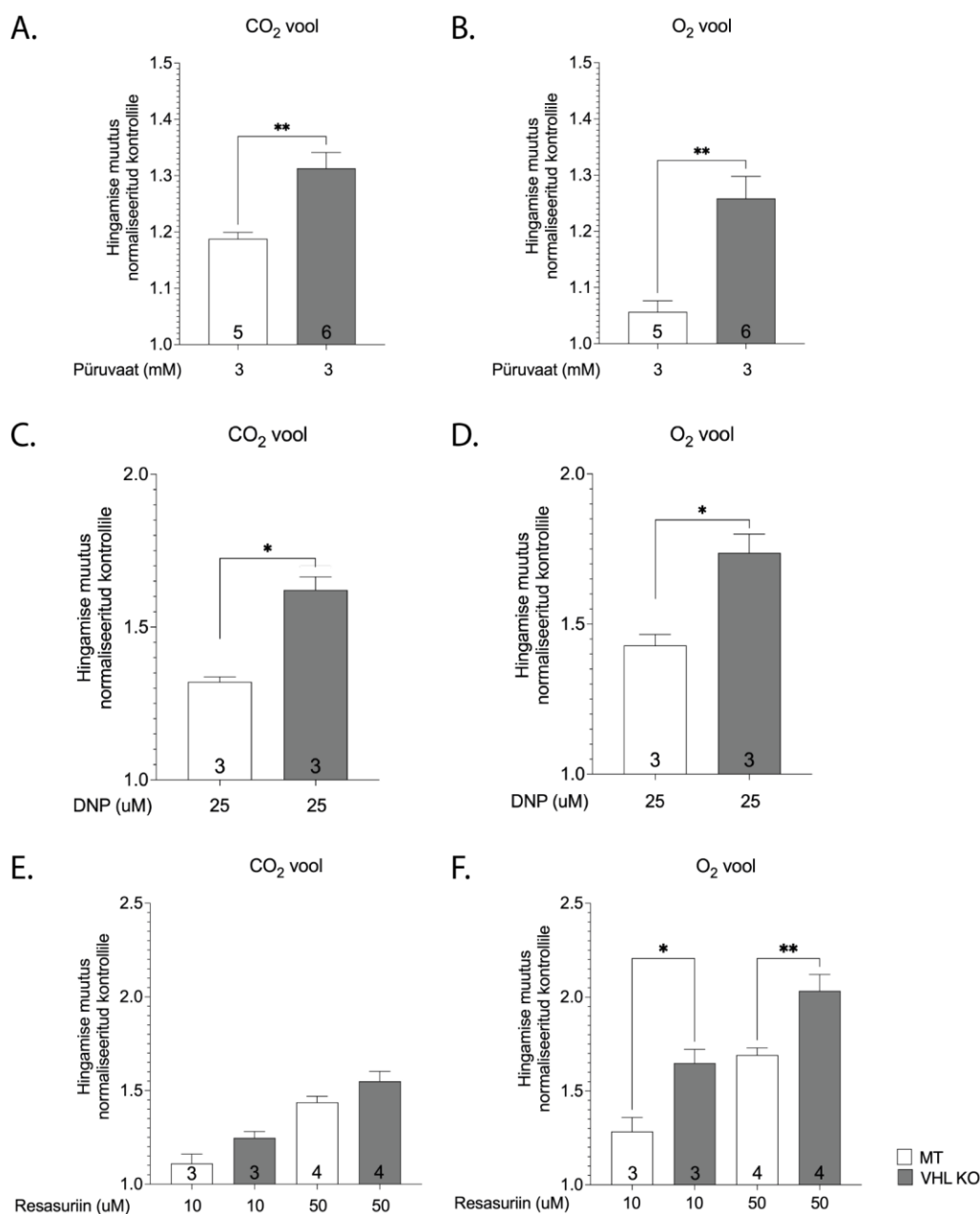


Joonis 4. NADH/NAD⁺ suhe MT ja VHL puudulikes neerurakkudes täissöötmes, glükoosi vabas söötmes (4 h) või püruvaadi (3 mM, 4h), resasuriini (50 uM, 1h) ning DNP (25 uM, 1h) lisamise korral. Rotenooni (0.5 uM, 1h) kasutati negatiivse kontrollina. Joonistel on toodud keskmine \pm standardmõõteviga (SEM). Tulemused analüüsiti ühefaktorilise ANOVAGA (dispersioonanalüüs). Kui ANOVA oli statistiliselt oluline, rakendati Tukey's (HSD) *post hoc* testi, et kontrollida millised grupid ja mis suunas omavahel erinevad. Grupi suurus on näidatud tulpade peal numbritena. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns - mitteoluline

2.3.3 Püruvaat ja resasuriin vähendavad reduktiivset stressi VHL-puudulikes neerurakkudes

Selleks et teada saada, kas VHL KO rakkude kõrgemat reduktiivjõudu on võimalik vähendada, kasutati kolme erinevat reagenti. Nendeks olid DNP, püruvaat ja resasuriin, mis on võimelised vähendama rakusisest NADH/NAD⁺ suhet läbi erinevate toimemehhanismide. NADH/NAD⁺ suhte mõõtmine näitas, et püruvaat ja resasuriin vähendasid NADH/NAD⁺ suhet VHL-puudulikes rakkudes võrreldes kontrolliga. DNP mõju NADH/NAD⁺ suhtele ei olnud statistiliselt oluline (Joonis 4 A-B).

Reduktiivjõu vähenemist kinnitas ka hingamisaktiivsuse mõõtmine, kus püruvaadi, DNP või resasuriini lisamine suurendas O₂ tarbimist ja CO₂ eraldumist VHL puudulikes rakkudes võrreldes MT rakkudega (Joonis 5 A-F). See mõju oli eriti selgelt väljendunud 3 mM püruvaadi ja 10 μ M resasuriini lisamisel. Saadud tulemused näitavad, et püruvaat ja resasuriin vähendavad reduktiivset stressi VHL puudulikes rakkudes.



Joonis 5. Hingamisaktiivsus MT ja VHL puudulikes neerurakkudes mõõdetud CO₂ ja O₂ voolude põhjal, kui söötmesse on lisatud püruvaat (3 mM) (A-B), DNP (25 uM) (C-D) või resasuriin (10 uM ja 50 uM) (E-F). Joonistel on toodud keskmine ± standardmõõteviga (SEM). Tulemused analüüsiti kas paaritu t-testiga koos Welchi korrigeerimisega (A-D) või ühefaktorilise ANOVaga (dispersioonanalüüs) (E-F). Kui ANOVA oli statistiliselt oluline, rakendati Tukey's (HSD) *post hoc* testi, et kontrollida millised grupid ja mis suunas omavahel erinevad. Grupi suurus on näidatud tulpade peal numbritena. *P<0.05, **P<0.01

2.4. Arutelu

Kaelin (2002) ning Bouthelier ja Aragonés (2020) toovad välja, et VHL-puudulikes rakkudes esineb ka normaalse hapniku taseme juures mitmeid metaboolseid muutuseid, mis tavapäraselt toimuvad hüüpoksia tingimustes. Kooskõlas varasemate tulemustega (Favier jt., 2009; Hakimi jt., 2016; Shuch jt., 2013), mis on saadud VHL puudulike kasvajate uurimisel, näitavad

käesoleva töö tulemused, et VHL-puudulike neerurakkude metabolism on nihkunud aeroobse glükolüüsi suunas. Seda iseloomustab vähenenud hapniku tarbimine ja süsihappegaasi tootmine. Käesolev töö uudsus tuleb välja leius, et VHL puudulikkus on seotud glükoosist tingitud reduktiivse stressiga. Reduktiivset stressi VHL puudulikes neerurakkudes hinnati läbi NADH/NAD⁺ suhte, mis ccRCC mudelis on tõusnud. Vähenenud hingamine ja suurem NADH/NAD⁺ suhe lubab oletada, et ETA ei ole võimeline elektrone vastu võtma, kuna enamus raku NADH-st tarbitakse just mitokondris (Zhao jt., 2011).

Glükoos ja glutamiin on olulised süsinikuallikad raku ainevahetuses. Nende eemaldamine söötmetest võimaldab hinnata glükoosi või glutamiini panust tsitraaditsükklisse ja ETA-sse. Täissöötmes (söötmes, kuhu on lisatud nii glutamiin kui glükoos) hingasid VHL-puudulikud neerurakud oluliselt vähem kui MT neerurakud. Ühtlasi oli nendes rakkudes tõusnud ka NADH/NAD⁺ suhe. See-eest glutamiini eemaldamine söötmetest (söötmes on ainuke süsinikuallikas glükoos) vähendas hingamist mõlemas genotüübis umbes 50% võrreldes täissöötmega. Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et HKC8 neerurakud ei ole võimelised glükoosi tsitraaditsükklisse siseneva süsinikuallikana märkimisväärselt kasutama ning kasutavad oma ainevahetuses olulisel määral glutamiini. Vaatamata sellele, et VHL puudulikes rakkudes on glükoosi transport, glükolüütilised ensüümid ja glükolüüs ülesreguleeritud, takistab PDK1 aktivatsioon püruvaadi sisenemist tsitraaditsükklisse (Ikeda ja Kakeya, 2021). Glutamiin ei panusta ainult tsitraaditsükli toimimisse läbi glutamiin → glutamaat → α-ketoglutarat raja ning selle kaudu redutseerivate ekvivalentide tootmisesse. Glutamiin on oluline ka rasvhapete sünteesis, mis toetavad vähirakkude kasvu. Ka Altman jt (2016) toovad välja, et vähirakkudes, kus HIF-1 on konstitutiivselt aktiivne, on glutamiin peamine süsinikuallikas rasvhapete sünteesil. Praeguseini ei ole teada kas ja kuidas mõjutab reduktiivne stress VHL puudulikes rakkudes rasvhapete sünteesi, mis on tulevikus üks võimalik uurimissuund.

Glükoosi eemaldamine söötmetest (söötmes on ainuke süsinikuallikas glutamiin) suurendas hingamist (CO₂ ja O₂) ja vähendas reduktiivset stressi (NADH/NAD⁺ suhe) VHL puudulikes rakkudes ning mõõdetud parameetrid sarnanesid MT rakkudele. See tulemus tekitab küsimuse, et kui täissöötme ja glutamiiniga söötme ainuke erinevus on glükoosi sisaldus, siis kuidas panustab glükoos hingamisse ja reduktiivse stressi tekkesse? Glükoosi panus reduktiivsesse stressi viitab kõrgemale reduktiivsele stressile just tsütosoolis, kus leiab aset glükoosi metabolism. Kuna mitokondri sisemembraan on läbimatu NADH-le, siis on tsütosooli ja

mitokondri NAD(H) varud omavahel ühendatud süstik-mehhanismide kaudu. Selleks, et glükolüüs saaks toimida, vajab GAPDH (glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas) tsütosoolis NAD⁺-i. Esiteks toimub NADH oksüdatsioon tsütosoolis MDH1 (malaadi dehüdrogenaas 1) kaudu, mis on MAS süstiku komponent (Hanse jt., 2017). Teiseks vahendab seda GPD1 (glütserool-3-fosfaat dehüdrogenaas 1), mis on G3PS süstiku komponent (Ou jt., 2006). MAS ja G3PS vahendavad redutseerivate ekvivalentide transporti NADH kujul läbi mitokondri membraani. Selle tulemusena regenereeritakse tsütosoolset NAD⁺-i, mida kasutatakse glükolüüsis, ja ETA saab omakorda kasutada glükolüüsi käigus toodetud NADH-d. Selleks, et NADH ei kuhjuks tsütosoolis, kasutab rakk kas eelpool nimetatud süstikuid või LDH-d. LDH reaktsiooni käigus toodetakse püruvaadist laktaat vahekorras üks ühele. Ka reaktsioonis vajalik NADH oksüdeeritakse NAD⁺-ks üks ühele. Kui glükolüüsis tekkinud kaks NADH-d oksüdeeritakse ainult läbi LDH, siis kasutatakse selle reaktsiooni tulemusena ära mõlemad tekkinud püruvaadi molekulid, mistõttu puudub vaba püruvaat ja NADH, mis saaksid siseneda tsitraaditsükliisse ja hingamisahelasse. NADH oksüdeerimine LDH poolt taastoodab NAD⁺-i, mis on vajalik glükolüüsi toimimiseks. See võimaldab glükolüüsil hingamisahelast sõltumatult edasi toimida ja toota ATP-d. See-eest süstikud tagavad NAD(H) transpordi ja tsitraaditsükli töö, kuna püruvaat saab siseneda tsitraaditsükliisse. Järgnevad reaktsioonid illustreerivad produktide teket: 1) Glükoos → 2 Laktaat = 0 NADH-d + 2 ATP-d, 2) Glükoos → 2 Püruvaati = 2 NADH-d + 2ATP-d. Suure tõenäosusega tekitab glükoos kõrge reduktiivse stressi tsütoplasmas, mis omakorda redutseerib läbi süstik-mehhanismide ära mitokondri. Seda hüpoteesi toetavad tulemused, kus VHL puudulikes rakkudes glükoosi eemaldamine, püruvaadi või resasuriini lisamine, mis kõik avaldavad toimet tsütoplasmas, suurendavad hingamist ning vähendavad reduktiivset stressi. Meie töögrupi esialgsed andmed näitavad, et tõenäoliselt toimib resasuriin ennekõike just tsütoplasmas. Seetõttu on põhjust arvata, et suunates rakud tarbima NADH-d on võimalik VHL-puudulikes rakkudes normaliseerida NADH/NAD⁺ suhe ja vabastada mitokondri (tsitraaditsükkel ja ETA) inhibitsiooni alt. Kuidas glükoos põhjustab mitokondri reduktsiooni ning kuidas glükolüüs mõjutab hingamist on lahtised küsimused, mida on edaspidi võimalik uurida kasutades MAS ja G3PS radade inhibiitoreid.

Kuna VHL puudulikkus tekitab olukorra, kus HIF-1 on pidevalt aktiivne, siis on püruvaadi sisenemine tsitraaditsükliisse vähenenud. Ilmselt leevendab püruvaat tsütosooli reduktiivset stressi läbi püruvaat → laktaat reaktsiooni, kus NADH oksüdeeritakse NAD⁺-iks. Transportides laktaati rakust välja söötmesse, vabaneb rakk üleliigsest reduktiivsest jõust.

Suure tõenäosusega vabastab see tsitraaditsükli pidurduse alt ja taastub elektronide liikumine ETA-s.

Püruvaadi efekt ja ETA inhibitsioon on seletatav ka alternatiivse teooriaga, kus kompleks I atsetüleerimine viib ETA pidurduseni. Tavatingimustes konverteeritakse püruvaat atsetüül-CoA-ks, mis siseneb tsitraaditsükli. Teadaolevat vähendab kõrge NADH tsitraaditsükli aktiivsust (millele viitavad ka käesoleva töö tulemused) ning selle tulemusena kuhjub atsetüül-CoA. Seda atsetüülrühma kasutatakse, et atsetüleerida mitokondri ensüüme. Atsetüleerimine inhibeerib nende tööd. Näiteks Sirt3 (Sirtuin 3) on deatsetülaas, mis eemaldab mitokondri ensüümidelt atsetüülrühma ja taastab nende aktiivsuse. Kõrge NADH inhibeerib Sirt3 tööd (Cortés-Rojo jt., 2020; Hirschey jt., 2011; Zhang jt., 2021). Seega viib atsetüül-CoA ja NADH tasemete tõus olukorrani, kus mitokondriaalsed ensüümid on atsetüleeritud ja nende töö inhibeeritud. Varasemad tulemused näitavad, et ülekaalulisus (nt tingitud glükoosirikka toidu tarbimisest) põhjustab kompleks I inhibitsiooni, kuna see on atsetüleeritud (Zamora-Mendoza jt., 2018). Kuivõrd kompleks I on peamine ETA komponent, mis oksüdeerib NADH NAD⁺-iks ja aitab taastada NADH/NAD⁺ tasakaalu, siis selle inhibitsioon tõstab NADH/NAD⁺ suhet ja suurendab reduktiivset stressi (Korge et al., 2016). Tekib positiivne tagasiside ahel, kus kõrge NADH põhjustab kompleks I atsetüleerimise, mis omakorda tõstab NADH-d. VHL puudulikes neerurakkudes vähendab püruvaat tsütosooli NADH taset, selle tulemusena väheneb ka mitokondri redutseeritus. See omakorda viib potentsiaalselt Sirt3 aktivatsioonini, mis deatsetüleerib ja aktiveerib mitokondri ensüümid. Seega oleks käesoleva uurimistö tulemustest lähtuvalt huvitav edaspidi teada saada, kas VHL puudulikes rakkudes on mitokondriaalsed ensüümid atsetüleeritud ning kuidas mõjutab püruvaadi lisamine atsetüleeritust ja Sirt3 taset.

DNP on “lahutaja” või “lühistaja” (inglise keeles *uncoupler*). Lahutajad on lipiidides lahustuvad nõrgad happed, mis kannavad prootoneid või tekitavad prootonite liikumise võimaluse läbi membraani tagasi mitokondri maatriksisse ja sellega vähendavad prootongradienti. Selle tulemusena peab rakk kasutama rohkem NADH-d, et taastada prootongradienti. Antud töö tulemused näitavad, et DNP suurendab VHL-puudulike neerurakkude hingamist, kuid ei vähenda reduktiivset stressi. Need tulemus viitavad sellele, et prootonite liikumine läbi mitokondri sisemembraani ei ole piisav, et vähendada reduktiivset stressi. See paistab omakorda viitavat võimalusele, et VHL-puudulikes rakkudes on ETA

pidurdus eelkõige realiseerunud komplekside I-IV tasemel, mistõttu puudub prootongradiendi manipuleerimisel statistiliselt oluline mõju raku hingamisele.

VHL sündroom on tänaseni ravimatu haigus. Seda põdevatel inimestel on oluliselt lühem keskmine eluiga kui üldpopulatsioonil. Antud uurimistöo laiendab praegust arusaama VHL puudulike neerurakkude metabolismist ning annab sisendit edasiste teemade uurimisse. Reduktiivset stressi seostatakse mitmete muude patoloogiliste protsessidega nagu oksüdatiivne stress, insuliinresistentsus ja rasvhapete puudulik ainevahetus (Cortés-Rojo jt., 2020; Xiao ja Loscalzo, 2020). Töö käigus selgus, et reduktiivse stressi vähendamine suurendab VHL puudulike neerurakkude hingamist. Reduktiivse stressi terapeutiline tähtsus ccRCC puhul on tulevaste uuringute teema. Arvatavasti võimaldab NADH/NAD⁺ suhte vähendamine ccRCC korral suurendada mitokondriaalset hingamist. See võib olla terapeutiliselt kasulik, kuna suunab kasvaja metabolismi vähem pahaloomulise metaboolse profiili suunas (nt eemale aeroobsest glükolüüsist).

Antud uurimistöo tulemustest võib järeldada, et:

- 1) VHL puudulikes rakkudes on tsitraaditsükkel ja ETA väiksema aktiivsusega;
- 2) VHL puudulikes rakkudes esineb reduktiivne stress, mis väljendub kõrgemas NADH/NAD⁺ suhtes ja vähenenud hingamisaktiivsuses;
- 3) VHL puudulikes rakkudes on reduktiivne stress ja hingamise aktiivsus glükoosist sõltuvad;
- 4) Reduktiivset stressi on võimalik vähendada glükoosi eemaldamisega ning kasutades püruvaati või resasuriini.

KOKKUVÕTE

Antud uurimistöö käigus selgus, et VHL-puudulikel neerurakkudel on nii tsitraaditsükkel kui hingamisahel väiksema aktiivsusega võrreldes MT neerurakkudega. Sellele viitavad CO₂ eraldumise (reduktiivjõudu tootvad protsessid) ja O₂ tarbimise (reduktiivjõudu tarbivad protsessid) mõõtmised. Kui rakus on palju NADH-d, siis inhibeeritakse tsitraaditsükkel, et reduktsioon veel suuremaks ei läheks. Seega oli töö üks eesmärk hinnata, kas VHL-puudulikes rakkudes esineb reduktiivset stressi. Saadud tulemused näitavad, et VHL-puudulikes rakkudes esineb reduktiivne stress, mis väljendus täissöötmes 2-4 korda kõrgema NADH/NAD⁺ suhtega võrreldes MT rakkudega. Eelmainitud mõju oli glükoosist sõltuv, kuna glükoosi eemaldamine normaliseeris VHL-puudulikes rakkudes NADH/NAD⁺ suhte. Kõrgemat reduktiivjõudu prooviti vähendada ka kasutades püruvaati, DNP-d ja resasuriini. Need ained osalevad reaktsioonides, mis tarbivad NADH-d. NADH/NAD⁺ suhte mõõtmine näitas, et püruvaat ja resasuriin vähendasid VHL puudulike rakkude NADH/NAD⁺ suhet võrreldes kontrolliga, samas DNP mõju NADH/NAD⁺ suhtele ei olnud statistiliselt oluline. Reduktiivse stressi vähendamine (glükoosi eemaldamine ning püruvaadi või resasuriini lisamine) tõstsid VHL puudulike neerurakkude tsitraaditsükli ja hingamisahela aktiivsusi. Need tulemused pakuvad välja uudse lähenemise kuidas oleks võimalik muuta VHL puudulike vähkkasvajate metaboolset profiili.

Reductive stress in VHL deficient renal cells

Andria Hüva

Summary

Von Hippel-Lindau (VHL) disease is an autosomal hereditary cancer syndrome, caused by mutations in the VHL gene. Patients suffering from VHL disease develop multiple tumours, most frequently ccRCC (clear cell renal cell carcinoma). VHL protein has a central role in hypoxia (oxygen deprivation) response and HIF signalling. Loss of VHL causes a pseudohypoxic state characterised by accumulation of HIF-1 and up-regulation of hypoxia related genes. ccRCC cannot be explained by the effects of HIF signalling alone, and resistance to conventional therapies necessitates the need for deeper understanding of underlying mechanisms. Reductive stress is defined as a condition characterised by an increased NADH to NAD⁺ ratio. It is unclear whether VHL deficient ccRCCs encounter reductive stress. In the present study human-derived renal proximal tubular cells (HKC-8 cell line) were used as a model of normal renal cells and their VHL-deficient counterparts as a model for ccRCC.

The results show that VHL deficiency leads to reductive stress characterised by increased NADH/NAD⁺ ratio, decreased citric acid cycle (TCA) and electron transport chain (ETC) activities. Reductive stress was alleviated by glucose depletion and supplementation with pyruvate or resazurin, a redox-reactive agent. This study demonstrates that reductive stress is a part of the phenotype associated with VHL-deficiency in renal cells and indicates that the reversal of reductive stress can enhance respiration. The current evidence highlights potential strategies for altering the metabolic profile of VHL-deficient tumours.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Binderup, M. L. M. (2018). von Hippel-Lindau disease: Diagnosis and factors influencing disease outcome. *Danish Medical Journal*, 65(3), B5461.
- Bouthelier, A., & Aragonés, J. (2020). Role of the HIF oxygen sensing pathway in cell defense and proliferation through the control of amino acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(9), 118733.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118733>
- Bukavina, L., Bensalah, K., Bray, F., Carlo, M., Challacombe, B., Karam, J. A., Kassouf, W., Mitchell, T., Montironi, R., O'Brien, T., Panebianco, V., Scelo, G., Shuch, B., van Poppel, H., Blosser, C. D., & Psutka, S. P. (2022). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. *European Urology*, 82(5), 529–542.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.08.019>
- Calzada, M. J. (2010). Von Hippel-Lindau syndrome: Molecular mechanisms of the disease. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 12(3), 160–165.
<https://doi.org/10.1007/s12094-010-0485-9>
- 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., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.-H., Dare, A. J., James, A. M., Rogatti, S., Hartley, R. C., Eaton, S., Costa, A. S. H., ... Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431–435.
<https://doi.org/10.1038/nature13909>
- Cortés-Rojo, C., Vargas-Vargas, M. A., Olmos-Orizaba, B. E., Rodríguez-Orozco, A. R., & Calderón-Cortés, E. (2020). Interplay between NADH oxidation by complex I, glutathione redox state and sirtuin-3, and its role in the development of insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(8), 165801. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165801>

- Favier, J., Brière, J.-J., Burnichon, N., Rivière, J., Vescovo, L., Benit, P., Giscos-Douriez, I., Reyniès, A. D., Bertherat, J., Badoual, C., Tissier, F., Amar, L., Libé, R., Plouin, P.-F., Jeunemaitre, X., Rustin, P., & Gimenez-Roqueplo, A.-P. (2009). The Warburg Effect Is Genetically Determined in Inherited Pheochromocytomas. *PLOS ONE*, *4*(9), e7094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007094>
- Greene, J., Segaran, A., & Lord, S. (2022). Targeting OXPHOS and the electron transport chain in cancer; Molecular and therapeutic implications. *Seminars in Cancer Biology*, *86*, 851–859. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.02.002>
- Hakimi, A. A., Reznik, E., Lee, C.-H., Creighton, C. J., Brannon, A. R., Luna, A., Aksoy, B. A., Liu, E. M., Shen, R., Lee, W., Chen, Y., Stirdivant, S. M., Russo, P., Chen, Y. B., Tickoo, S. K., Reuter, V. E., Cheng, E. H., Sander, C., & Hsieh, J. J. (2016). An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell*, *29*(1), 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.12.004>
- Hanse, E. A., Ruan, C., Kachman, M., Wang, D., Lowman, X. H., & Kelekar, A. (2017). Cytosolic malate dehydrogenase activity helps support glycolysis in actively proliferating cells and cancer. *Oncogene*, *36*(27), 3915–3924. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.36>
- Hirschey, M. D., Shimazu, T., Huang, J.-Y., Schwer, B., & Verdin, E. (2011). SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *76*, 267–277. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010850>
- Hubbi, M. E., & Semenza, G. L. (2015). Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *309*(12), C775–C782. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00279.2015>
- Hudler, P., & Urbancic, M. (2022). The Role of VHL in the Development of von Hippel-Lindau Disease and Erythrocytosis. *Genes*, *13*(2), 362. <https://doi.org/10.3390/genes13020362>
- Ikeda, H., & Kakeya, H. (2021). Targeting hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling with

- natural products toward cancer chemotherapy. *The Journal of Antibiotics*, 74(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00451-0>
- Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., & Iacobazzi, V. (2021). Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>
- Kaelin, W. G. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nature Reviews Cancer*, 2(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrc885>
- Korge, P., Calmettes, G., & Weiss, J. N. (2016). Reactive oxygen species production in cardiac mitochondria after complex I inhibition: Modulation by substrate-dependent regulation of the NADH/NAD(+) ratio. *Free Radical Biology & Medicine*, 96, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.002>
- Lavogina, D., Lust, H., Tahk, M.-J., Laasfeld, T., Vellama, H., Nasirova, N., Vardja, M., Eskla, K.-L., Salumets, A., Rincken, A., & Jaal, J. (2022). Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. *Biosensors*, 12(4), 196. <https://doi.org/10.3390/bios12040196>
- Maher, E. R., Iselius, L., Yates, J. R., Littler, M., Benjamin, C., Harris, R., Sampson, J., Williams, A., Ferguson-Smith, M. A., & Morton, N. (1991). Von Hippel-Lindau disease: A genetic study. *Journal of Medical Genetics*, 28(7), 443–447. <https://doi.org/10.1136/jmg.28.7.443>
- Makhov, P., Joshi, S., Ghatalia, P., Kutikov, A., Uzzo, R. G., & Kolenko, V. M. (2018). Resistance to Systemic Therapies in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Management Strategies. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(7), 1355–1364. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1299>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Maxwell, P., Wiesener, M., Chang, G.-W., Clifford, S., Vaux, E., Cockman, M., Wykoff, C.,

- Pugh, C., Maher, E., & Ratcliffe, P. (1999). Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, and Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399: 271-275. *Nature*, 399, 271–275.
<https://doi.org/10.1038/20459>
- McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology*, 16(14), R551–R560.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(Pt 1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nazaret, C., Heiske, M., Thurley, K., & Mazat, J.-P. (2009). Mitochondrial energetic metabolism: A simplified model of TCA cycle with ATP production. *Journal of Theoretical Biology*, 258(3), 455–464. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.09.037>
- Ou, X., Ji, C., Han, X., Zhao, X., Li, X., Mao, Y., Wong, L.-L., Bartlam, M., & Rao, Z. (2006). Crystal structures of human glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1). *Journal of Molecular Biology*, 357(3), 858–869. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.074>
- Seizinger, B. R., Rouleau, G. A., Ozelius, L. J., Lane, A. H., Farmer, G. E., Lamiell, J. M., Haines, J., Yuen, J. W. M., Collins, D., Majoor-Krakauer, D., Bonner, T., Mathew, C., Rubenstein, A., Halperin, J., McConkie-Rosell, A., Green, J. S., Trofatter, J. A., Ponder, B. A., Eierman, L., ... Gusella, J. F. (1988). Von Hippel–Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*, 332(6161), Article 6161. <https://doi.org/10.1038/332268a0>
- Semenza, G. L. (2000). HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 88(4), 1474–1480.
<https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1474>
- Serocki, M., Bartoszewska, S., Janaszak-Jasiecka, A., Ochocka, R. J., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2018). miRNAs regulate the HIF switch during hypoxia: A novel therapeutic target. *Angiogenesis*, 21(2), 183–202. <https://doi.org/10.1007/s10456->

018-9600-2

Shuch, B., Linehan, W. M., & Srinivasan, R. (2013). Aerobic glycolysis: A novel target in kidney cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(6), 711–719.

<https://doi.org/10.1586/era.13.57>

Zamora-Mendoza, R., Rosas-Vargas, H., Ramos-Cervantes, M. T., Garcia-Zuniga, P., Perez-Lorenzana, H., Mendoza-Lorenzo, P., Perez-Ortiz, A. C., Estrada-Mena, F. J., Miliar-Garcia, A., Lara-Padilla, E., Ceballos, G., Rodriguez, A., Villarreal, F., & Ramirez-Sanchez, I. (2018). Dysregulation of mitochondrial function and biogenesis modulators in adipose tissue of obese children. *International Journal of Obesity (2005)*, 42(4), 618–624. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.274>

Zhang, Y., Wen, P., Luo, J., Ding, H., Cao, H., He, W., Zen, K., Zhou, Y., Yang, J., & Jiang, L. (2021). Sirtuin 3 regulates mitochondrial protein acetylation and metabolism in tubular epithelial cells during renal fibrosis. *Cell Death & Disease*, 12(9), 847.

<https://doi.org/10.1038/s41419-021-04134-4>

Zhao, Y., Jin, J., Hu, Q., Zhou, H.-M., Yi, J., Yu, Z., Xu, L., Wang, X., Yang, Y., & Loscalzo, J. (2011). Genetically encoded fluorescent sensors for intracellular NADH detection. *Cell Metabolism*, 14(4), 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.09.004>

Xiao, W., & Loscalzo, J. (2020). Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(18), 1330–1347. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7803>

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Andria Hüva

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “VHL geeni puudulikkus viib neerurakkudes reduktiivse stressini” mille juhendajad on Kattri-Liis Eskla ja Lilian Kadaja-Saarepuu.

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **25.05.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Andria Hüva

23.05.2023