

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Mitokondriaalsed DNA metüültransferaasid kui potentsiaalsed mitokondriaalse
nukleoidiga assotsieerunud valgud ja nende roll mtDNA säilitamises**

Magistritöö

40 EAP

Julija Bolšakova

Juhendaja taimefüsioloogia dotsent PhD Joachim Matthias Gerhold

TARTU 2017

Mitokondriaalsed DNA metüültransferaasid kui potentsiaalsed mitokondriaalse nukleoidiga assotsieerunud valgud ja nende roll mtDNA säilitamises

Mitokondrite talitus on otseselt seotud mitokondriaalse DNA-ga (mtDNA), mis esineb kompleksis spetsiifiliste valkudega, moodustades kompaktsed struktuure – nn nukleoide. Mitokondriaalne DNA helikaas Twinkle ja transkriptsioonifaktor A (TFAM) kuuluvad nukleoidi “tuumikvalkude” hulka ning on olulised mtDNA säilitamises. MtDNA metabolism võib olla reguleeritud epigeneetiliste mehhanismide kaudu. Seni avaldatud andmed nii mtDNA metüülatsiooni kui ka metüülatsiooni eest vastutavate DNA metüültransferaaside (DNMT) kohta on endiselt vastuolulised. Käesoleva töö käigus on näidatud DNA metüültransferaaside – DNMT1 ja DNMT3A – esinemine HEK293e rakkude mitokondriaalses fraktsioonis. Töö käigus ilmnis, et DNMT1 ja DNMT3A hulk rakus muutub vähesel määral vastusena kahe mitokondriaalse nukleoidiga assotsieerunud valgumahasurumisele. Siiski selgus, et HEK293e rakuliini mtDNA NCR piirkonna tsütosiini metüülatsioon on, kui üldse, tühine ning suure tõenäosusega ei oma regulatoorset tähtsust mitokondriaalses geeniekspressioonis ja/või DNA säilitamises.

Märksõnad: Mitokondrid, nukleoid, epigeneetika, mtDNA metüülatsioon, DNMT1/3A

CERCS teaduseriala: P320: Nukleiinhappesüntees, valgusüntees P310: Valgud, ensümoloogia

Mitochondrial DNA methyltransferases - potential nucleoid associated proteins and possible functions in mtDNA maintenance

Proper functioning of mitochondria is linked to the presence of mitochondrial DNA (mtDNA) which is present in compact complexes with specific proteins termed nucleoids. The mtDNA helicase Twinkle and the transcription factor A (TFAM) belong to the “core-components“ of nucleoids and have important functions in mtDNA maintenance. The metabolism of mtDNA may be regulated through epigenetic mechanisms. However, data on mtDNA methylation and DNA methyltransferases to date are, at least in parts, contradictory. In the course of the current project it could be shown that the DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3A are present in mitochondrial fractions from HEK293e cells. Both proteins slightly responded to knock-downs of nucleoid proteins, whereas clear signs of mtDNA methylation in the NCR or changes to it did not occur. Methylation apparently might not have regulatory functions in mitochondrial gene expression and/or DNA maintenance.

Key words: Mitochondria, nucleoid, epigenetics, mtDNA methylation, DNMT1/3A

CERCS: P320: Nucleic acids, protein synthesis P310: Proteins, enzymology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1.Mitokondri iseloomustus	8
1.1.1. Mitokondri ehitus ja funktsioon.....	8
1.1.2. Mitokondri päritolu ja evolutsioon	9
1.1.3. Mitokondriaalne genoom.....	10
1.1.4. mtDNA organisatsioon	12
1.2.Genoomi epigeneetiline regulatsioon	14
1.2.1. Rakutuuma epigenoom	14
1.2.2. DNA metülatsiooniga seotus mehhanismid rakutuumas.....	17
1.2.3. Keskkonna roll DNA metülatsioonis.....	18
1.2.4. Mitokondriaalne epigeneetika	19
1.2.5. Mitokondri kui DNA metüültransferaaside sihtpunkt	21
1.3.Mitokondriaalsed haigused.....	22
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	26
2.1.Töö eesmärk.....	26
2.2.Materjal ja meetodika	26
2.2.1. Rakuliin ja kasvutingimused.....	26
2.2.2. RNA interferents, rakkude transfekteerimine siRNA-ga.....	26
2.2.3. Mitokondrite isoleerimine, subfraksioneerimine digitoniiniga	27
2.2.4. Western blot analüüs.....	28
2.2.5. Southern blot radioaktiivse hübriidisatsiooniga	30
2.2.6. <i>Proteinase K protection assay</i> DNMT lokaliseerimise määramiseks	31
2.2.7. mtDNA ekstraheerimine ja EpiTYPER analüüs.....	31
2.3.Tulemused ja arutelu.....	33
2.3.1. DNMT1 ja DNMT3A lokaliseeruvad Twinkle <i>knock-down</i> rakkude mitokondriaalses fraktsioonis	33
2.3.2. DNMT1 ja DNMT3A on detekteeritavad TFAM <i>knock-down</i> rakkude mitokondriaalses fraktsioonis	36

2.3.3. CpG metülatsiooni puudumine TFAM <i>knock-down</i> , Twinkle <i>knock-down</i> ja kontrollrakkude mtDNA mittekodeerivas piirkonnas ...	38
2.3.4. DNMT1 on assotsieerunud mitokondri välismembraaniga, DNMT3A lokaliseerub mitokondri membraanidevahelises ruumis.....	44
KOKKUVÕTE	49
SUMMARY	50
KIRJANDUSE LOETELU.....	52
LISAD	64
Lisa 1 Väljavõte laboris kasutatavast mitokondriaalse valgu atsetoon-sadestamise protokollist.....	64
Lisa 2 Väljavõte laboris kasutatavast mtDNA eraldamise, ekstraheerimise ja sadestamise protokollist.....	65
Lisa 3 Väljavõte SEQUENOM EpiTYPER programmi poolt genereeritud praimeritega ja nendele vastavate ampliconidega mtDNA NCR CpG metülatsiooni analüüsimiseks	66
Lisa 4 Käesolevas töös EpiTYPER meetodi jaoks kasutatud praimerid	67
Lisa 5 TFAM <i>knock-down</i> , Twinkle <i>knock-down</i> ja kontrollrakkudest eraldatud mtDNA iga NCR piirkonna CpG positsiooni keskmine metülatsiooni osakaal	68
LIHTLITSENTS.....	69

KASUTATUD LÜHENDID

5(h)mC – 5-(hüdrosü)metüültsütosiin

ALS – amüotroofne lateraalne skleroos

BrU – 5-bromo-2'deoksüüridiin

COX II – tsütokroom c oksüdaasi II subühik

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagles meedium

DNMT – DNA metüültransferaas

ECL – ingl *enhanced chemiluminescence*, võimendatud kemiluminesents

ESC – embrüonaalsed tüvirakud

HEK293 – ingl *human embryonic kidney cells*, inimese embrüonaalsed neerurakud

HSP60 – ingl *heat shock protein*, kuumašoki valk 60 kDa

MeCP – metüleeritud tsütosiini siduvad valgud

MMP – maatriksi-metalloproteasid

mtDNA – mitokondriaalne DNA

mtSSB – üheaheelalist DNA-d siduv valk

nDNA – tuuma DNA

NCR – mitokondriaalse DNA mittekodeeriv piirkond

PBS – ingl *phosphate buffered saline*, fosfaatpuhverdatud soolalahus

PMSF - fenüülmetaansulfonüülfluoriid

POLG – DNA polümeraas γ

POLRMT – mitokondriaalne RNA polümeraas

RNAi – RNA interferents

ROS – ingl *reactive oxygen species*, reaktiivsed hapnikuühendid

SAM – S-adenosüülmetioniin

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geelelektroforees

SSC – ingl *saline sodium citrate*, naatriumtsitraadi soolalahus

TBST – Tris-puhverdatud soolalahus Tween 20 lisandiga

TET – ingl *ten-eleven translocation enzyme*, metüültsütosiini dioksügenaas

TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A

TFBM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor B

TOM40 – ingl *translocase of the outer membrane*, välismembraani translokaas 40 kDa

VDAC1 – mitokondriaalne poriin, pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1

SISSEJUHATUS

Eukarüootse raku mitokondrid moodustavad omalaadse infrastruktuuri, kus kehtivad omad “mängureeglid”. Mitokondrites toimub replikatsioon ning valkude (Ibrahim jt., 1973) ja RNA molekulide süntees (Clayton, 2000). Mitokondrid on ainukesed loomse raku organellid lisaks rakutuumale, mis sisaldavad pärilikkusainet – mitokondriaalset DNA-d (mtDNA) (Nass ja Nass, 1963). MtDNA on asendamatu mitokondri korrektseks funktsioneerimiseks, eelkõige energia tootmise seisukohalt. MtDNA on kaetud spetsiifiliste valkudega, moodustades nukleoidiks nimetatava struktuuri, mis kindlustab head keskkonda mtDNA replikatsiooni, transkriptsiooni ja reparatsiooni toimumiseks (Hensen jt., 2014). MtDNA säilitamine ja metabolism on tihedalt seotud mitokondriaalse helikaasi Twinkle ja mitokondriaalse transkriptsioonifaktori A (TFAM) funktsiooniga, kuna mõlema valgu kadumine rakus põhjustab kiiret mtDNA koopiaarvu langust (Kang jt., 2007; Tyynismaa jt., 2004), häirides seeläbi mitokondrite normaalset talitlust (Li jt., 2012).

Organismi fenotüübi määravad ära ühelt poolt geneetiline informatsioon, teiselt poolt keskkonnatingimused. Neid integreerivaks lüliks on muuhulgas epigeneetilised mehhanismid, mis reguleerivad geeniekspressiooni DNA primaarjärjestust muutmata (Jones ja Takai, 2001). Geeniekspressiooni aktiivsuse reguleerimise kaheks põhiliseks molekulaarseks mehhanismiks peetakse kromatiini pakitusastme ja DNA metüülatsiooni taseme muutmist vastavalt raku vajadustele (Jaenich ja Bird, 2003). DNA metüleerimist viivad läbi selleks spetsialiseerunud ensüümid – DNA metüültransferaasid (DNMT-d) (Klose ja Bird, 2006). Mitokondriaalne epigeneetika tõusis tähelepanu keskpunkti suhteliselt hiljuti, pärast seda, kui leiti, et mitokondrite alatalitus on seotud rea raskete haigusseisunditega, eelkõige müopaatiate ja (Chesnut jt., 2011) ja neurodegeneratiivsete haigustega (Coskun jt., 2012), samuti mitmete kasvajatega (Ferreira jt., 2015). Lisaks sellele on tänapäeval üha rohkem hakatud rääkima mitokondri olulisusest südame-veresoonkonna patogeneesis (Tsutsui jt., 2011).

Imetajate mtDNA metüülatsiooni esinemine ja selle roll mitokondriaalse geeniekspressiooni regulatsioonis ja üldises mitokondri metabolismis on endiselt täis vastuolusid ja küsimärke (Bianchessi jt., 2016; Liu jt., 2016). Käesolevas uurimistöös uurisin DNA metüültransferaaside – DNMT1 ja DNMT3A – levimust embrüonaalsetes neerurakkudes HEK293e ja seda just mitokondriaalse lokaliseerimise fookuses. Rakendades biokeemilise fraktsioneerimise meetodeid uurisin mitokondriaalseid valke ja võimalikke muutusi nende hulgas vastusena siRNA-vahendatud Twinkle ja TFAM valgu ekspressiooni mahasurumisele

(*knock-down*). Lisaks sellele uurisin mtDNA CpG metülatsiooni taset ja selle võimalikke muutusi TFAM ja Twinkle *knock-down* tingimustel, keskendudes reguleeriva tähtsusega mtDNA mittekodeeriva piirkonna (ingl *non-coding region*, NCR) analüüsimisele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mitokondri iseloomustus

1.1.1. Mitokondri ehitus ja funktsioon

Mitokondrid on eukarüootse raku kahe membraaniga ümbritsetud tsütoplasmaatilised organellid, mis moodustavad raku energeetilise aluspõhja (Saraste, 1999). Mitokondreid iseloomustab plastilisus, ühes rakus võib samal ajal esineda nii sfäärilisi kui ka filamentseid vorme, organellide diameeter jääb suurusvahemikku ~0,5–1 µm, pikkus kuni 7 µm (Krauss, 2001). Mitokondrite ülesehitus jaotub neljaks kompartmendiks: välismembraan, sisemembraan, membraanidevaheline ruum ja sisemembraaniga piiritletud maatriksi ruum (Kotiadis jt., 2014; Krauss, 2001). Mitokondri sisemembraanis on hulgaliselt sissesopistisi ehk kristasid, mis suurendavad membraani kogupindala (Kotiadis jt., 2014). Igat kompartimenti iseloomustab spetsiifiline valkude, sh ensüümide kompleks. Näiteks, mitokondri välismembraanis asuvad pingest sõltuvad poriinkanalid (ingl *voltage dependent anion channel*, VDAC), valgu impordi eest vastutavad translokaasid (ingl *translocase of the outer membrane*, TOM) ning signaalradade retseptorid. Sisemembraanis lokaliseeruvad mitokondriaalse hingamisahela valgukompleksid, mitokondri maatriks sisaldab rohkelt mitokondri metabolismi seisukohalt olulisi valke (nt tsitraaditsükli valgud, aminohapete ja lipiidide metabolismiga seotud valgud) (Taylor jt., 2003).

Mitokondrid moodustavad raku sees dünaamilise võrgustiku, pidevalt muutuva koosluse. Organellide jagunemine, kokkusulamine, liikumine tsütoskeleti vahendusel – kõik need protsessid on olulised mitokondrite korrektseks funktsioneerimiseks (Westermann, 2008; Legros jt., 2004). Ühes rakus on tavaliselt sadu kuni tuhandeid organelle, antud number varieerub liigiti, koe- ja rakutüübiti, muutusi esineb ka organismi arengu ning vananemise käigus (Cole, 2016).

Mitokondrid täidavad rea elutähtsaid funktsioone. Kõige enam tuntakse neid raku aeroobse metabolismi keskustena, kus toimub orgaaniliste ainete, süsivesikute, lipiidide ja valkude, lagundamisel tekkinud redutseeritud ühendite (nt NADH/NADPH ja FADH/FADPH) oksüdeerimine ning vabanenud elektronide ülekande molekulaarsele hapnikule piki raku hingamisahelat. Hingamisahel koosneb neljast mitokondri sisemembraanis asuvast ja mitmest subühikust koosnevast valgulisest kompleksist (I–IV), mida mööda elektronide transpordiga kaasneb prootonite pumpamine mitokondri maatriksist läbi sisemembraani

membraanidevahelisse ruumi. Protsessi käigus tekib sisemembraani kahe külje vahel prootongradient. Prootonite liikumisel läbi F_1F_0 -ATP süntaasi, hingamisahela V kompleksi, vabaneb elektrokeemiline energia, mida salvestatakse ATP kujul (Saraste, 1999).

Lisaks ATP sünteesile on mitokondrid asendamatud mitmes ainevahetuslikus protsessis, mis ei ole otseselt seotud energia tootmisega. Nimelt, mitokondrites toimub rasvhapete β -oksüdatsioon, nukleotiidide ja aminohapete metabolism (Taylor jt., 2003), samuti uurea tsükkel, mille käigus kahjutustakse ja elimineeritakse organismile toksilisi lämmastikuühendeid (Zorov jt., 1997). Mitokondrid on oluline heemi ja steroidide allikas (Zorov jt., 1997) ning tagab raku kaltsiumi homöostaasi (Gunter jt., 2004). Mitokondrid täidavad ka rida regulatoorseid ülesandeid. Mitokondrid täidavad rakus omalaadset „sensori“ funktsiooni ning moduleerivad rakulist vastust väliskeskkonna stressoritele (Manoli jt., 2007). On näidatud, et mitokondrites toodetud madalates kontsentratsioonides reaktiivsed hapnikuühendid (ingl *reactive oxygen species*, ROS) käituvad signaalmolekulidena (nt NO, H_2O_2), mille vahendusel toimub nii rakusisene kui ka rakkudevaheline kommunikatsioon, sealjuures suurenenud ROS hulk käivitab programmeeritud rakusurma ehk apoptoosi (Giorgio jt., 2005). Mitokondrid kaitsevad rakku oksüdatiivse stressi eest, sisaldades valgulisi antioksidante (Valle jt., 2005). Mitokondritel on oma osa tuuma DNA (ingl *nuclear DNA*; nDNA) ekspressiooni regulatsioonis (Castegna jt., 2015), muuhulgas reguleerivad nad ka iseenda taastootmist (Ott ja Herrmann, 2010).

1.1.2. Mitokondri päritolu ja evolutsioon

Mitokondri päritolu teema on pälvinud suurt huvi ja tähelepanu tänu mtDNA olemasolule. Mitokondrid on ainukesed loomse raku organellid, mis sisaldavad nukleiinhapet. Koos sekveneerimistehnoloogia arenguga tuli suur hulk uusi andmeid, mis võimaldasid selgitada mitokondriaalse genoomi päritolu ja evolutsiooni protsesse (Gray jt., 2001). Ühiselt aktsepteeritud endosümbioosi teooria kohaselt on mitokondrid kahe elu ühtesulamise tulemus. Arvatakse, et tuumaga eukarüootne peremeesrakk „haaras“ enda sisse bakterist endosümbiondi (Lang jt., 1999), mis evolutsioonilises mõttes osutus mõlema osapoole jaoks kasulikuks ning tõstis nende kohanemisvõimet tol ajal valitsevate keskkonnatingimuste juures. Edaspidise evolutsiooni käigus omandas prokarüootne rakk kindlaid funktsioone ning muutus peremeesraku organelliks. Fülogeneetilised analüüsid erinevate organismigruppide vahel näitasid, et α -proteobakterid on lähimas suguluses mitokondritega (Gray jt., 2001; Lang

jt., 1999), seega eukarüootse raku mitokondrid ei ole midagi muud, kui kaasaegse α -proteobakteri eellase järglased, mis evolutsiooni käigus on “lihtsustunud” tänapäeva kujuni (Adams ja Palmer, 2003; Lang jt., 1999).

1.1.3. Mitokondriaalne genoom

Mitokondriaalse genoomi evolutsiooni kirjeldavateks märksõnadeks on reduktsioon ja järkjärguline autonoomsuse vähenemine, mida iseloomustab üsna silmapaistev geeni- ja liigispetsiifiline variatsioon. Kaasaegse mitokondri DNA on jaotunud kahe kompartmendi vahel: väike hulk geene sisaldub mitokondrites mtDNA rõngasmolekuli (mitme koopia) koosseisus ning suurem osa (~99%) mitokondri „ehitusplokkide“ tootmiseks vajalikust informatsioonist säilitatakse tuuma DNA-s (Adams ja Palmer, 2003). MtDNA ei allu Mendeli pärandumisseadustele, kuna iga uus organism saab oma mtDNA vaid emaliini pidi (Chinnery jt., 2012). MtDNA geenide produktid koos tsütoplasmast imporditud RNA (nt 5SrRNA, RNAas MRP, RNAas P) (Sripada jt., 2012) ja valkudega varustavad mitokondreid nende isikliku DNA replikatsiooni, transkriptsiooni, mRNA protsessimise (Clayton, 2000) ja valgusünteesi süsteemidega (Ibrahim jt., 1973; McLean jt., 1958), mida viivad läbi vastavalt mitokondri-spetsiifiline DNA polümeraas γ (POLG), ühesubühikuline RNA polümeraas (POLRMT) koos mitokondri-spetsiifiliste transkriptsioonifaktoritega ning mitokondriaalsed tRNA molekulid ja ribosoomid. Lisaks sellele on mitokondrites oma reparatsioonisüsteem – lämmastikaluse väljalõikereparatsioon (ingl *base excision repair*, BER) (Canugovi jt., 2010).

Hulkkraksete organismide mtDNA on pea alati rõngasmolekuli kujul. Erandiks on teatud *Cnidaria* hõimkonna ainuõssed, kelle mitokondrid sisaldavad lineaarset genoomi (Boore, 1999). Erinevalt nDNA-st, mis sisaldab rohkelt mittekodeerivaid järjestusi, on loomade mitokondrite genoom väga inforikas ning ei sisalda retrotransposoone, nagu LINE-1 ja Alu elemente (Byun ja Baccarelli, 2014). Uuringust, mille viisid läbi Lynch jt (2006), selgus, et mitokondri mittekodeeriva DNA osakaal on vaid 0,05–0,1, samal ajal kui eukarüootide nDNA vastavaks näitajaks on 0,64–0,68.

Loomade mitokondriaalse genoomi suurus langeb vahemikku 14–20 kb (Lynch jt., 2006). Inimese mtDNA on 16 569 bp suurune kaheaahelaline rõngasmolekul, milles eristatakse guaniinirikast rasket ja tsütosiinirikast kergest DNA-ahelat (vastavalt H- ja L-ahel) (Ferreira jt., 2015). Mõlemad ahelad on transkriptsiooniliselt aktiivsed. Sarnaselt teiste eukarüootide mtDNA-le kodeerib inimese mtDNA 37 geeni: 22 translatsioonile osalevat tRNA ja kaks

(Clayton, 2000). Brown ja Clayton (2002) töö tulemused näitasid, et D-ling aitab kaasa mtDNA avatud struktuuri säilitamisele ning on oluline mtDNA koopiaarvu reguleerimises, soodustades replikatsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni. Enamus inimeste mtDNA variatsioonidest langeb NCR piirkonda, kontsentreerudes kolme hüpervariaabelpiirkonda (Lutz jt., 2000).

Vaatamata sellele, et kõik mitokondriaalse replikatsiooni masinavärgi valgud – POLG, heksameerne DNA helikaas Twinkle ja üheaheelalist DNA siduv valk (mtSSB) (Hensen jt., 2014) – on kodeeritud tuumas, ei lange mtDNA sünteesi initsiatsioon rakutsükliga kokku. Kasutades 5-bromo-2’deoksüridiini DNA sünteesi markerina, näitasid Magnusson jt (2003) erinevate rakutüüpide peal ära, et mtDNA süntees toimub hajusalt üle kogu mitokondriaalse võrgustiku ning mtDNA süntees võib toimuda igal ajahetkel sõltumata rakutsükli faasist (Magnusson jt., 2003). Mitokondriaalse genoomi replikatsioon on otseselt seotud transkriptsiooniaparaadiga, kuna mtDNA kopeerimine algab spetsiifilise RNA-praimeri sünteesiga (Clayton, 2000). Tänapäeval eksisteerib kolm mudelit mitokondriaalse replikatsioonimehhanismi kirjeldamiseks. Kõige esimesena oli pakutud nn asünkroonne mudel, mille järgi replikatsioon algab H-ahela sünteesiga spetsiifilisest saidist ning kestab kuni kaks-kolmandikku mtDNA rõngasmolekulist on kopeeritud, alles siis käivitub L-ahela süntees, mida seni kaitses mtSSB (Clayton, 2000). Seda mudelit on hiljem täiendatud ning nimetatud RITOLS (ingl *RNA Incorporated Through Out the Lagging Strand*) replikatsiooni mudeliks. Antud mudel sarnaneb põhijoontes eelnevaga, erinev on L-ahela süntees, mille käigus L-ahela vastu inkorporeeritakse komplementaarne RNA. Kolmanda mudeli järgi mõlema mtDNA ahela süntees toimub samaaegselt ja vastassuunaliselt (sünkroonse ja bidirektsionaalse replikatsiooni mudel) (Holt ja Reyes, 2012).

1.1.4. mtDNA organisatsioon

Inimese mtDNA ei esine „paljal“ kujul, vaid on pakitud kompaktselt valk-DNA kompleksiks – mitokondriaalseks nukleoidiks (Iborra jt., 2004), mis on ühtlasi mtDNA pärilikkusühik (Spelbrink, 2010). Ühes mitokondris võib esineda kuni mitusada nukleoidi (Kasashima jt., 2011). Nukleoidi valgud loovad omaladse mikrokeskkonna, mis lisaks mtDNA pakkimisele ja kaitsele agressiivsete faktorite (nt nukleasid, ROS) eest (Kauppila jt., 2016) tagab sobiva keskkonna mtDNA metaboolsete protsesside toimumiseks, nagu replikatsioon ja transkriptsioon, samuti reparatsioon ja mtDNA säilitamine (Hensen jt., 2014). Mitmes

teadustöös on leitud, et iga nukleoid sisaldab keskmiselt 2–10 mtDNA molekuli (Legros jt., 2004; Iborra jt., 2004). Seevastu hiljuti ilmunud Kukat jt (2011) töös, kus kasutati suurema lahutusvõimega STED mikroskoopiat (ingl *Stimulated Emission Depletion Microscopy*), tehti kindlaks, et nukleoidi geneetiline komponent on varasemalt õigeks peetust väiksem – keskmiselt 1,4 mtDNA molekuli nukleoidi kohta.

Nukleoidi struktuur on kihiline ja pidevalt muutuv. Osa nukleoidi valke on vahetus kontaktis mtDNA-ga, mistõttu neid arvatakse nn nukleoidi tuumikvalkude hulka (Gilkerson jt., 2013). Siia kuuluvad mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A (TFAM), mtDNA replikatsioonis osalev üheaheelalist DNA-d siduv valk (mtSSB) ja helikaas Twinkle (Garrido jt., 2003; Spelbrink jt., 2001). Vaatamata sellele oli hiljuti näidatud, et ~50% nukleoididest on Twinkle suhtes negatiivsed (Rajala jt., 2014). Teatud valgud seonduvad nukleoidiga valk-valk interaktsioonide abil, sealjuures osa valkudest assotsieeruvad nukleoidiga lühiajaliselt, täitmaks oma funktsiooni vastavalt vajadusele. Need valgud osalevad nukleoidi moodustamises ja struktuuri säilitamises, samuti nukleoidide segregatsioonis, mtDNA replikatsioonis, transkriptsioonis ja reparatsiooni protsessides. Hensen jt (2014) defineerivad selliseid valke kui mitokondriaalse nukleoidiga assotsieerunud valke (ingl *mitochondrial nucleoid associated proteins*). Viimaste hulka kuuluvad näiteks mitokondriaalse membraani AAA+ valk ATAD3 ja prohibitiin (He jt., 2012), samuti POLG (Spelbrink, 2010) ning mitokondriaalne transkriptsiooni terminatsioonifaktor MTERF2 (Pellegrini jt., 2009).

Rebelo jt (2009) näitasid, et nukleoidi valk-mtDNA interaktsioone iseloomustab dünaamilisus. Transfekterides rakke bakteriaalsete järjestus-spetsiifiliste metüültransferaasidega ning sarnaseid järjestusi äratundvate metüülatsiooni suhtes tundlike restriктаasidega, demonstreerisid töö autorid, et valkude poolt pidevalt hõivatud mtDNA alad (transkriptsiooni terminatsiooni ala) olid stabiilselt kaitstud metüülatsiooni eest. Teiste regulatoorselt oluliste piirkondade (mõlema ahela promootorid, L-ahela replikatsiooni *origin*) metüülatsiooni tase varieerus, mis viitab nukleoidi valgulise koosluse muutlikkusele (Rebelo jt., 2009). Eristatakse mitut nukleoidide populatsiooni, mis erinevad üksteisest valgulise koosseisu poolest sõltuvalt mtDNA metabolismi vajadustest. Nimelt, ühes mitokondris esinevad samaaegselt transkriptsiooniliselt aktiivsed nukleoidid, sisemembraani kolesteroolirikka alaga tugevalt seonduvad replikatiivsed nukleoidid, mis sisaldavad Twinkle valku, ning vabal kujul maatriksis olevad nn mittereplikatiivsed (ingl *non-replicative*) nukleoidid, milles puudub Twinkle (Gerhold jt., 2015; Rajala jt., 2014). Arvatakse, et mtDNA

D-ling soodustab mtDNA pakkimist ning osaleb nukleoidi seondumises mitokondri sisemembraanile (Bianchessi jt., 2016).

TFAM, HMG (ingl *High Mobility Group*) perekonna valku, peetakse mtDNA metabolismi ja säilitamise seisukohalt üheks olulisemaks nukleoidi komponendiks. Sellel multifunktsionaalsel valgul on mtDNA metabolismis täita mitu asendamatu rolli: (1) reguleerib mtDNA koopiaarvu (Kang jt., 2007); (2) osaleb mtDNA replikatsioonis (Pohjoismäki jt., 2006); (3) pakib mtDNA-d (Alam jt., 2003; Kaufman jt., 2007); (4) koos mitokondriaalse transkriptsioonifaktoriga B (TFBM) reguleerib mitokondriaalset geeniekspressiooni (Clayton, 2000); (5) reguleerib mtDNA segregatsiooni mitokondri jagunemise käigus (Kasashima jt., 2011). Mõned aastad tagasi Canugovi jt (2010) teostatud *in vitro* katsete tulemused näitasid, et TFAM moduleerib mtDNA reparatsiooniprotsesse BER-süsteemi poolt.

Imetajate mitokondriaalne 5'→3' DNA helikaas Twinkle sarnaneb oma struktuuri ja funktsiooni poolest bakteriofaag T7 primaas/helikaas valguga (Spelbrink jt., 2001). Mutatsioonid Twinkle geenis viivad mtDNA deletsioonideni, mis viitab selle olulisusele mtDNA replikatsioonis (Tyynismaa jt., 2004; Spelbrink jt., 2001). Sarnaselt TFAM valguga mängib Twinkle olulist rolli mtDNA säilitamises ja mtDNA koopiaarvu regulatsioonis, sest Twinkle valgu RNAi (ingl *RNA interference*) vahendatud sünteesi pärssimine põhjustab olulist mtDNA vähenemist ehk depletsiooni (Tyynismaa jt., 2004). Koos POLG ja mtSSB valkudega moodustab Twinkle mitokondrite minimaalse replikatsiooniaparaadi ehk replisoomi, mis on tõestatud Korhonen jt (2004) poolt *in vitro*. Twinkle on tugevalt seotud mitokondri sisemembraaniga, kus arvatavasti moodustab omalaadse replikatsiooni platvormi (Gerhold jt., 2015; Rajala jt., 2014).

1.2. Genoomi epigeneetiline regulatsioon

1.2.1. Rakutuuma epigenoom

Hulkkrakse organismi rakud on geneetiliselt ühesugused – iga tuumaga rakk sisaldab sama kromosoomide komplekti. Sellegipoolest erinevused geneetilise materjali avaldumises loovad rikka mitmekesisuse erinevalt diferentseerunud rakutüüpide näol, kus esineb suur varieeruvus nii ülesehituses kui ka funktsioonis. Lihtsustatult öeldes toimub geneetilise materjali (sh mittekodeeriva RNA) avaldumise regulatsioon kahel tasandil – geneetiliste ja epigeneetiliste mehhanismide kaudu. Esimese puhul mängib pearolli DNA ise, st geeniekspressiooni regulatsioon toimub vastavalt DNA nukleotiidses järjestuses kodeeritud juhiste. Teise puhul

mängib DNA järjestus teisest rolli, kuna see jääb muutumata ning regulatsioon toimub vastusena sise- ja välisignaalidele n-ö DNA molekuli „välispinna“ kovalentse modifitseerimise kaudu (Jones ja Takai, 2001). Viimane on diferentsiaalse geeniekspressiooni põhiline regulatsioonimehhanism. Aastal 2005 ilmunud Fraga jt suuremahulises töös ilmnes, et nDNA epigeneetilised modifikatsioonid on üheks põhjuseks, miks monosügootsed kaksikud, kellel on sama genotüüp, ei ole fenotüübi poolest identsed, sealjuures epigeneetiline erinevus kasvas vanusega (Fraga jt., 2005). Kõige enam on uuritud kahte epigeneetilist mehhanismi – DNA metülatsiooni ja histoonide posttranslatsioonilisi modifikatsioone (fosforüleerimine, atsetüleerimine, metüleerimine, ubikvitinüleerimine, sumoüleerimine) (Jaenich ja Bird, 2003). Siiski, rakutuuma epigenoomi kujundamise võimalusi on tunduvat enam, nagu näiteks DNA hüdroksümetüleerimine ja ATP-sõltuv kromatiini remodelleerimine (Kietzmann jt., 2017; Handy jt., 2011), samuti mittekodeeriva RNA (ingl *non-coding RNA*) vahendatud mehhanismid, kus kõige enam on uuritud lühikesi (~22 bp) miRNA molekule (ingl *microRNA*), mida seostatakse transkriptsioonijärgsel tasandil toimuva järjestus-spetsiifilise geeniekspressiooni inhibeerimisega, ning pikki (üle 200 bp) mittekodeerivaid RNA molekule (ingl *long non-coding RNA*, lncRNA), mis on asendamatud X-kromosoomi inaktivatsioonis ja soospetsiifilises geenivermimises (*imprinting*) (Morris ja Mattick, 2014). Epigeneetilised muutused ja sellest tulenev fenotüüp võivad säilida mitme mitootilise rakujagunemise vältel ning kanduda järgnevatele põlvkondadele meiootilise jagunemise järel, seega sellel on teatud potentsiaal pärandumiseks (Klosin jt., 2017).

DNA metülatsioon on replikatsioonijärgne metüülrühma lisamine tsütosiini lämmastikaluse 5-positioonis oleva süsiniku juurde (5-metüültsütosiin, 5mC) ning imetajate nDNA puhul esineb enamasti CpG kontekstis (tsütosiin, millele järgneb fosfodiestersidemega ühendatud guaniin) üle terve genoomi (Feng jt., 2010). Umbes 70–80% inimese DNA CpG saitidest on metüleeritud (Kim, 2005). Erandiks on CpG saared (ingl *CpG islands*) – lühikesed CpG dinukleotiidide klastrid, mis sageli jäävad promootorite piirkonda (Jaenisch ja Bird, 2003). DNA metüleerimine on eelkõige seotud geeniekspressiooni pärssimisega, mis on oluline potentsiaalselt kahjulike transponeeruvate elementide vaigistamises ja seeläbi genoomi terviklikkuse säilitamises, samuti embrüogeneesis, rakkude diferentseerumises ja transkriptsioonilise „taustmüra“ vähendamises (Jaenisch ja Bird, 2003). X-kromosoomi inaktivatsioon ja soospetsiifiline geenivermimine on samuti reguleeritud DNA metülatsiooni kaudu (Suetake jt., 2004; Jones ja Takai, 2001). Metülatsioon mõjutab DNA kättesaadavust transkriptsiooni masinavärgile ja teistele DNA metabolismis osalevatele valkudele. Lisatud

metüülrühmad moodustavad füüsilise barjääri, mis takistab DNA-valk interaktsioonide teket. Sõltuvalt sellest, kas metüleerimise alla langeb positiivne või negatiivne regulatoorne element, geeniekspressioon kas vastavalt aktiveeritakse või surutakse maha (Jones ja Takai, 2001). Transkriptsiooni pärssimisele aitavad kaasa metüleeritud CpG siduvad valgud (ingl *methyl-CpG binding protein*; MeCP), mis värbavad kromatiini konformatsiooni muutvaid valke, nagu näiteks histoonide deatsetülaase, inhibeerides nõnda metüleeritud geenide avaldumist (Ng jt., 1999).

Organismi teatud arenguetappidel toimub ulatuslik epigeneetiline reprogrammeerimine. Imetajate sugurakkude eellasrakkude (ingl *primordial germ cells*) küpsemise käigus demetüleeritakse nende genoom eesmärgiga kustutada vanemaspetsiifiline imprinting. Teine demetülatsiooni laine toimub pärast munaraku viljastamist (v.a imprintitud geenides), millega taastatakse rakkude pluripotentsus. Pärast sugurakkude diferentseerumist ning embrüo implantatsiooni emaka limaskestale algab aktiivne remetülatsioon, millega taastatakse soospetsiifiline monoalleelne geeniekspressiooni muster (Jirtle ja Skinner, 2007; Mayer jt., 2000).

Jackson-Grusby jt (2001) näitasid hiire embrüonaalsete tüvirakkude (ingl *embryonic stem cells*; ESC) ja fibroblastide peal, et DNA hüpometülatsioon häirib normaalset geeniekspressiooni mustrit, pärsib rakkude proliferatsiooni ning käivitab p53-vahendatud apoptoosi. Vaatamata sellele taluvad diferentseerumata ESC-d ja kasvajakud hüpometülatsiooni üsnagi hästi ning tänaseks on tehtud kindlaks, et nDNA 5mC taseme langus on tihedalt seotud pahaloomuliste kasvujate tekkega (Ehrlich, 2009). Muutused metülatsiooni tasemes võivad põhjustada tuumori supressorgeenide inaktivatsiooni ning aktiveerida onkogeene, soodustades sellega kasvaja teket (Gal-Yam jt., 2008).

Kuni hiljutise ajani arvati, et 5mC on ainuke stabiilne epigeneetiline modifikatsioon imetajate genoomis. Siiski selgus, et 5mC on vaid üks epigeneetilise regulatsioonisüsteemi komponentidest. Antud nimekiri täienes DNA demetüleerimise käigus moodustuvate 5mC oksüdatsiooni vaheproduktidega, nimelt 5-hüdroksümetüültsütosiini (5hmC), 5-formüültsütosiini (5fC) ja 5-karboksümetüültsütosiini (5caC) modifikatsioonidega (Ito jt., 2011). Kui kahe viimase modifikatsiooni roll genoomi metabolismis pole veel teada, siis 5hmC kohta on ilmunud hulgaliselt töid, mis tõestavad 5hmC olulisust organismi arengu ja diferentseerumise regulatsioonis (Dawlaty jt., 2014; Dawlaty jt., 2013). Kriaucionis ja Heintz (2009) kirjeldasid 5hmC esinemist Purkinje ja granulaarrakkude nDNA-s, kus selle osakaal moodustas vastavalt 0,6% ja 0,2% kõikidest nukleotiididest. Stroud jt (2011), kes seadsid

eesmärgiks kaardistada 5hmC modifikatsioone embrüonaalse tüviraku genoomis, kasutades selleks immunopretsipitatsiooni meetodit kombinatsioonis massiivse paralleelse sekveneerimisega (ingl *massively parallel sequencing*), leidsid, et 5hmC esines rohkelt *enhancer* ja geeni keha (ingl *gene body*) piirkonnas, samuti valk-DNA (nt transkriptsioonifaktorite Oct4 ja Nanog) interaktsiooni saitides. Antud tulemuste baasil järeldati, et 5hmC võib käsitleda täisväärtusliku epigeneetilise signaalina (Stroud jt., 2011).

1.2.2. DNA metülatsiooniga seotud mehhanismid rakutuumas

Tuumas viivad DNA metüleerimist läbi selleks spetsialiseerunud ensüümide perekond, DNA metüültransferaasid (DNMT). Eristatakse kolme DNMT isovormi: DNMT1, -3A ja -3B. DNMT1 on nn proliferueeruvate rakkude isovorm, mis tunneb ära hemimetüleeritud DNA järjestust ning vastutab metülatsioonimustri säilitamise eest nii replikatsiooni- kui ka reparatsioonijärgselt (Klose ja Bird, 2006). DNMT3A ja DNMT3B modifitseerivad nii hemimetüleeritud kui ka modifitseerimata DNA-d ning viivad läbi DNA *de novo* metüleerimist (Okano jt., 1999), tagades geneetilise materjali avaldumise plastilisust. Lisaks on leitud, et DNMT3A ja -3B metüleerivad ka neid tsütosiine, millele ei järgne guaniin – nn mitte-CpG saidid (ingl *non-CpG sites*) (Jang jt., 2017). DNMT-d kasutavad metüülrühma doonorina kofaktorit S-adenosüülmetioniini (SAM) (Kim, 2005). DNMT3L on oluline kofaktor, mis reguleerib DNMT3A ensümaatilist aktiivsust (Suetake jt., 2004). Lisaks sellele esineb rakkudes DNMT2 isovorm, mille aktiivsus on eelkõige seotud RNA, täpsemalt tRNA molekulide töötusega (Schaefer and Lyko, 2010). Siiski, kombineerides HPLC ja TLC kromatograafilisi meetodeid Hermann jt (2003) demonstreerisid, et ka DNMT2 näitab DNA metüültransferaasist aktiivsust, kuigi võrreldes teiste DNMT isovormidega on see oluliselt tagasihoidlikum ning DNA järjestuse spetsiifiline, mis annab alust arvata, et DNMT2 võib täita spetsiifilist ülesannet rakutuumas.

Kahekümne esimese sajandi esimese dekaadi lõpus ilmusid esimesed kirjeldavad andmed 2-oksoglutarat (2OG) - ja Fe(II)-sõltuva ensüümi *ten-eleven translocation 1* (TET1) kohta, mis viib läbi aktiivset DNA demetülatsiooni, oksüdeerides 5mC 5hmC-ks (Tahiliani jt., 2009) ning konverteerides 5hmC edasi 5fC ja 5caC-ks (Ito jt., 2011). DNA demetülatsioonitsükli viimase sammu, s.o 5caC eemaldamise kohta on pakutud erinevaid võimalusi: (1) passiivne 5caC eemaldamine replikatsiooni käigus; (2) karboksüülrühma eemaldamine 5caC nukleotiidilt tümiin-DNA glükosülaasi ja BER reparatsioonimehhanismi osalusel (Kohli ja

Zhang, 2013; He jt., 2011); (3) otsene 5caC dekarboksüleerimine (Schiesser jt., 2012). Viimasega taastatakse geneetilise materjali aktiivsus. Eristatakse kolme TET valgu varianti: TET1, -2 ja -3. Dawlaty jt (2013) uurimuses selgus, et üksiku TET1 või TET2 geeni suhtes defitsiitsete hiirte ECS genoomis esines 40–60% 5hmC hulga langus, TET1/2-kaksikmutantsete hiirte puhul esines täielik 5hmC depletsioon. Tulemustest järeldati, et TET1 ja TET2 on põhilised TET perekonna ensüümid, mis osalevad 5hmC modifikatsioonide tekkes ja säilitamises EC rakkudes. Aasta hiljem demonstreeriti, et Tet1/2/3-defitsiitsete hiirte ECS Sgenoomis toimus 5hmC kontsentratsiooni drastiline vähenemine, mis häiris ECS diferentseerumist endo- ja mesodermaalseteks rakkudeks (Dawlaty jt., 2014). DNA demetüleerimise häired põhjustavad üle genoomset 5mC kontsentratsiooni tõusu (sh promootorite piirkonnas), mille represseeriv toime transkriptsioonile takistab teatud arenguetapil kriitiliselt oluliste geenide avaldumist, põhjustades organismi arenguhäireid ja loote eluvõimelisuse langust (Dawlaty jt., 2013). Vaatamata sellele, ei ole TET valgud ainukesed DNA metülatsioonimustri kustutajad. Mõned aastad tagasi näidati, et DNMT3A ja DNMT3B-l on 5hmC dehüdrosümetülaasi aktiivsus (Chen jt., 2012).

1.2.3. Keskkonna roll DNA metülatsioonis

Epigeneetilisi mehhanisme võib käsitleda omalaadse „lülitina“, mille abil kontrollitakse, et geneetiline materjal avalduks õigel ajal ja õiges kohas vastusena eksogeensetele signaalidele. Muutused metülatsioonimustris võivad häirida korrektset geeniekspressiooni programmi ning põhjustada patoloogiate teket. Viimaste aastakümnete jooksul on ilmunud hulgaliselt töid, kus on uuritud keskkonna mõju organismile molekulaarsel tasandil. Islandis läbiviidud pikaajalise uurimuse tulemused näitasid, et DNA epigenoom võib elu jooksul muutuda (Bjornsson jt., 2008). Tänapäevaks on tehtud kindlaks, et inimese elustiili valikud kujundavad geeniekspressiooni. Saksamaal Zeilinger jt (2013) läbiviidud uuringus võrreldi suitsetajate ja mittedsuitsetajate vereproovide nDNA metülatsiooni mustrit. Selgus, et 187 CpG saidi metüleerimises esines statistiliselt oluline erinevus. Antud muutused esinesid geenides, mis olid seotud muuhulgas organismi arengu, immuunvastuse ja vereloomega, samuti kardiovaskulaar- ja reproduktiivsüsteemi funktsiooniga ning kasvaja tekkega (Zeilinger jt., 2013). Sarnaseid tulemusi on kirjeldatud ka Breitling jt (2011) töös, kus lisaks üldisele metülatsioonimustri muutumisele leiti, et suitsetajatel esines statistiliselt oluline verehüübimise regulatsioonis osaleva F2RL3 (*coagulation factor II receptor-like 3*) geeni hüpometülatsioon. Oma „jälje“ DNA epigenoomile jätavad ka muud käitumuslikud

riskifaktorid, nagu näiteks füüsiline aktiivsus ja söömisharjumused (Fraga jt., 2005), lisaks sellele erinevad saasteained ja UV-kiirgus, temperatuur, oksüdatiivne stress ja vanus (Byun ja Baccarelli, 2014). Rönn jt (2013) võrdlesid 23 terve mehe rasvarakkude DNA metüloomi enne ja pärast pooleaastast trenni tegemist. Leiti, et muutustest olid haaratud 7663 geeni, sh 18 ülekaalulisusega seotud ja 21 tüüp 2 diabeediga seotud geeni. Üldiselt oli muutunud 1/3 metülatiooni muutustest haaratud geenide ekspressiooni tase (Rönn jt., 2013).

1.2.4. Mitokondriaalne epigeneetika

Epigeneetiliste mehhanismide paikapidavust on seni õnnestunud tõestada eelkõige tuuma genoomi kontekstis. Vaatamata sellele, et mitokondriaalne epigeneetika tõusis tähelepanu objektiks suhteliselt hiljuti, võib olemasolevate andmete põhjal järeldada, et nii mitokondri talitus kui ka mtDNA metabolism alluvad samuti epigeneetiliste mehhanismide regulatsioonile (Castegna jt., 2015).

Viimaste aastate jooksul on ilmunud andmed regulaatorsete RNA molekulide esinemise kohta mitokondrites. Lung jt (2006) koostasid hiire maksa- ja neerurakkudest eraldatud mitokondriaalsete transkriptide põhjal cDNA raamatukogu ning leidsid kuus potentsiaalset mtDNA-kodeeritud ncRNA transkripti, neist neli olid komplementaarsed mitokondriaalse D-lingu eri piirkondadega ja kaks vastasid NADH dehüdrogenaasi IV ja VI subühiku geeni järjestustele *antisense* orientatsioonis. Siiski, enamus tuvastatud ncRNA molekulidest olid kodeeritud tuuma genoomis ja seega (välistades võimalikke artefakte) olid suure tõenäosusega imporditud mitokondritesse (Lung jt., 2006). Wang jt (2015) demonstreerisid samuti mitme miRNA (miRNA-124a, -107 ja -23A) kui ka miRNA protsessimises osalevate valkude Dicer ja Argonaute lokaliseerimise rotu hipokampuse mitokondrites. Uurimistöö käigus leiti, et ajutraumast tingitud närvikoe kahjustused põhjustasid miRNA vähenemist mitokondriaalses fraktsioonis, viidates sellega mitokondrite osalusele miRNA ekspressiooni regulatsioonis vastusena ajukahjustustele (Wang jt., 2015). Arvatakse, et erinevate ncRNA-de osalus nii mitokondri metabolismis kui ka mitokondrite vahendatud raku ainevahetuslikes protsessides võib olla dünaamiline ja rakutüübi-spetsiifiline ning varieeruda vastavalt raku metaboolsetele vajadustele või erinevate patofüsioloogiliste seisundite korral (Sripada jt., 2012). Vaatamata sellele vajab antud teema edasist uurimist, et selgitada ncRNA funktsionaalset tähtsust mitokondriaalses metabolismis.

Mitokondriaalses genoomis on 435 CpG saiti ning 4747 tsütosiini, mis ei esine CpG kontekstis (Maekawa jt., 2004). Võrreldes tuuma genoomiga on antud näitajad oluliselt tagasihoidlikumad (Byun ja Baccarelli, 2014). MtDNA ei sisalda nDNA mõistes reeglipäraseid CpG saari, üksikud CpG saidid on jaotunud ühtlaselt üle kogu genoomi (Bianchessi jt., 2016; Byun ja Baccarelli, 2014). Võttes arvesse mtDNA spetsiifikat kujunes välja arvamus, et suure tõenäosusega 5mC modifikatsioonidel puudub regulatoorne tähtsus mitokondriaalsele genoomile (Byun ja Baccarelli, 2014). Siiski, selline arusaam osutus ekslikuks ning tänaseks on tehtud kindlaks, et mtDNA on metüleeritud, kuid milline on selle roll ja tähtsus mtDNA „elus“, on seni veel selgitamisel (Castegna jt., 2015).

Viimase aastakümne jooksul on kogutud kinnitavaid andmeid 5hmC esinemise kohta mitokondriaalses genoomis. Metülatsiooni uurimise „kuldstandardiks“ peetav DNA bisulfit-konversiooni meetod ei võimalda eristada 5mC ja 5hmC modifikatsioone, mistõttu Shock jt (2011) ning Bellizi jt (2013) kasutasid selleks modifikatsiooni-spetsiifilist immunopreetsipitatsiooni meetodit ning leidsid, et 5hmC võib olla seotud mitokondriaalse replikatsiooni ja geeniekspressiooni moduleerimisega. Sarnaseid tulemusi on saanud Sun jt (2013) uurimuses, kus uuriti 5hmC esinemist hiire E14 embrüonaalsete rakkude tuuma ja mitokondri genoomis. Selgus, et mtDNA sisaldab rohkelt 5hmC modifikatsioone. Dzitoyeva jt (2012) uurisid hiire eesmise ajukoore ja väikeaju rakkude mtDNA epigeneetiliste modifikatsioonide suhtes, nimelt 5mC ja 5hmC võimalike muutuste seost vanusega. ELISA (ingl *enzyme-linked immunosorbent assay*) meetodi abil näidati, et eesmise ajukoore rakkude mtDNA 5hmC, kuid mitte 5mC, ja vanuse vahel esines negatiivne korrelatsioon, s.t organismi vananemine põhjustas 5hmC kontsentratsiooni vähenemist. Järjestuse-spetsiifiline mtDNA 5hmC analüüs, mis põhines mtDNA glükosüleerimisel ja sellele järgneval ensümaatilise restriksiooni ja qPCR kombinatsioonil, näitas analoogset dünaamikat. Seevastu väikeaju Purkinje rakkude mtDNA puhul esines vastupidine seos, s.t vanuse kasvades kasvas ka 5hmC hulk mtDNA koosseisus. Täiendavaks leiuks oli mitme mtDNA geeni transkriptsioonilise aktiivsuse muutumine vanemate hiirte seas.

Enamus olemasolevatest andmetest mtDNA metülatsiooni kohta kajastavad 5mC esinemist CpG kontekstis. Näiteks, ühes varasemas uurimistöös, kus hiire mtDNA metülatsiooni hindamiseks kasutati metülatsiooni suhtes tundlikke endonukleaase ja mtDNA hübriidsatsiooni radioaktiivsete proovidega, leiti, et 3–5% mtDNA tsütosiini nukleotiididest olid metüleeritud, kusjuures modifikatsioonidest olid haaratud ainult CpG saidid (Pollak jt., 1984). Teine sarnane töö näitas, et ~2–5% mtDNA molekulide CCGG saitidest olid

metüleeritud (Shmookler Reis ja Goldstein, 1983), mis oli identne Maekawa jt (2004) avaldatud tulemustega. Siiski hiljuti Bellizi jt (2013) läbiviidud uurimus, milles keskenduti mtDNA D-lingu metülatsioonimustri uurimisele, näitas hoopis, et domineeriv osa 5mC esines mitte-CpG saitides. Sarnased tulemused saadi ka Bianchessi jt (2016) uuringus, kus mtDNA silmapaistvaks erisuseks oli 5mC esinemine mitte CpG saarte kontekstis, sarnaselt tuuma genomile, vaid eelistatavalt CH dinukleotiidide (kus H=T, C või A) kohal. Lisaks sellele leiti, et kuigi mtDNA kahe ahela metülatsioonis esines asümmeetriat, joonistus välja ka teatud seaduspära – 5mC klasterdumine (Bianchessi jt., 2016).

Vaatamata eespool kirjeldatud tulemustele, on hiljuti avaldatud ka täiesti vastupidiseid tulemusi. Hong jt (2013) uurisid inimese HEK293 ja HTC116 rakuliinist ning vererakkudest ekstraheeritud mtDNA-d 5mC ja 5hmC modifikatsioonide suhtes. Eesmärgi saavutamiseks rakendati mtDNA bisulfit-konversiooni ja teise põlvkonna sekveneerimise meetodit (ingl *next-generation sequencing*). Uuriti nelja spetsiifilist mtDNA piirkonda (12S ja 16S rRNA, COXII ja ATP6), lisaks sellele teostati ülegenoomne mtDNA analüüs. Töö käigus ei tuvastatud ei 5mC ega 5hmC esinemist mtDNA-s, mille alusel järeldati, et CpG metüleerimisel pole mingit funktsiooni mtDNA metabolismis (Hong jt., 2013). Hiljuti publitseeritud Liu jt (2016) teadustöös võrreldi tsirkulaarse ja BamHI restriктаasiga lineariseeritud mtDNA bisulfit-konversiooni efektiivsust ja seeläbi ka pürosekveneerimise tulemusi. Bisulfit-konversiooni käigus muutub metüülrühmaga mittekaitstud tsütosiini nukleotiid uratsiiliks. Need tsütosiinid, mis bisulfitiga töötlemisel ei muutu uratsiiliks, interpreteeritakse kui metüleeritud. Töö tulemustest ilmnes, et vererakkude, kuid mitte süljeproovi, mtDNA rõngjas struktuur avaldab negatiivset toimet konversioonile, mis omakorda põhjustab mtDNA metülatsiooni taseme ülehindamist. Antud töös hinnati mtDNA keskmiseks metülatsiooni tasemeks alla 2%, millest järeldati, et metülatsioonil puudub funktsionaalne tähtsus mitokondriaalse geeniekspressiooni regulatsioonis (Liu jt., 2016).

1.2.5. Mitokonder kui DNA metüültransferaaside sihtpunkt

Intensiivne uurimistöö mitokondriaalse epigeneetika vallas pole siiani andnud selgepiirilist vastust mtDNA metülatsioonimehhanismide kohta, nimelt, kas ja milline kolmest võimalikust DNMT isovormist vastutab mtDNA epigeneetilise modifitseerimise eest. Shock jt (2011) demonstreerisid mitokondriaalse DNMT1 (mtDNMT1) isovormi esinemist hiire embrüonaalsetes fibroblastides ja inimese HCT116 rakuliinis ning selle liikumist

mitokondritesse. Lisaks sellele selgus, et mtDNMT1 seondub mtDNA D-lingu, rRNA ja valku kodeerivate geenide piirkonda (Shock jt., 2011). Dzitoyeva jt (2012) demonstreerisid samuti mtDNMT1 transkriptide esinemist närvikoe rakkudes, kuigi selle kontsentratsioon vähenes vanusega. Antud töös ei detekteeritud DNMT3A signaali mitokondrites ning seda kasutati hoopis mitokondriaalse fraktsiooni puhtuse kvaliteedikontrolli markerina. Wong jt (2013) uurimuses näidati immunoblottimise meetodi abil DNMT3A esinemist hiire närvikoe, skeletilihaste ja testiste rakkude ning inimese ajukoore mitokondrites. DNMT1 signaali ei tuvastatud, kuid arvati, et DNMT1 võib olla seotud mitokondri välismembraaniga (Wong jt., 2013). Bellizi jt (2013) kasutasid samuti immunoblottimise meetodit uurimaks DNMT ja TET valkude lokaliseerimist inimese HeLa rakkude ja hiire 3T3-L1 rakukultuuri mitokondriaalsete valkude fraktsioonides. Töö autorid detekteerisid DNMT1 ja DNMT3B signaali nii inimese kui ka hiire rakkude mitokondrites. Lisaks sellele leiti, et inimese mitokondrid sisaldasid TET1 ja TET2 isovormi, hiire rakkudes detekteeriti ainult TET1 signaali. DNMT3A ja TET3 valkude signaale ei tuvastatud uuritud proovimaterjalides. Vaatamata erinevate DNMT isovormide esinemisele mitokondriaalses fraktsioonis, jäi siiski arusaamatuks nende roll mtDNA epigeneetilises modifitseerimises, kuna DNMT1, -3A ja -3B-defitsiitsetes rakkudes mtDNA metülatsioon ei kadunud ära (Bellizi jt., 2013). Samas Shock jt (2011) näitasid, et mtDNMT1 üleekspresseerimine mõjutab mtDNA transkriptsioonilist aktiivsust geeni-spetsiifilisel viisil.

1.3. Mitokondriaalsed haigused

Mitokondriaalse võrgustiku „mõjuala“ on tunduvalt suurem kui ühe raku mõõtmed. Rakkudevahelise kommunikatsiooni reguleerijatena mõjutavad nad terve organismi füsioloogiat, mistõttu mitokondrite funktsioonihäiretega on seotud suur hulk patoloogiaid, sh neurodegeneratiivsed ja metaboolsed haigused. Hinnanguliselt kannatab mutantse mtDNA etioloogiaga haigusseisundite all ~0,01–0,02% populatsioonist (Elliott jt., 2008; Schaefer jt., 2008), samal ajal kui patogeensete mutatsioonide esinemissagedus mtDNA-s on tunduvalt suurem ning küündib 0,5%-ni (Chinnery jt., 2012). Lahknevus genotüübi ja fenotüübi vahel on tingitud mitokondriaalsest heteroplasmias – nähtusest, mil ühes rakus esineb metsiktüüpi mtDNA kõrval ka mutantseid variante (Li jt., 2012). Iga rakk sisaldab tuhandeid mtDNA koopiaid, mis tähendab, et iga mtDNA variandi osakaal rakus võib varieeruda vahemikus 0,1–99,9%. Mutatsiooni fenotüübiline avaldumine, s.t haiguse sümptomite teke ja nende raskusaste, on määratud metsiktüüpi ja mutantse mtDNA suhte poolt, seetõttu

mitokondriaalseid haigusi iseloomustab varieeruv penetrantsus ja kliiniline pilt, kus oma osa mängivad mtDNA iseloomustav „pudelikaela efekt“, s.o iga laps saab emalt vaid juhusliku alamhulga mitokondritest, ning keskkonnafaktorid (Chinnery jt., 2012). Rakk tolereerib üsna kõrget mutantse mtDNA osakaalu (~60–90%) ning sümptomite tekleks on vajalik, et mutantse mtDNA hulk ületaks teatud piirmäära (Chan, 2006).

Mitokondriaalsed haigused on geneetilist päritolu ning võivad olla põhjustatud mutatsioonidest nii tuumas kodeeritud mitokondriaalsetes geenides kui ka mtDNA sees (Chan, 2006). Elu jooksul akumulereerub mtDNA-sse üha rohkem mutatsioone, vananedes võib jälgida kuni viiekordset punktmutatsioonide (ingl *single nucleotide polymorphism*, SNP) sageduse tõusu (Kennedy jt., 2013). Sarnane tendents leiab aset ka mitokondriaalse heteroplasmia korral, mis 70 aasta pikkuse eluperioodi jooksul suureneb 1,7 korda (Sondheimer jt., 2011). Mitokondriaalsete haiguste alla koondatakse kõik patoloogilised seisundid, mis on tingitud mitokondri funktsioonihäiretest, eelkõige hingamisahela defektidest. Kõige enam on ohustatud kõrge energiavajadusega koed ja organid, mistõttu domineeriv osa mitokondriaalsetest haigustest on seotud lihas- ja närvikoe kahjustustega. Siia kuuluvad näiteks Leber'i pärilik optiline neuropaatia ja dominantne optiline atroofia (Carelli jt., 2004), samuti progresseeruv väline oftalmopleegia (Goffart jt., 2009) ja müoklooniline epilepsia koos punaste narmendavate lihaskiududega (MERFF) (Chan, 2006). Ka Alzheimeri ja Parkinsoni tõbi on tihedalt seotud mitokondrite alatalitlusega (Coskun jt., 2012). Tänapäevaks on avaldatud mitmeid põhjalikke ülevaateid mtDNA depletsioonide ja mutatsioonide rollist kasvajaliste protsesside tekkes ja progressioonis (Ferreira jt., 2015; Ehrlich, 2009). Mutatsioonid ja/või metülatsioonimustri muutused mtDNA geenides võivad häirida nende transkriptsiooni ning muuta seeläbi mitokondrite metabolismi. Mitokondrites toimub mitme tuuma epigeneetilise regulatsioonimehhanismi seisukohalt olulise metaboliidi, nagu SAM ja atsetüül-CoA, süntees, seega mitokondri alatalitluse puhul võib häiruda normaalne nDNA epigeneetiline muster, põhjustades sellega pahaloomuliste kasvajate teket (Ferreira jt., 2015).

Viimastel aastatel on üha rohkem hakatud rääkima mitokondri olulisusest südame-veresoonkonna haiguste tekkes. Oksüdatiivne stress võib põhjustada pöördumatuid müokardi kahjustusi (südamelihase kontraktiilsuse vähenemine, apoptoosi käivitamine, südamefibroblastide proliferatsiooni stimuleerimine ja maatriksi-metalloproteasid (MMP) aktiveerimine) ning viia südamepuudulikkuse tekkeni (Tsutsui jt., 2011). Ide jt (2001) demonstreerisid müokardi infarkti (MI) hiire mudeli peal, et MI hiirte mitokondrites vähenes TFAM valgu ja mtDNA hulk vastavalt 35% ja 44% võrra, samal ajal kui ROS

konsentratsioon oli neli korda suurem võrreldes kontrollidega (*sham* hiired). Lisaks sellele leiti, et mtDNA geenide transkriptide, kuid mitte tuumas kodeeritud südame α -aktiini ja müosiini raske ahela mRNA hulk oli langenud 30–50% võrra. Sarnast pilti nähti ka mitokondriaalse hingamisahela ensümaatilise aktiivsuse hindamisel, kus komplekside I, II ja IV funktsioonid olid märkimisväärselt langenud, seevastu kompleks II ja tsitraadi süntaasi aktiivsustes sellist muutust ei täheldatud. Valgusmikroskoopia abil leiti, et kuigi MI hiirte müotsüütide morfoloogia ja ultrastruktuur olid normaalsed, mitokondrite suurus ja arv olid suurenenud. Toetudes saadud tulemustele töö autorid järeldasid, et ROS, mtDNA kahjustuste (sh mtDNA koopiaarvu vähenemise) ja mitokondriaalse hingamisahela funktsioonihäire vahel esineb seos (mis võib omakorda põhjustada täiendava ROS tootmise), mis võib mängida olulist rolli südamehäirete tekkes ja progressioonis (Ide jt., 2001).

Mitokondriaalsete haiguste sagedaseks leiuks on mtDNA depletsioon (Coskun jt., 2012; Li jt., 2012; Goffart jt., 2009). MtDNA koopiaarvu regulatsioonis mängivad pearolli TFAM (Kang jt., 2007) ja helikaas Twinkle (Tyynismaa jt., 2004), sest mõlema valgu RNAi vahendatud sünteesi mahasurumine põhjustab olulist mtDNA vähenemist. Ikeda jt (2015) näitasid transgeense hiire mudeli peal, et TFAM ja Twinkle üleekspressioonist tingitud mtDNA koopiaarvu suurenemine üle metsiktüüpi hiirtes mõõdetud väärtuste avaldas kardioprotektiivset toimet. Nimelt, kõrge mtDNA kontsentratsiooniga hiirtes täheldati vähenenud müokardi hüpertroofiat, sh müotsüütide morfoloogilisi muutusi, ning leebemaid südame funktsioonihäireid, samuti vähenes metalloproteaaaside MMP-2 ja MMP-9 aktiivsus. Lisaks sellele leiti, et TFAM ja Twinkle üleekspressioon limiteeris vabade radikaalide hulka nii transgeensete hiirte kui ka H9c2 roti kardiomyoblastide mitokondrites (Ikeda jt., 2015).

Tänapäeval keskendutakse mtDNA metülatsiooni uurimisele, selgitamaks, kas sellel on mingit füsioloogilist tähtsust ning kas mtDNA epigeneetilised modifikatsioonid võiksid olla seotud patofüsioloogiliste mehhanismidega. Chesnut jt (2011) näitasid NSC34 katsemudeli peal immuunohistokeemilise analüüsi abil, et motoneuroneid haarava ALS (amüotroofne lateraalsklerooos) diagnoosiga patsientide motoorse ajukoore rakkude eri kompartmentides, sh mitokondriaalses fraktsioonis, esineb statistiliselt oluline DNMT1, DNMT3A ning 5mC immuunoreaktiivsuse tõus. Lisaks sellele leiti, et osa mitokondrite DNA-st oli metüleeritud. Töö autorid järeldasid, et epigeneetilised mehhanismid võivad mängida määravat rolli ALS patogeneesis, vahendades neuronite apoptoosi (Chesnut jt., 2011), kus nagu varasemalt oli juba mainitud mängivad suurt rolli mitokondrid (Giorgio jt., 2005).

Hiljuti avaldatud Kietzmann jt (2017) ülevaateartiklisse on kogutud kaasaja teadmised epigeneetiliste mehhanismide kohta, ROS otsese ja/või kaudse toime kohta DNA (de)metülatsioonile, histoonide modifikatsioonile, samuti südame funktsioonile. Töö autorid põhjendavad, miks ja kuidas mitokondriaalne epigeneetika võib mõjutada mtDNA koopiaarvu ning panustada oksüdatiivse stressi tekkesse, soodustades seeläbi südamehaiguste teket. Shock jt (2011) näitasid, et oksüdatiivse stressi transkriptsioonifaktori NRF1 ja selle kofaktori PGC1 α transfektsioon rakkudes põhjustas ~5-kordset DNMT1 kontsentratsiooni tõusu mitokondrites, mis omakorda mõjutas mtDNA transkriptsioonilist aktiivsust. Antud tulemused näitavad, et mtDNA ekspressiooni tase ja seega ka mitokondri talitus on tundlikud oksüdatiivse stressi suhtes.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Selgitamaks epigeneetiliste mehhanismide potentsiaalsed rollid mtDNA metabolismis püstitati järgmised ülesanded:

- 1) selgitada DNMT1 lokaliseerimise mitokondriaalses fraktsioonis
- 2) selgitada DNMT3A lokaliseerimise mitokondriaalses fraktsioonis
- 3) selgitada HEK293e rakkude mtDNA CpG metüülatsiooni osakaalu, keskendudes mittekodeeriva ala (NCR) analüüsiks
- 4) uurida võimalikke muutusi DNMT1, DNMT3A ja mtDNA metüülatsiooni tasemes TFAM ja Twinkle *knock-down* tingimustel

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Rakuliin ja kasvutingimused

Töö eesmärkide saavutamiseks kasutati inimese embrüonaalsete neerurakkude HEK293e (ingl *human embryonic kidney cells*) rakuliini. HEK293 rakuliinid ekspresseerivad neuronitele iseloomulikke valke, nagu näiteks erinevaid neurofilamendi subühikuid ja α -interneksiini, meenutades nõnda neuraalseid rakuliine (Shaw jt., 2002). Rakke kasvatati antibiootikumivabas Na-püruvaadiga, aminohapetega ja vitamiinidega rikastatud kõrge glükoosisaldusega Dulbecco modifitseeritud Eagles meediumis (DMEM) (sisaldab L-glutamiini 4,5 g/L) (Lonza), millele oli lisatud veise looteserumi (ingl *fetal bovine serum*, FBS) lõppkontsentratsiooniga 10% (nn täissööde). Rakke inkubeeriti 5% CO₂ ja 37°C juures veeauruga küllastunud atmosfääris. Töös kasutati rakke passaažiga alla 20.

2.2.2. RNA interferents, rakkude transfektsioon siRNA-ga

Uurimaks mitokondriaalsete valkude, TFAM ja Twinkle, võimalikku rolli mtDNA metüleerimises ja selle säilitamises, kasutati RNAi-vahendatud (ingl *RNA interference*) spetsiifilist valgusünteesi inhibeerimist (*knock-down*). Transfektsioonile eelnevalt kasvatati HEK293e rakke seroloogilistel tassidel läbimõõduga 10 cm. Twinkle *knock-down*'i puhul oli rakkude tihedus transfektsiooni alustamise hetkeks 20–30%, TFAM *knock-down*'i puhul 40–50%. Rakkude transfektsiooniks kasutati DharmaFECT1 transfektsioonireagenti (GE

Healthcare Dharmacon Inc.). Transfektsiooni Twinkle ja TFAM siRNA-ga (GE Healthcare Dharmacon Inc.) teostati vastavalt tootja ettekirjutustele, kasutades 25 nM siRNA-d ühe tassi kohta. Enne katse alustamist kontrolliti transfektsioonireagenti tsütotoksilisuse suhtes, inkubeerides rakke protokoll järgi valmistatud reaktsioonisegus, millele oli lisatud vaid DharmaFECT1 reagent, kuid mitte siRNA, 96 h. Selle aja jooksul hinnati valgusmikroskoobiga rakkude elulisust ja morfoloogiat. Lühidalt kokkuvõttes: eraldi tuubides lahjendati siRNA (Tuub 1) ja DharmaFECT1 reagent (Tuub 2) seerumivabas DMEM söötmes (mõlema lõppruumala 1 ml) ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril (RT). Seejärel tõsteti Tuub 1 sisu Tuub 2 sisse, suspendeeriti ning inkubeeriti 20 min RT. Rakkude transfektsiooni reaktsioon viidi läbi lõppruumalas 10 ml. Enne siRNA segu lisamist asendati rakkude sööde ettevaatlikult 8 ml värske antibiootikumi-vaba DMEM täissöötmega. Rakke kultiveeriti 5% CO₂ ja 37°C tingimuste juures 24 h, seejärel transfektsioonimeedium eemaldati ning lisati 10 ml värsket täissöödet. Rakke analüüsiti 72 h (Twinkle) ja 96 h (TFAM) pärast transfektsiooni algust. Transfektsiooni kestus sõltus valgu hulgast rakus ja transfektsiooni mõjust mtDNA koopiaarvule. Kontrollidena kasutati HEK293e rakke, millele lisati transfektsioonisegu asemel 2 ml seerumivaba DMEM söödet, ülejäänud kasvutingimused olid samad. Igat katseskeemi korrati vähemalt kolm korda (bioloogilised replikaadid).

2.2.3. Mitokondrite isoleerimine, subfraksioneerimine digitoniiniga

Hindamaks transfektsiooni efektiivsust eraldati HEK293e rakkude mitokondrid vastavalt Rajala jt (2014) avaldatud artikli protokollile. Rakud koguti, sadestati 5 min 300x g 4°C juures, pesti külma 1xPBS lahusega, seejärel resuspendeeriti hüpotoonilises 0,1x homogeniseerimispuhvril (4mM Tris-HCl, pH 7,8; 2,5mM NaCl; 0,5mM MgCl₂), millele oli lisatud proteaasi inhibiitor PMSF (2,5 mM) (AppliChem-BioChemica) ning inkubeeriti 6 min. Paisunud rakud purustati mehaaniliselt klaasist Elvehjem homogenisaatori abil. Kohe pärast rakkude purustamist viidi homogenaadi keskkond isotooniliseks 10x homogeniseerimispuhvri ja 1,2 M sorbitoolilahuse lisamisega. Mitokondrite isoleerimiseks rakendati diferentsiaalset tsentrifuugimist: rakutuumade ja teiste rakujäänuste eemaldamiseks tsentrifuugiti homogeniseeritud rakususpensioon 5 min 1200x g 4°C juures, supernatant tõsteti uude tuubi ning korrati tsentrifuugimist samade parameetrite juures, supernatant tõsteti taas kord uude tuubi. Seejärel sadestati mitokondreid 10 min 14 000x g 4°C juures, supernatant eraldati, mitokondrite sade (edaspidi 'pellet') resuspendeeriti ettevaatlikult supernatandiga võrdses ruumalas külmas 1xPBS (0,137 M NaCl; 0,27 mM KCl; 0,81 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM

KH₂PO₄) lahuses. Totaalse mitokondriaalse valgu kontsentratsioon määrati Bradford'i meetodi abil (Thermo Scientific™ Coomassie (Bradford) Assay Kit).

Mitokondrite subraktsioneerimine digitoniiniga (µg valk : µg digitoniin) teostati eesmärgiga vabastada mitokondri eri kompartmentides olevad valgud, sh nukleoidid. Digitoniini madalaid kontsentratsioone kasutatakse mitokondrite välismembraani lõhkumiseks (mitoplastide saamiseks), kõrgete kontsentratsioonide juures permeabiliseerub ka sisemembraan, millega vabastatakse membraanseoselised ja maatriksivalgud (Gerhold jt., 2015; Rajala jt., 2014). Lüüsimiseks digitoniiniga võeti 100 µg mitokondriaalset valku, paralleelselt sellega võeti sama palju valku kontrolliks (nn pesu), millega hinnati mitokondrite isoleerimise kvaliteeti, s.o mitokondrite terviklikkust enne töötlemist digitoniiniga. Eelnevalt määrati sobiv valgu ja digitoniini suhe digitoniini titreerimisega. Mitokondreid lüüsi 10 min jääl, seejärel tsentrifugiti (Eppendorf 5430 R) 10 min 14 000x g 4°C juures. *Pellet* ja supernatant eraldati, mõlemale lisati SDS lõppkontsentratsiooniga 1% ning inkubeeriti 30 min RT, seejärel võeti igast proovist sobiva suurusega alikvoodid mtDNA analüüsimiseks Southern blot meetodiga ja valkude analüüsimiseks Western blot meetodi abil.

2.2.4. Western blot analüüs

Mitokondriaalsete valkude detekteerimiseks Western blot meetodil võeti 20 µg valku, lisati 5 µl 5x SDS laadimispuhvrit ja keedeti 5 min 95 °C juures. Valke lahutati SDS-PAGE (naatriumdodetsüülsulfaat-polüakrüülamiid geelelektroforees) meetodil 12% polüakrüülamiidgeelis (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell). DNMT1 ja DNMT3A detekteerimiseks võeti 60 µg valku, mida sadestati jääkülma atsetooniga (vt lisa 1) -20 °C juures vähemalt 30 min ning tsentrifugiti 20 min 14 000x g 4 °C juures. Mitokondriaalsete valkude *pellet* resuspendeeriti 1x SDS laadimispuhvrts, keedeti 5 min 95 °C juures ning lahutati SDS-PAGE meetodil 7,5% geelis. Suurusmarkerina kasutati PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Geelilt kanti valgud nitrotselluloosmembraanile (Amersham Hybond™-N⁺, GE Healthcare Life Sciences), kasutades Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell aparatuuri. Membraanid blokeeriti 1x TBST (0,15 M NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 0,1% Tween20) baasil valmistatud 5% rasvavaba piimalahusega 15–30 min ja loputati 1x TBST-ga, millele järgnes inkubatsioon primaarse antikeha lahusega [3% BSA 1x TBST-s (w/v)]. Tabelis 1 on esitatud töös kasutatud antikehad ja nende kirjeldus.

Tabel 1. Uurimistöös kasutatud antikehad ja nende kirjeldus.

Valk	Tüüp	Kirjeldus (peremeesloom, isotüüp)	Tootja, kataloogi nr	Lahjendus	Märkused
Twinkle	Primaarne	Hiir	PhD Anu Suomalainen- Wartiovaara	1:1000	Mitokondriaalne helikaas; mitokondriaalse nukleoidi marker
COXII	Primaarne	Küülik, polükloonaalne	Abcam® ab109739	1:5000	Tsütokroom c oksüdaasi II subühik; sisemembraani marker
TFAM	Primaarne	Küülik, polükloonaalne	Abcam® ab119684	1:10 000	Mitokondriaalne transkriptsiooni- faktor A; mtDNA marker
HSP60	Primaarne	Hiir, monokloonaalne	Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-376240	1:1000	Kuumašoki valk 60 kDa; mitokondriaalse maatriksi marker; valgu laadimise kontroll
mtSSB	Primaarne	Küülik, polükloonaalne	Sigma-Aldrich HPA002866	1:3000	Üheahelalist DNA siduv valk; mitokondriaalse nukleoidi marker
TOM40	Primaarne	Küülik, polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-11414	1:1000	Välismembraani translokaas 40; välismembraani marker
VDAC1	Primaarne	Hiir, monokloonaalne	Santa Cruz Biotechnology Inc. sc-390996	1:1000	Pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; välismembraani ja MAM struktuuride marker
DNMT1	Primaarne	Küülik, polükloonaalne	Abgent AP21131A-EV	1:1000	DNA metüültransferaas 1
DNMT3A	Primaarne	Küülik, polükloonaalne	Abgent AP21073A-EV	1:1000	DNA metüültransferaas 3A
Anti-hiir (HRP)	Sekundaarne	Hobune	Vector Laboratories PI-2000	1:10 000	Primaarse antikeha detekteerimine
Anti- küülik (HRP)	Sekundaarne	Kits	Vector Laboratories PI-1000	1:10 000	Primaarse antikeha detekteerimine

Pärast inkubeerimist primaarse antikehaga membraane pesti 1x TBST lahusega ning inkubeeriti mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud (ingl *horseradish peroxidase-conjugated*) sekundaarse antikehaga (valmistatud 5% piimalahuses lahjendusega 1:10 000) 1 h RT, millele järgnes pesu 1x TBST-ga. Signaali detekteerimiseks kasutati kommertsiaalset Bio-Rad Clarity™ ECL Western Blotting Substrate kitti. Signaale visualiseeriti radiograafiliselt röntgenfilmile.

2.2.5. Southern blot radioaktiivse hübridisatsiooniga

mtDNA alikvoote lahjendati 20 korda 2xSSC lahusega (300 mM NaCl; 30 mM C₆H₅Na₃O₇•2H₂O) ning keedeti 15 min 95 °C juures (Biosan Thermo Block TDB-120). Denatureerimaks mtDNA üheaheelaliseks, proovid asetati kohe pärast keetmist jää peale ning inkubeeriti vähemalt 3 min. Dot-blotteri (Bio-Rad Bio-Dot®) abil kanti proovid eelnevalt 2xSSC puhvriga pestud positiivselt laetud nailonmembraanile (Amersham Hybond-N+, HE Healthcare Life Sciences), igat proovi kolmes korduses (triplet), ning korrati pesu 2xSSC puhvriga. DNA ristsidumist (ingl *crosslinking*) teostati kasutades UV-kiirgust 120 mJ/cm² (Herolab UV Crosslinker).

Nailonmembraanile kantud DNA eelhübridiseeriti Church hübridisatsioonipuhvril [0,25 NaPi pH 7.2; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5% (w/v) BSA, 7% (w/v) SDS] 15 min 65°C juures (Techne Roller-Blot Hybridizer HB-3D). Hübridisatsioon viidi läbi Churh puhvril, millele oli lisatud tsütokroom b (*CYTB*)-spetsiifiline [α -³²P] dCTP-märgistatud proov vähemalt 3 h 65°C juures. Radioaktiivne mäрге sünteesiti enne hübridisatsiooni alustamist PCR meetodi abil (reaktsiooni ruumala 20 µl) (vt tabel 2), mäрге sadestati isopropanooli abil ja lisati hübridisatsioonipuhvrise.

Tabel 2. DNA hübridisatsiooni radioaktiivse proovi sünteesimise PCR segu.

Komponent	10xPCR puhver	25 mM MgCl ₂	2 mM dNTP-dCTP	1x CYTB <i>forward</i> praimer	1x CYTB <i>reverse</i> praimer	Taq polümeraas	<i>CYTB</i> template	[α - ³² P] dCTP isotoop	ddH ₂ O
Kogus (µl)	2	2	2	1	1	0,3	1	3	7,7

Mittehübridiseerunud proovi eemaldamiseks pesti membraani Church wash puhvriga [40 mM NaPi pH 7,2; 1mM EDTA pH 8,0; 5% (w/v) SDS]. Membraan eksponeeriti fosfoekraani (Storage Phosphor Screen, GE Healthcare Amersham Biosciences) vahel 12 h, hübridisatsiooni signaale detekteeriti Typhoon TRIOPhoshoimager masina abil.

2.2.6. *Proteinase K protection assay* DNMT lokalisatsiooni määramiseks

Selgitamaks DNMT1 ja DNMT3A lokalisatsiooni mitokondriaalses fraktsioonis, teostati *Proteinase K protection assay* analüüs vastavalt Wortmann jt (2012) artikli protokollile. Vahetult enne katse alustamist isoleeriti värske mitokondrite fraktsioon HEK293e rakkudest, mitokondrite *pellet* resuspendeeriti külmas 1x PBS lahuses. Ühe reaktsiooni jaoks võeti 100 µg mitokondriaalset valku. Saadud materjal jagati pooleks ning mitoplastide (mitokondrid, millel puudub välismembraan) saamiseks lüüsi üks osa mitokondritest digitoniiniga suhtes 1 µg valku : 0.5 µg digitoniini (vt 2.4.). Järgnevalt inkubeeriti mitokondreid ja mitoplaste 15 min jää peal, lisades proteinaas K erinevatel kontsentratsioonidel (1 ja 10 µg/µl), Triton X-100 detergendi juuresolekul (lõppkonts. 1%) või ilma, reaktsiooni lõppruumala (100 µl) ühtlustati 1x PBS-ga (vt tabel 3). Reaktsiooni peatamiseks lisati PMSF-i (200 µM) ja 5x SDS laadimispuhver ning keedeti 5 min 95°C juures. Proovid lahutati SDS-PAGE meetodil 12% ja 7,5% akrüülamiidgeelides. DNMT-de lokalisatsioon määrati Western immunoblot meetodi abil (vt tabel 2).

Tabel 3. *Proteinase K protection assay* skeem.

Reaktsioonisegu nr		Mitokondrid				Mitoplastid			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Komponent	Proteinaas K (1 µg/µl)	0	1	10	10	0	1	10	10
	Triton X-100 (1%)	-	-	-	+	-	-	-	+
	1xPBS	Reaktsiooni lõppruumala 100 µl							

2.2.7. mtDNA ekstraheerimine ja EpiTYPER analüüs

MtDNA eraldamiseks mitokondritest kasutati fenool-kloroformi meetodit (lisa 2). Mitokondriaalse valgu suspensiooni ruumala viidi „mugava“ ruumalani DNA ekstraheerimispuhvriga (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM EDTA pH 8,0; 75 mM NaCl), seejärel lisati SDS-i (1%) ja RNase A ensüümi (100 µg/µl) ning inkubeeriti 1 h 37°C juures.

Nukleaaside inaktiveerimiseks lisati seejärel 10 µl proteinaas K ensüümi (20 mg/ml) ning inkubeeriti 45 min kuni 1 h 37°C juures. Järgnevalt lisati üks maht T_{10E0,1} puhvrit (10 mM Tris pH 7,5; 0,1 mM EDTA) ja kolm mahtu fenool-kloroformi segu (pH 7,5), segati jõuliste liigutustega kuni lahus muutus piimjaks, inkubeeriti 2–5 min ning tsentrifugeeriti 5 min 7000 rpm juures (Sigma 1-14). Ülemine vedelfaas tõsteti uude tuubi ilma vahefaasi kaasa haaramata ning korrati fenool-kloroformi töötlust seni, kuni ülemine vedelfaas oli selge ja läbipaistev. Viimane pesu tehti puhta kloroformiga. Ekstraheeritud mtDNA-le lisati 2,5 mahtu 96% etanooli ning jäeti -20°C juurde sadenema üleöö, seejärel tsentrifugeeriti 10 min 14000x g RT ja eemaldati supernatant. MtDNA pesemiseks lisati 500 µl 80% etanooli ning korrati tsentrifugeerimist. Õhu käes kuivada saanud mtDNA *pellet* resuspendeeriti 20 µl 10 mM Tris lahuses. Saadud mtDNA esialgset puhtusastme hindamist ja kontsentratsiooni (ng/µl) mõõtmist teostati Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 spektrofotomeetril (Thermo Fisher Scientific). MtDNA kvaliteedi hindamiseks teostati elektroforees 0,5% agarosgeelis, millele oli lisatud etiidiumbromiid (6 µl/100ml), 1x TAE puhvris (40 mM Tris, 20 mM äädikhapet, 1 mM EDTA, pH 7,6). Suurusmarkerina kasutati 1 kb DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne). Geel pildistati UVIpro Gold Gel Documentation System (UVItec) abil, UVIpro tarkvara kasutades (UVItec).

MtDNA proovid lineariseeriti BamHI restriктаasiga (1 µg mtDNA kohta võeti 3 ühikut restriктаasi) 1 h 37 °C juures [mtDNA sisaldab vaid ühte BamHI lõikesaiti (joonis 1) (Liu jt., 2016)]. Reaktsioon viidi läbi 20 µl-s. Seejärel eraldati DNA fenool-kloroformi töötlusega ning sadestati. Sadestatud mtDNA kontsentratsiooni ja puhtusastet hinnati Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 spektrofotomeetril, kvaliteedi kontrollimiseks lahutati 0,5% agarosgeelis. mtDNA proovide metülatsiooni analüüs kuni toorandmete väljastamiseni teostati Agena Bioscience GmbH poolt, kasutades kvantitatiivsel mass-spektromeetrial põhinevat EpiTYPER® meetodit. MtDNA metülatsiooni tuvastamiseks rakendati DNA bisulfit-töötlust, milleks kasutati EZ DNA Methylation-GoldKM Kit'i. Bisulfitiga (HNO₃⁻) töötluse käigus metüülrühmaga mittekaitsitud tsütosiin konverteeritakse uratsiiliks, mida järgneva amplifikatsiooni käigus detekteeritakse tümiinina (T). Metülatsiooni taseme kvantifitseerimiseks arvutatakse C/T suhe bisulfitiga töödeldud ja töötlemata sekvenside vahel.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. DNMT1 ja DNMT3A lokaliseeruvad Twinkle *knock-down* rakkude mitokondriaalses fraktsioonis

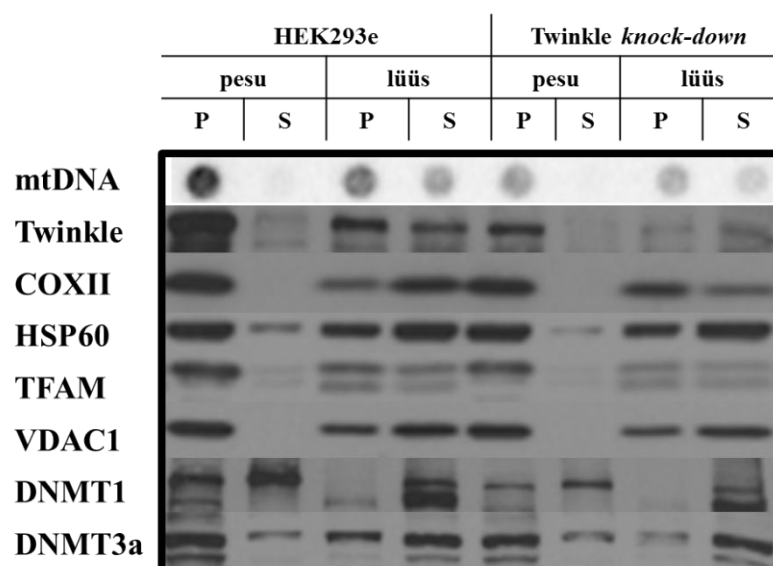
Rakutuumas vastutavad DNA 5mC modifikatsioonide eest nn säilitus-metüültransferaas DNMT1 ja kaks *de novo* metüültransferaasi – DNMT3A ja DNMT3B (Klose ja Bird, 2006; Okano jt., 1999), mille aktiivsus sõltub metüülrühma doonorina kasutatavast SAM kofaktorist (Kim, 2005). Mitokondrites on samuti tuvastatud mitokondriaalse DNMT1 isovormi (Shock jt., 2011) ja DNMT3A (Wong jt., 2013) esinemist, millele omistatakse mtDNA metüleerimise funktsiooni. Siiski on avaldatud ka vastupidiseid tulemusi (Liu jt., 2016; Hong jt., 2013). Mitokondriaalne helikaas Twinkle kuulub nukleoidi „tuumikvalkude“ hulka, seob mtDNA-d, reguleerib mtDNA replikatsiooni ja seeläbi ka mtDNA koopiaarvu (Korhonen jt., 2004; Spelbrink jt., 2001). Tyynismaa jt (2004) näitasid, et Twinkle hulga vähenemine transgeenses hiires põhjustas olulist mtDNA depletsiooni, samal ajal kui Twinkle üleekspressioon viis mtDNA koopiaarvu suurenemiseni. Twinkle kuulub membraanseoseliste valkude hulka. Hiljuti on näidatud, et Twinkle seondub suure afiinsusega mitokondri sisemembraani kolesteroolirikka piirkonnaga, kus osaleb replikatsiooniplatvormi moodustamises (Gerhold jt., 2015). Lähtudes eespool kirjeldatust on selge, et Twinkle kui ka DNMT1 ja DNMT3A funktsioon on ühel või teisel viisil seotud mtDNA metabolismiga ja seega on võimalik, et nende kolme valgu vahel on teatud seos.

Käesolevas töös uuriti DNMT1 ja DNMT3A esinemist HEK293e rakkude mitokondriaalses fraktsioonis ja võimalikku seost nende aktiivsuse ja Twinkle funktsiooniga. Eesmärgi saavutamiseks transfekteeeriti HEK293e rakke Twinkle suhtes spetsiifilise (*C10orf2*) siRNA-ga, vähendamaks valgu taset rakus, sealjuures välditi mtDNA täielikku kadumist. Valgu ekspressiooni ja mtDNA hulga hindamiseks vastavalt Western blot ja Southern blot analüüsi abil, eraldati nii kontrollidena kasutatavatest HEK293e rakkudest kui ka transfekteeeritud rakkudest mitokondriaalsete valkude fraktsioon. Nägemaks, millise nukleoidide populatsiooniga, kas replikatiivsete ja/või mittereplikatiivsete nukleoididega (Rajala jt. 2014), DNMT1 ja DNMT3A kolokaliseeruvad, lüüsi mitokondreid digitoniiniga (s.o mitokondrite subfraktsioneerimine) eesmärgiga eraldada nukleoidide kogumeid vastavalt nende lahustuvusele (vt alapeatükk 2.3.3.). Digitoniini madalaid kontsentratsioone kasutatakse mitokondrite välismembraani lõhkumiseks (mitoplastide saamiseks), kõrgete kontsentratsioonide juures permeabiliseeritakse ka sisemembraani, millega vabastatakse

membraanseoselised ja maatriksivalgud. Kahte eelmainitud nukleoidide populatsiooni saab eristada mitokondri sisemembraanile tugevasti seondunud Twinkle esinemise alusel: Twinkle on iseloomulik replikatiivsetele nukleoididele ja seega on antud DNA-valk kogum membraanseotud ja lahustumatu ning jääb *pellet* fraktsiooni (Gerhold jt., 2015; Rajala jt., 2014). Erinevad mitokondri fraktsioonid lahutati SDS-PAGE meetodil, millele järgnes valgulise koostise analüüs Western blot meetodil, kasutades spetsiifilisi antikehi. Antud projekti käigus ei mõõdetud absoluutset mtDNA koopiaarvu. MtDNA esinemist, vähenemist või kadu hinnati kvalitatiivselt Southern blot analüüsi tulemuste põhjal. Tripletitena nailonmembraanile kantud mtDNA proovid hübridiseeriti *CYTB*-spetsiifilise [α - 32 P] dCTP-märgistatud radioaktiivse märkega ning eksponeeriti fosfoekraani vahel. Hübridisatsiooni signaale registreeriti Typhoon TRIOPhoshoimager masina abil.

Joonisel 2 kujutatud Western blot analüüsi tulemused näitavad, et võrreldes kontrollidega on Twinkle *knock-down* rakkudes mitokondriaalse helikaasi signaal märkimisväärselt nõrgem, mis kinnitab transfektsiooni õnnestumist ja Twinkle hulga vähenemist transfekteeeritud rakkudes. Southern blot tulemustest selgus, et 72 tundi kestnud Twinkle *knock-down* põhjustas kerge, aga märgatavat mtDNA vähenemist, kuid täieliku mtDNA depletsioonini ei jõutud (joonis 2, mtDNA). Antud leid on kooskõlas varasemalt avaldatud tööde tulemustega, kus Twinkle mahasurumisega kaasnes mtDNA depletsioon (Goffart jt., 2009; Tyyntismaa jt., 2004). Valgu laadimise kontrollina kasutatud maatriksivalk HSP60 (kuumašoki valk 60 kDa) ja välismembraani poriin VDAC1 (pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1) kinnitavad, et mitokondriaalsete valkude lahutamisel SDS-PAGE meetodi abil oli igat proovi (s.o mitokondriaalset valku) kantud võrdses koguses. COXII (tsütokroom c oksüdaasi II subühik) kasutati mitokondri sisemembraani markerina. Mitokondrite lüüsimise efektiivsuse hindamiseks võrreldi HSP60 ja COXII jaotumist *pellet* ja supernatandi fraktsioonide vahel, sealjuures mõlema valgu signaalid kinnitavad, et lüüsimine toimus korrektselt.

Varasemalt on leitud, et maatriksivalk TFAM kolokaliseerub mtDNA-ga ja vastupidi, mistõttu TFAM on väga hea mtDNA marker (Rajala jt., 2014). Western blot detektsioonid näitavad, et TFAM-i kontsentratsioonid kontrollrakkude ja transfekteeeritud rakkude vahel on võrreldavad, kuigi Twinkle *knock-down* rakkudes on täheldatav vähene signaali nõrgenemine, mis võib olla seotud Twinkle kadumisest tingitud mtDNA koopiaarvu vähenemisega (joonis 2). COXII mõningane vähenemine transfekteeeritud rakkudes on samuti vastavuses mtDNA koopiaarvu langusega, kuna COXII on kodeeritud mitokondri genoomis (joonis 1).



Joonis 2. Twinkle *knock-down* rakkude mitokondriaalse fraktsiooni valkude ja mtDNA analüüs.

Transfekteeritud rakkude mtDNA on vähenenud (kuid mitte täielikult kadunud), mis on kooskõlas Twinkle valgu märkimisväärse depletsiooniga. MtDNA markervalk TFAM ja sisemembraani marker COXII on *knock-down* rakkudes samuti vähenenud. HSP60 ja VDAC1 kinnitavad, et kontrolli (HEK293e) ja *knock-down* proove kanti SDS-PAGE analüüsimiseks geelile võrdselt. Nii kontrollides kui ka transfekteeritud rakkudes on selgelt näha DNMT1 ja DNMT3A signaalid. Twinkle – mitokondriaalne helikaas Twinkle, COXII – tsütokroom c oksüdaasi II subühik, HSP60 – kuumašoki valk 60, TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A, VDAC1 – mitokondriaalne poriin, pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; DNMT1/3A – DNA metüültransferaas 1/3A; pesu – 1x PBS-ga pestud mitokondrid (mitokondrite terviklikkuse kontroll); lüüs – digitoniiniga lüüsitud mitokondrid. Joonisel olevad tulemused on representatiivsed vähemalt kolme bioloogilise korduse suhtes.

Töö käigus detekteeriti nii kontrollrakkude kui ka Twinkle *knock-down* rakkude mitokondriaalses fraktsioonis mõlema uuritud DNMT signaalid. Paistab, et Twinkle *knock-down* rakkudes on DNMT1 signaal mõnevõrra nõrgem võrreldes kontrollidena kasutatud HEK293e rakkudega. On näha, et lüüsimata rakkudes (nii HEK293e kui ka Twinkle *knock-down*) on DNMT1 detekteeritav nii *pellet*'is kui ka supernatandis. Pärast mitokondrite lüüsimist kaob DNMT1 signaal *pellet*'ist, supernatandis signaal säilib, kuid nõrgeneb. Antud leid viitab DNMT1 assotsiatsioonile mitokondri välismembraaniga. Hinnates DNMT3A signaali paistab, et Twinkle *knock-down* rakkudes on see kergelt vähenenud, mis on paremini märgatav digitoniiniga lüüsitud mitokondrite võrdlemisel. Lisaks sellele on näha, et kuigi pärast digitoniiniga töötlemist suurem osa DNMT3A-st koondub supernatandi fraktsiooni, säilib DNMT3A signaal ka *pellet*'is (joonis 2). See omakorda viib mõttele, et DNMT3A

liigub mitokondrite sisse. Mõlema DNMT signaali nõrgenemine Twinkle *knock-down* rakkudes lubab oletada, et nii DNMT1 kui ka DNMT3A on kuidagi seotud Twinkle valguga.

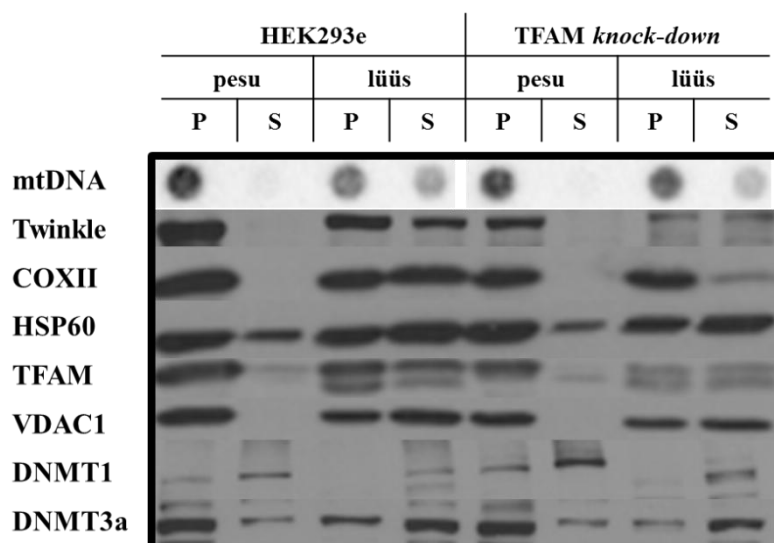
2.3.2. DNMT1 ja DNMT3A on detekteeritavad TFAM *knock-down* rakkude mitokondriaalses fraktsioonis

On näidatud, et imetaja rakkude mtDNA metabolism ja koopiaarv on otseselt seotud TFAM funktsiooniga ja selle hulgaga (Kang jt., 2007). TFAM on üks peamisi nukleoidi valke, mis osaleb mitokondriaalse replikatsiooni, transkriptsiooni ja reparatsiooni protsesside regulatsioonis. Nagu ka teised HMG perekonna valgud on ka TFAM võimeline siduma ja painutama mtDNA-d ning täitma sel viisil struktuurset funktsiooni. TFAM moodustab omalaadse nukleoidi karkassi, mille ümber ja sisse on mähitud mtDNA, tagades nõnda mtDNA stabiilsuse (Kaufman jt., 2007; Alam jt., 2003). Rebelo jt (2009) demonstreerisid, et nii TFAM üleekspressioon kui ka selle sünteesi pärssimine viib mtDNA kadumiseni. TFAM kõrgest kontsentratsioonist tingitud mtDNA topoloogia muutumine ning tavalisest kompaktsemaks pakkimine vähendab mtDNA kättesaadavust replikatsiooni masinavärgile (Rebelo jt., 2009; Kaufman jt., 2007). Kuna mtDNA replikatsiooni initsiatsioon on tihedalt seotud transkriptsiooniga, mille käigus sünteesitakse RNA-praimer, siis on võimalik, et TFAM, põhiline mitokondriaalne transkriptsioonifaktor, võib moduleerida mtDNA hulka rakus (Pohjoismäki jt., 2006).

Nägemaks DNMT1 ja DNMT3A võimalikku seost TFAM valguga, rakendati taaskord RNAi meetodit, millega suruti maha TFAM sünteesi. Ülejäänud töökäik oli sama, mis Twinkle *knock-down* puhul: mitokondreid lüüsi digitoniiniga, rakkude valgulist kooslust analüüsi Western blot meetodi abil, mtDNA hindamiseks kasutati Southern blot meetodit.

Vaatamata sellele, et siRNA efekt on mööduv ja TFAM-i kontsentratsioon rakkudes on väga kõrge, on joonisel 3 näha, et 96 h kestnud TFAM *knock-down* põhjustas TFAM valgu kontsentratsiooni vähenemist, sealjuures mtDNA depletsiooni ei ole. HSP60 ja VDAC1 signaalide järgi on näha, et kontrollide ja transfekteeritud rakkude mitokondrite erinevate fraktsioonide puhul oli analüüsimiseks võetud võrdne kogus materjali. HSP60 ja COXII on jaotunud *pellet* ja supernatandi vahel oodataval kujul, mis näitab, et lüüs digitoniiniga toimus õigesti. Transfekteeritud rakkudes on Twinkle signaal mõnevõrra vähenenud, mis võib viidata algavale mtDNA depletsioonile. Vähesele mtDNA koopiaarvu langemisele võib osutada ka

COXII signaali tugevuse nõrgenemine digitoniiniga lüüsitud TFAM *knock-down* supernatandi fraktsioonis (joonis 3).



Joonis 3. TFAM *knock-down* rakkude mitokondriaalse fraktsiooni valkude ja mtDNA analüüs.

Võrreldes kontrollidega on TFAM *knock-down* rakkudes TFAM vähenenud, mtDNA koopiaarvu vähenemist ei ole. HSP60 ja VDAC1 signaalid kinnitavad, et iga fraktsiooni analüüsimiseks oli võetud võrdne kogus mitokondriaalset valku. HSP60 ja COXII jaotumine *pellet* ja supernatandi vahel näitab, et lüüs digitoniiniga toimus õigesti. Twinkle signaali nõrgenemine TFAM *knock-down* rakkudes ning COXII mõningane vähenemine viitvad algavale mtDNA depletsioonile. Kontrollides ja transfekteeeritud rakkudes on selgelt näha DNMT1 ja DNMT3A signaalid. Twinkle – mitokondriaalne helikaas Twinkle, COXII – tsütokroom c oksüdaasi II subühik, HSP60 – kuumašoki valk 60, TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A, VDAC1 – mitokondriaalne poriin, pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; DNMT1/3A – DNA metüültransferaas 1/3A; pesu – 1x PBS-ga pestud mitokondrid (mitokondrite terviklikkuse kontroll); lüüs – digitoniiniga lüüsitud mitokondrid. Joonisel olevad tulemused on representatiivsed kolme bioloogilise korduse suhtes.

Korduvalt teostatud TFAM *knock-down* katsete tulemused näitasid nii DNMT1 kui ka DNMT3A esinemist rakkude mitokondriaalses fraktsioonis, sealjuures mõlema DNMT signaal oli detekteeritud ka kontrollrakkudes (joonis 3). Kontrolli ja TFAM siRNA-ga transfekteeeritud rakkude võrdlemisel paistab silma DNMT1 signaali mõningane tugevnemine TFAM *knock-down* rakkudes, kuigi lüüsimine digitoniiniga põhjustas sarnaselt Twinkle *knock-down*'ga DNMT1 kadumist *pellet*'i fraktsioonist. DNMT3A puhul on jälgitav sarnane „muster“ nagu ka Twinkle *knock-down* rakkudes: mitokondrite lüüsimine digitoniiniga põhjustab DNMT3A ümberpaigutumist supernatandi fraktsiooni, kuigi teatud hulk valku säilib ka *pellet*'is, mis viitab DNMT3A lokaliseerimisele mitokondrite sees. TFAM valgu

mahasurumisega kaasneb kerge DNMT3A vähenemine, mis viitab nende kahe valguga omavahelisele seosele.

Saadud tulemused näitavad, et DNMT1 ja DNMT3A on seotud mitokondritega, siinjuures on oluline märkida, et mõlemad DNMT-d reageerivad Twinkle ja TFAM hulga muutustele HEK293e rakkudes. DNMT1 kadumine nii kontrollrakkude kui ka transfekteeeritud rakkude digitoniiniga lüüsitud mitokondrite *pellet*'i fraktsioonist näitab, et DNMT1 ei ole seotud mitokondri sisemembraaniga tugevasti seondunud replikaativsete nukleoididega. DNMT3A märkimisväärne vähenemine *pellet*'is pärast lüüsimist seab samuti kahtluse alla DNMT3A ja replikaativsete nukleoidide vaheliste interaktsioonide esinemise. Arvestades DNMT funktsioone rakutuumas, kus DNMT1 tunneb ära hemimetüleeritud DNA järjestust ning vastutab metülatsioonimustri säilitamise eest nii replikatsiooni- kui ka reparatsioonijärgselt (Klose ja Bird, 2006), sealjuures DNMT3A viib läbi DNA *de novo* metüleerimist (Okano jt., 1999), olid käesoleva töö tulemused mõnevõrra ootamatud ning seadsid küsimärgi alla DNMT1 ja DNMT3A funktsiooni mitokondrites.

2.3.3. CpG metülatsiooni puudumine TFAM *knock-down*, Twinkle *knock-down* ja kontrollrakkude mtDNA mittekodeerivas piirkonnas

DNMT1 ja DNMT3A esinemine mitokondriaalses fraktsioonis innustas uurima, millist funktsiooni nad seal täidavad. Selleks määrati mtDNA metülatsiooni taset, keskendudes mtDNA NCR piirkonna (joonis 1) CpG metülatsiooni määramisele. NCR sisse jääv mitokondriaalne D-ling, mis on ühtlasi põhiline mitokondriaalse genoomi regulatsioonikeskus, on mtDNA replikatsiooni ja transkriptsiooni initsiatsiooniregioon (Holt ja Reyes, 2012; Clayton, 2000). Mõlema, nii genoomi H-ahela sünteesi initsiatsiooniks kui ka L-ahela polütsistronse transkripti sünteesiks vajalik RNA-praimer saab alguse samast initsiatsiooni saidist L-ahelal, mis asub D-lingu piirkonnas (joonis 1) (Holt ja Reyes, 2012).

MtDNA 5mC taseme võrdlemiseks kontrolli (HEK293e), Twinkle *knock-down* ning TFAM *knock-down* rakkude vahel, määrati iga katseskeemi kolmest bioloogilisest replikaadist eraldatud mtDNA NCR CpG metülatsiooni tasemed. Iga katse korral eraldati mtDNA fenoolkloroformi meetodi abil, millele eelnes mtDNA töötlus RNAas A ja proteinaas K ensüümiga, et puhastada mtDNA vastavalt RNA-st ja mtDNA-le seondunud valkudest (vt alapeatükk 2.3.7.). Muuhulgas inaktiveerib proteinaas K tsütosoolseid nukleaaase, mis võivad degradeerida mtDNA-d. Ekstraheeritud mtDNA kontsentratsiooni (ng/ μ l) mõõdeti spektro-

fotomeetriliselt, mtDNA kvaliteedi hindamiseks teostati elektroforees 0,5% agarosgeelis (vt alapeatükk 2.3.7.).

Varasemalt on näidatud, et DNA bisulfitiga töötamise efektiivsus sõltub DNA molekuli struktuurist. Nimelt, DNA rõngjas struktuur põhjustab ebatäielikku bisulfit-konversiooni, mis omakorda viib metülatsiooni tulemuste ülehindamiseni (Liu jt., 2016). Arvestades eespool mainituga, lõigati kontrollidest, *Twinkle knock-down* ja *TFAM knock-down* rakkudest eraldatud mtDNA rõngasmolekuli bisulfitiga töötamise efektiivsuse tõstmiseks BamHI restriktasiga lineaarseks lahti (Liu jt., 2016). Lineariseeritud mtDNA ekstraheeriti ning sadestati. Lõigatud mtDNA kontsentratsiooni ja puhtusastet mõõdeti spektrofotomeetrial, välja puhastatud mtDNA kvaliteeti hinnati agaros-geelelektroforeesi meetodil.

Edaspidine mtDNA proovide töötamine kuni toorandmete väljastamiseni teostati Agena Bioscience GmbH poolt, kus proove töödeldi bisulfitiga, seejärel analüüsiti kvantitatiivsel mass-spektrometriaal põhineva EpiTYPER® meetodi abil. Bisulfitiga töötlemise käigus metüleerimata tsütosiin (C) konverteeritakse uratsiiliks, mida järgneva amplifikatsiooni käigus detekteeritakse tümiinina (T). Metülatsiooni taseme kvantifitseerimiseks arvutatakse C/T suhe bisulfitiga töödeldud ja töötlemata sekvenside (referents) vahel. NCR piirkonna amplifitseerimiseks vajalikud pärisuunalised (*forward*) ja vastassuunalised (*reverse*) praimerid disainiti SEQUENOM EpiDesigner programmi abil (<http://www.epidesigner.com>). Võimalike variantide hulgast valiti kõige optimaalsemad praimerite paarid, s.t need praimerid, millele programmi poolt arvatud skoor oli kõige suurem ning lubas saada PCR abil võimalikult pikad amplikonid, mis sisaldaksid võimalikult palju potentsiaalseid CpG saite, kattes sealjuures kogu NCR piirkonna ja sellega külgnevaid piirkondi. Lisas 3 on esitatud graafik EpiDesigner programmi poolt genereeritud praimeripaaride abil sünteesitavate amplikonidega. Käesolevas töös analüüsiti nelja amplikoni – Amp7, Amp9, Amp20 ja Amp23 – metülatsiooni taset. Vastavate amplikonide praimerite järjestused on esitatud lisas 4.

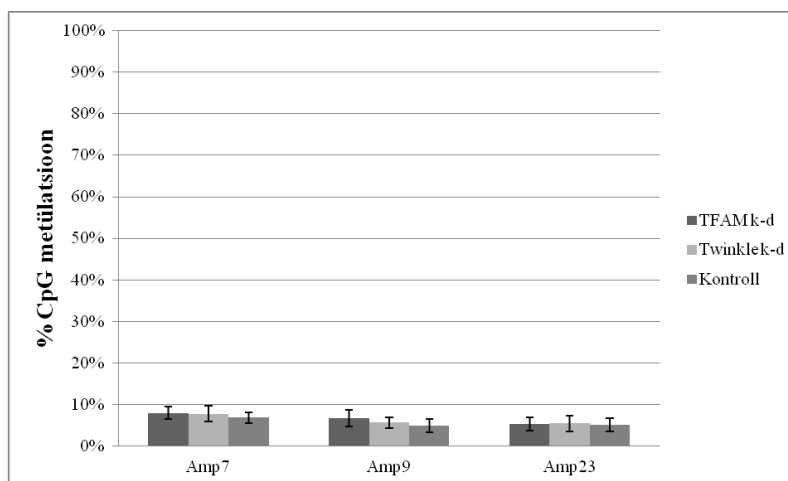
Tsütosiini metülatsiooni signaal oli detekteeritud 16 NCR piirkonna sisse jäävas CpG saidis (lisa 5), neist viis jäid Amp7 amplikoni sisse, viis olid Amp9 järjestuses ja kuus olid kaetud Amp23 amplikoniga. Iga CpG positsiooni kohta oli teostatud 0-, 50- ja 100-punkti positiivne kontroll, (s.o vastavalt 25%, 50% ja 100% standardid). Kõik väärtused, mis jäävad alla positiivse kontrolli 0-punkti väärtuste interpreteeritakse kui mittemetüleeritud positsioonid, 100-punkti positiivne kontroll vastab täiesti metüleeritud positsioonile, 50-punkti väärtused peegeldavad keskmist CpG metülatsiooni taset. Bisulfit-konversiooni efektiivsuse hindamiseks tehti kõrvale ka negatiivne kontroll metüleerimata DNA proovidega.

Vastavalt SEQUENOM EpiDesigner programmile sisaldab Amp20 amplikon 20 potentsiaalset CpG saiti, kuid käesolevas töös pole ühegi kohta registreeritud metülatsiooni signaali. Selgus, et PCR sünteesi käigus ei õnnestunud amplifitseerida Amp20 praimeripaari (lisa 4) vahele jäävat mtDNA ala, mistõttu antud piirkond jäi analüüsimata. Amp20 järjestuse baasil tehtud võrdlusanalüüs näitas, et antud amplikon langes kokku mtDNA kolmeahelalise D-lingu piirkonnaga, mis võiski olla PCR amplifikatsiooni ebaõnnestumise põhjuseks. Täna on avaldatud mitmeid uurimistöid, kus on tuvastatud 5mC esinemist mtDNA D-lingu piirkonnas. Näiteks, Wong jt (2013) kasutasid mtDNA metülatsiooni analüüsiks bisulfit-pürosekveneerimise meetodit ning leidsid, et D-lingu 5mC osakaal oli ~4–6%. Bellizzi (2011) töö tulemused näitasid, et ~17% D-lingu piirkonna CpG nukleotiidipaari tsütosiinidest olid metüleeritud, ka Bianchessi jt (2016) ja Shock jt (2011) kirjeldasid NCR piirkonna metülatsiooni esinemist. Käesoleva projekti raames planeeritakse jätkata mtDNA metülatsiooni uurimisega ning koostöös Agena Bioscience GmbH meeskonnaga disainida uued praimerid Amp20 jaoks.

Amp7 sisaldas viite potentsiaalset CpG saiti ning erinevate CpG positsioonide metülatsiooni osakaal varieerus TFAM *knock-down* puhul 4–10,7%, Twinkle *knock-down* rakkudes 3,3% ja 11,7% vahel, kontrollides 3,3–9,3% (lisa 5). Ühe CpG positsiooni puhul (CpG3) 5mC signaali ei detekteeritud. Amp7 keskmine metülatsiooni tase TFAM *knock-down* rakkudes oli 7,9%, Twinkle *knock-down* rakkudes oli 7,7%, kontrollidena kasutatud HEK293e rakkudes oli vastavaks suuruseks 6,8% (joonis 4). Ühegi CpG positsiooni metülatsiooni osakaal ei ületanud sellele määratud 0-punkti väärtust, mis näitab, et seal puudus metülatsioon.

Amp9 amplikoni järjestuses tuvastati samuti viis CpG saiti, kuigi kahe positsiooni – CpG3 ja CpG4 – signaale ei olnud võimalik eristada, mistõttu neid käsitleti kui ühte. TFAM *knock-down* mtDNA NCR erinevate CpG positsioonide metülatsiooni osakaal jäi vahemikku 4,7–12,7%, Twinkle *knock-down* rakkudes 3,7–9,3%, kontrollrakkudes vastavalt 1,3–9,3% (lisa 5). Amp9 keskmine 5mC tase oli TFAM *knock-down* rakkudes 6,7%, Twinkle *knock-down* rakkudes 5,6%, transfekteerimata HEK293e rakkudes 4,8% (joonis 4). Teatud Amp9 CpG positsioonide metülatsiooni signaal ületas 0-punkti taseme: TFAM *knock-down* rakkudes olid CpG2, CpG3:4 ja CpG5 positsiooni metülatsiooni signaalid veidi üle 0-punkti väärtuste (vastavalt 12,7% vs 6%; 4,7% vs 4% ja 4,7% vs 3%), Twinkle *knock-down* rakkudes registreeriti tugevamaid 5mC signaale CpG2 ja CpG5 saidi puhul (vastavalt 9,3% vs 6% ja 3,7% vs 3%), ka kontrollrakkudes ületasid kahe positsiooni – CpG2 ja CpG3:4 – metülatsiooni väärtused 0-punkti (9,3% vs 6% ja 4,7% vs 4%). Siiski, arvestades 50-punkti

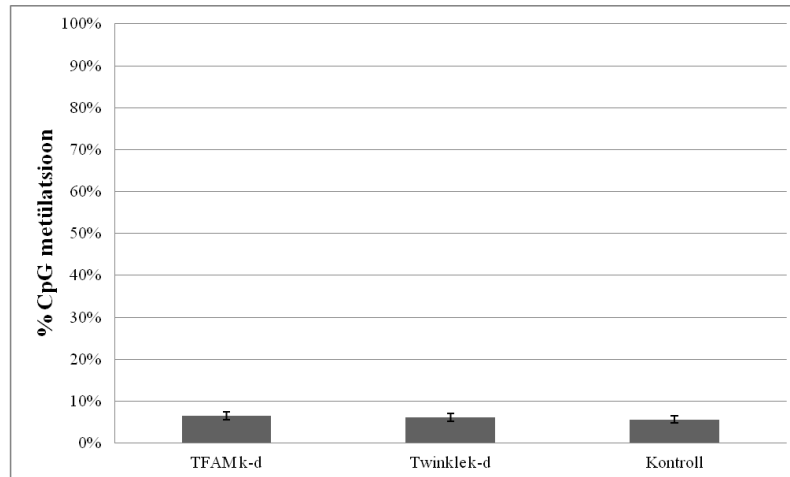
väärtusi, mis oli kõikide Amp9 CpG positsioonide jaoks ~60%, hinnati Amp9 metülatsiooni taset tühiseks.



Joonis 4. TFAM knock-down, Twinkle knock-down ja kontrollrakkude mtDNA NCR eri piirkondade (Amp7, Amp9 ja Amp20) keskmised 5mC esinemissagedused. TFAM siRNA ja Twinkle siRNA-ga transfekteeeritud ning transfekteeerimata HEK293e kontrollrakkudest eraldatud mtDNA lineariseeriti BamHI restriktasiga. Seejärel töödeldi mtDNA proovid bisulfitiga ja analüüsiti 5mC suhtes kvantitatiivsel mass-spektromeetriaal põhineva EpiTYPER® meetodi abil. Keskmised NCR piirkonnale, mida amplifitseeriti nelja spetsiifilise praimeripaari abil. Saadud ampliconide – Amp7, Amp9 ja Amp23 – põhjal määrati mtDNA NCR eri piirkondade keskmised metülatsiooni tasemed (vt 2.4.3.). D-linguga kokkulangeva Amp20 ampliconi PCR süntees ebaõnnestus, mistõttu antud piirkond jäi analüüsimata. TFAM k-d – TFAM knock-down; Twinkle k-d – Twinkle knock-down; Kontroll – transfekteeerimata HEK293e rakud. Joonisel olevad tulemused on representatiivsed kolme bioloogilise korduse suhtes.

Amp23 ampliconi sisse jäi kuus CpG saiti. CpG4 kohta andmed puuduvad, kuna signaali ei detekteeritud. CpG7 suhtes jääd kriitiliseks, kuna antud positsiooni positiivsete kontrollidena kasutatud 0- ja 50-punkti proovide (vastavalt metüleerimata ja keskmise metülatsiooni tasemega proov) puhul saadi ebaadekvaatseid tulemusi, mistõttu antud positsiooni analüüsitulemusi ei võetud arvesse. CpG7 jääb NCR piirkonnast välja ning asub 12S rRNA geeni sees. Kuigi käesolevas töös jääd selle positsiooni suhtes kriitilisteks, on ühes varasemalt teostatud uurimuses täheldatud, et ajukoe ja testiste rakkudest eraldatud mtDNA 16S rRNA geeni 5mC osakaal oli võrreldes D-lingu piirkonnaga märkimisväärselt kõrgem (Wong jt., 2013). TFAM knock-down rakkudes jäi Amp23 5mC osakaal eri CpG saitide vahel vahemikku 1–10,3%, Twinkle knock-down rakkudes jäi see 0–12% vahele, HEK293e rakkudes varieerus 1% ja 10% vahel (lisa 5). Keskmise Amp23 5mC tase erines TFAM

knock-down, Twinkle *knock-down* ja kontrollrakkude vahel minimaalselt, mida on näha vastavatest näitajatest – 5,2%, 5,4% ja 5,1% (joonis 4). Kuigi nii transfekteeeritud kui ka kontrollrakkudes olid CpG2 positsiooni metülatsiooni väärtused veidi (~3%) üle minimaalse metülatsiooni piirmäära, tõlgendatakse antud tulemusi siiski kui metülatsiooni puudumist.



Joonis 5. TFAM *knock-down*, Twinkle *knock-down* ja kontrollrakkude mtDNA NCR keskmine 5mC osakaal. Keskmine NCR metülatsiooni tase TFAM *knock-down*, Twinkle *knock-down* ja kontrollide rakkudest eraldatud mtDNA-s oli vastavalt 6,6%, 6,2% ja 5,6% (\pm standardviga), sealjuures piirmäär, millest alates võib metülatsiooni signaali pidada positiivseks oli 9,3%. TFAM k-d – TFAM *knock-down*; Twinkle k-d – Twinkle *knock-down*; Kontroll – transfekteeerimata HEK239e rakud. Joonisel olevad tulemused on representatiivsed kolme bioloogilise korduse suhtes.

Keskmine NCR metülatsiooni tase TFAM *knock-down*, Twinkle *knock-down* ja kontrollidest eraldatud mtDNA-s oli vastavalt 6,6% (SEM \pm 1%), 6,2% (SEM \pm 1%) ja 5,6% (SEM \pm 1%) (joonis 5), sealjuures piirmäär, millest alates võib metülatsiooni signaali pidada positiivseks oli keskmiselt 9,3%. Arvestades Amp7, Amp9 ja Amp23 madalaid metülatsiooni signaale, võib järeldada, et HEK239e rakuliini mtDNA NCR piirkonna tsütosiini metülatsioon on, kui üldse, tühine ning ei oma regulatoorset tähtsust mtDNA metabolismis. Samas mtDNA D-linguga kattuv Amp20 amplikon jäi käesolevas töös analüüsimata, kuna PCR käigus antud mtDNA piirkonna amplifikatsioon ebaõnnestus. Võimalik, et mtDNA on metüleeritud muudes mtDNA piirkondades, mida antud töös ei vaadeldud.

Siiski, käesoleva töö mtDNA CpG metülatsiooni tulemused ei välista mtDNA transkriptsioonilise aktiivsuse reguleerimist epigeneetiliste mehhanismide kaudu. Lisaks 5mC modifikatsioonidele on tänaseks avaldatud andmeid ka teiste epigeneetiliste mehhanismide kohta, nagu näiteks 5hmC (Dzitoyeva jt., 2012; Shock jt., 2011) ning miRNA vahendatud

geeniekspressiooni regulatsioon (Wang jt., 2015; Lung jt., 2006). MtDNA on sarnaselt tuuma kromosoomidega kompaktselt pakitud nukleoidi valkude poolt, eelkõige TFAM abil (vt alapeatükk 1.1.4.). See omakorda lubab oletada, et ka mtDNA metabolismi epigeneetiline regulatsioon võib toimuda nukleoidi valkude posttranslatsioonilise modifitseerimise kaudu, kuigi tänaseni puuduvad kinnitavad andmed selle kohta. Spekuleerides edasi sellel teemal on võimalik, et mtDNA geeniekspressiooni moduleerimine võib toimuda sarnaselt rakutuumas toimuvale kromatiini remodelleerimise mehhanismile, kus mtDNA-ga seondunud valkude liigutamisega piki DNA molekuli reguleeritakse geneetilise materjali kättesaadavust mtDNA metabolismis (replikatsioon, transkriptsioon ja/või reparatsioon) osalevatele valkudele.

Vaatamata sellele jääb arusaamatuks, millist funktsiooni täidavad mitokondrites DNMT1 ja DNMT3A, kui saadud tulemuste põhjal on näha, et vähemalt mtDNA regulatsioonipiirkonnas metülatsiooni ei esine. Viimast võivad mingil määral seletada Chen jt (2012) *in vitro* katsete tulemused, milledest selgus, et *de novo* metüültransferaasidel DNMT3A ja DNMT3B on lisaks DNA metüleerimise aktiivsusele ka täiesti vastupidine funktsioon, nimelt dehüdroksümetüleerimise võime, millega taastatakse DNA mittemetüleeritud seisund. Lisaks sellele on leitud, et suur osa 5mC-dest esinevad hoopis CH dinukleotiidi kontekstis (kus H=T, C või A) (Bianchessi jt., 2016; Bellizi jt., 2012) (mida käesoleva projekti raames pole uuritud), kus olulist rolli võib mängida DNMT3A (Jang jt., 2017).

On näidatud, et mtDNA epigeneetiline muster varieerub raku- ja koetüübiti (Wong jt., 2013), muutub organismi vananemise (Sun jt., 2013) ja isegi raku nn replikatiivse vananemise (ingl *replicative senescence*) käigus (Bianchessi jt., 2016). On teada, et inimese elustiili valikud kujundavad samuti geeniekspressiooni, põhjustades muutusi epigeneetilises programmis (Rönn jt., 2013; Zeilinger jt., 2013; Breitling jt., 2011; Bjornsson jt., 2008; Fraga jt., 2005). Muutused DNA epigenoomis võivad põhjustada patoloogiate teket (Kietzmann jt., 2017; Chesnut jt., 2011) ning käivitada rakkude transformatsiooni kasvajaaliste protsesside suunas (Ferreira jt., 2015; Ehrlich, 2009). DNA metülatsiooni tase sõltub muuhulgas DNA-valk kontaktide arvust, s.t DNA kättesaadavusest metüültransferaasidele (Rebelo jt., 2009). Kõik need teadmised on heaks argumendiks jätkata mitokondriaalse epigeneetika uurimisega.

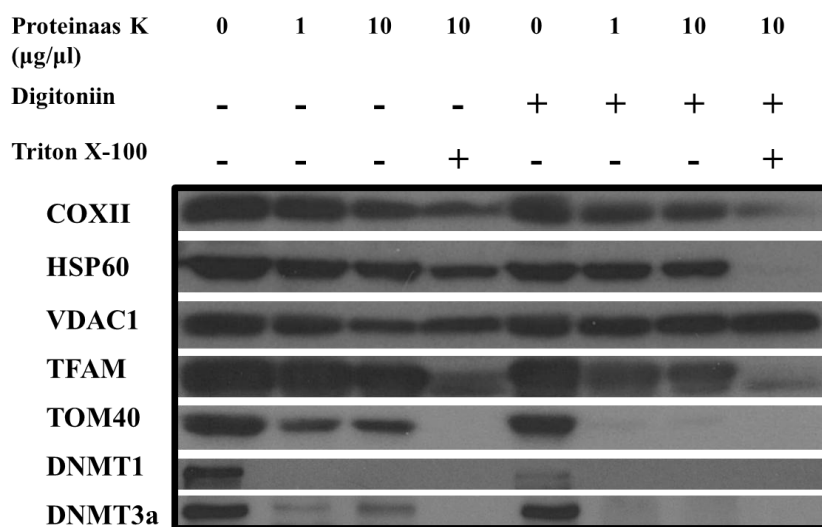
2.3.4. DNMT1 on assotsieerunud mitokondri välismembraaniga, DNMT3A lokaliseerub mitokondri membraanidevahelises ruumis

DNMT1 ja DNMT3A esinemine mitokondriaalses fraktsioonis ja sellega vastuolus olev metülatsiooni puudumine mtDNA-s tekitab küsimusi juurde. Järgmise sammuna otsustati selgitada, millises mitokondri kompartendis asuvad DNMT1 ja DNMT3A. Liikudes väljaspoolt sissepoole jaotub mitokondri ehitust järgmiselt: välismembraan, membraanidevaheline ruum, sisemembraan ja sisemembraaniga ümbritsetud maatriks (Krauss, 2001). Igat kompartimenti iseloomustab kindel valguline profiil (Taylor jt., 2003). Selgitamiseks DNMT1 ja DNMT3A lokaliseerumist mitokondri sees, viidi läbi *Proteinase K protection* analüüs vastavalt Wortmann jt (2012) protokollile (vt 2.3.6.). Katse põhimõte seisneb mitokondrite töötlemises erinevate proteinaas K (laia toimespektriga seriini proteaas) kontsentratsioonidega mitteioonse detergendi Triton X-100 juuresolekul või ilma (katse skeem on esitatud tabelis 3). Triton X-100 on nõrk mitteioonne detergent, mis sobib mitokondri membraanide ja membraanivalkude lahustamiseks, kuigi membraanide solubiliseerumine ei ole täielik (Aasumets, 2015). Valgu kättesaadavus proteinaas K-le sõltub valgu asukohast mitokondris, seega rakendades erinevaid proteinaas K kontsentratsioone samaaegsel detergendi juuresolekul või selle puudumisel, on võimalik selgitada huvipakkuvat valgu lokaliseerumist. Katses kasutati intaktseid mitokondreid (pesu) ja välismembraanita mitokondreid ehk mitoplaste. Viimaste saamiseks lüüsi mitokondreid digitoniiniga suhtes 1 µg valku : 0,5 µg digitoniini. Katse tulemusi analüüsiti Western blot meetodiga.

Joonisel 6 on esitatud *Proteinase K protection* katse tulemused. Esimesed neli tulpa kujutavad intaktsete mitokondrite töötlemise tulemusi, ülejäänud neli tulpa näitavad vastavaid tulemusi mitoplastide kohta. Iga tulpa koha peal on kolmekohaline kood, kus esimene positsioon tähistab lisatud proteinaas K kontsentratsiooni (1µg/µl), teine positsioon näitab digitoniiniga lüüsimist mitoplastide saamiseks, kolmas positsioon tähistab Triton X-100 detergendi lisamist (lõppkonts. 1%) või selle puudumist.

Tulemustest on näha, et mitokondri välismembraani markeri TOM40 (mitokondri välismembraani translokaas) signaali järgi on hästi eristatavad intaktsete mitokondrid (esimesed neli tulpa) ja digitoniiniga töödeldud mitoplastid (viimased neli tulpa), sealjuures signaali tugevus korreleerub proteinaas K kontsentratsiooniga. Lisatud detergent lahustab osaliselt mitokondri fosfolipiidset kaksikkihti ning vabastab nõnda membraanivalke, mis muutuvad kättesaadavaks proteolüütilisele ensüümile. Tulemuseks on signaali nõrgenemine

või kadumine. Ühe teise välismembraani valgu, VDAC1, signaal püsis suhteliselt stabiilsena kõikides reaktsioonides, ka digitoniiniga lüüsitud mitoplastide puhul. On näidatud, et VDAC1 osaleb MAM struktuuride (ingl *mitochondria-associated membrane*) – mitokondriaalse ja endoplasmaatilise retiikulumi membraanide kontaktsait – moodustamises (Gerhold jt., 2015). Siit tulenevalt on VDAC1 signaali püsimine ootuspärane, kuna MAM struktuurid, mida Triton X-100 detergendiga ei ole võimalik täielikult lahustada, kaitsevad VDAC1 proteinaas K proteolüütilise toime eest.



Joonis 6. Mitokondriaalsete valkude proteinaas K analüüs. DNMT1 ja DNMT3A valkude Western blot detektsioonid digitoniiniga töötlemata (1.–4. tulp) ja töödeldud (5.–8. tulp) mitokondrites ehk mitoplastides. Nii mitokondreid kui ka mitoplaste inkubeeriti proteinaas K erinevate kontsentratsioonide juures (0–10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) koos Triton X-100-ga (lõppkonts. 1%) või ilma. Tulemused näitavad, et DNMT1 on assotsieerunud mitokondri välismembraaniga, DNMT3A lokaliseerub membraanidevahelises ruumis. COXII, HSP60, VDAC1, TFAM ja TOM40 kasutati võrdlustena tulemuste interpreteerimisel. COXII – tsütokroom c oksüdaasi II subühik, HSP60 – kuumašoki valk 60, TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A, VDAC1 – mitokondriaalne poriin, pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; DNMT1/3A – DNA metüültransferaas 1/3A.

Maatriksis väga kõrgetes kontsentratsioonides esinevate HSP60 ja TFAM puhul on jälgitav sarnane muster: (1) intaktse välismembraaniga mitokondrites on mõlemad valgud kaitstud proteinaas K proteolüütilise toime eest kahe membraani taha, mida peegeldab tugev valgu signaal ka kõrgema proteinaasi kontsentratsiooni juures; (2) mitoplastide puhul leiab aset sama tendents, kuigi võrreldes tervete mitokondritega on signaal mõnevõrra nõrgem; (3)

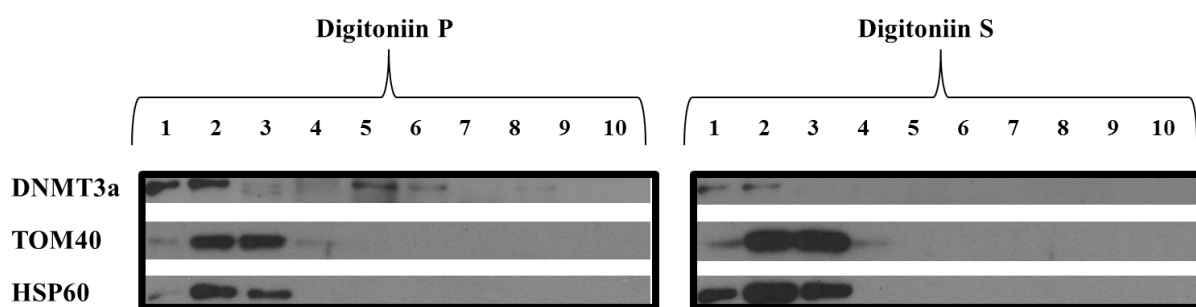
detergendi lisamine põhjustab drastilist valgu hulga vähenemist. Sarnast pilti näeme ka sisemembraani valgu COXII puhul.

Huvitavaks leiuks oli DNMT1 signaali muster, millest ilmneb, et DNMT1 ei liigu mitokondri sisse, vaid on pigem assotsieerunud mitokondri välismembraaniga. Viimast kinnitab DNMT1 signaali puudumine proteinaas K-ga töödeldud intaktsete mitokondrite ja mitoplastide valgufraktsioonides. Saadud tulemused on väga sarnased Wong jt (2013) läbiviidud uurimuse tulemustega, kus DNMT1 signaali pole samuti tuvastatud ei hiire närvi- lihas- ega testiste rakkudest isoleeritud mitokondrites, sealjuures proteinaas K töötamise tulemuste põhjal töö autorid järeldasid, et DNMT1 võib olla seotud mitokondri välismembraaniga (Wong jt., 2013). Vaatamata sellele erinesid antud tulemused Shock jt (2011) poolt esitatud andmetest, kus oli näidatud mitokondriaalse DNMT1 isovormi, millel tuvastati mitokondriaalne signaalpeptiid, esinemist mitokondriaalses fraktsioonis ning selle seondumist mtDNA-le.

Shock jt (2011) kasutasid valgu märgistamist fluorestseeruva GFP-märkega ning valgu lokaliseerimise uuriti konfokaalmikroskoopia abil. Antud meetod näitab küll valgu kolokalisatsiooni mitokondritega, kuid ei võimalda eristada, kas valk siseneb mitokondri sisse või jääb seotuna mitokondri välispinnale (Shock jt., 2011). Siiski, DNMT1 dünaamika ja selle hulk mitokondri erinevates kompartmentides vajab edasist uurimist, rakendades tundlikumaid meetodeid ja/või kasutades kõrgemaid mitokondriaalse valgu kontsentratsioone, et detekteerida ka madalates kontsentratsioonides mitokondrites olevaid valke. Võimalik, et DNMT1 lokaliseerimine mitokondrites võib sõltuda välissignaalidest või raku metaboolsetest vajadustest. Arutledes antud teemal edasi, on võimalik, et mitokondri välismembraan võib olla DNMT1 jaoks omalaadse platvormina, kus DNMT1 osaleb teatud signaalkompleksi moodustamises, mis omakorda võib mängida olulist rolli mitokondriaalse geeniekspressiooni regulatsioonis. Kuigi DNMT1 eelistab substraadina DNA-d, võib oletada, et mitokondrites täidab DNMT1 ka muid funktsioone, nagu näiteks osaleb mitokondrisse transporditavate valkude ja/või RNA molekulide modifitseerimises. Ei ole välistatud, et mitokondriaalsetel valkudel võivad olla erinevad ja kohati sõltumatud funktsioonid, siinkohal võib olla ka DNMT valkudel muid funktsioone. Pärmirakkudes on näiteks näidatud, et tsitraaditsükli ensüümil akonitaasil on lisaks tsitraadi isomerisatsiooni aktiivsusele ka täiesti ootamatu lisafunktsioon: akonitaas seob ja pakib mtDNA-d, osaledes seeläbi mtDNA säilitamises (Chen jt., 2005). Sarnaseid omadusi on kirjeldatud ka pärmirakkudes hargnenud ahelaga aminohapete sünteesi eest vastutava ensüümi Ilv5 kohta, mis samuti osaleb mtDNA pakkimises sõltuvalt pärmiraku metaboolsest seisundist (Chen ja Butow, 2005).

DNMT3A puhul on näha, et intaktse välismembraaniga mitokondrites on valgu signaal detekteeritav ka kõrgema proteinaasi kontsentratsiooni juures ning see kaob alles pärast Triton X-100 lisamist. DNMT3A signaal kaob ka mitoplastides kohe pärast proteinaasi lisamist (joonis 6). Antud tulemused viitavad DNMT3A lokaliseerimisele mitokondri membraanidevahelises ruumis.

Kumbki DNMT-dest ei lokaliseeru selgelt mitokondri maatriksis, kus asub DNMT põhiline substraat – mtDNA, vaid on eraldatud sellest mitokondri sisemembraani abil. Tekib küsimus, millist funktsiooni täidavad DNMT1 ja DNMT3A mitokondrite sees, kui DNA metüleerimine on takistatud füüsilise barjääriga. Antud leid ajendas uurima, kas DNMT3A on mingil viisil seotud mitokondriaalsete nukleoididega. Selleks lahutati SDS-PAGE meetodi abil oma töögrupi kaaslane Koit Aasumetsa poolt valmistatud ja lahkelt jagatud HEK293e rakkudest jodiksanooli gradiendis puhastatud mitokondrite eri fraktsioonide valke 12% polüakrüülamiidgeelis, valgud immobiliseeriti nailonmembraanile ning teostati Western blot analüüsi. Ultratsentrifuugimist jodiksanooli gradiendis, mille käigus lahutuvad membraanijäägid, valgud ning mtDNA tiheduse järgi erinevatesse fraktsioonidesse, kasutatakse eesmärgiga lahutada nukleoide mitokondrite lüsaadist (membraanirikas *pellet* ja lahustunud valke sisaldav supernatant eraldi), et edaspidi uurida nukleoidide koostist (Rajala jt., 2014).



Joonis 7. HEK293e mitokondrite jodiksanooli gradiendi Western blot detektsioonid. Jodiksanooli gradiendis ultratsentrifuugimisega lahutatud digitoniiniga lüüsitud mitokondriaalsete fraktsioonide Western blot analüüsi tulemused näitasid, et *pellet*'i 8. fraktsioonis, kuhu liigub mtDNA, (Gerhold jt., 2015; Rajala jt., 2014) DNMT3A signaal praktiliselt puudub, seevastu esineb *pellet*'i 5. fraktsioonis. Digitoniin P – pärast digitoniiniga töötlemist eraldatud mitokondriaalne *pellet* (nn membraani fraktsioon, s.o sisemine ja välimine membraan); Digitoniin S – pärast digitoniiniga töötlemist eraldatud mitokondriaalne supernatant (lahustunud maatriksivalgud).

Mitmes hiljuti avaldatud töös kirjeldati, et mitokondri sisemembraaniga seotud mtDNA ning paljud nukleoidi valgud (Twinkle, mtSSB, POLG, TFAM) kontsentreeruvad jodiksanooli gradiendi *pellet*'i 8. fraktsioonis (nn nukleoidi fraktsioon), mis esindab tõenäoliselt mitokondri sisemembraanile seondunud replikatiivsete nukleoidide populatsiooni (Gerhold jt., 2015; Rajala jt., 2014). Käesoleva töö Western blot detektsioonide tulemused näitasid, et *pellet*'i 8. fraktsioonis DNMT3A signaal praktiliselt puudub (joonis 7), mis tähendab, et DNMT3A on oma põhilisest substraadist, mtDNA-st, eemal. Huvitavaks leiuks osutus DNMT3A liikumine mitokondriaalse *pellet*'i 5. fraktsiooni (joonis 7). Gerhold jt (2015) uurimistöös ei kirjeldatud Twinkle ja mtSSB esinemist jodiksanooli gradiendis fraktsioneeritud mitokondriaalse lüsaadi *pellet*'i 5. fraktsioonis, ka TFAM ja mtDNA signaalid olid seal väga nõrgad. Siiski, hiljuti Koit Aasumetsa poolt teostatud uurimiskatsete tulemused näitasid, et kuigi domineeriv osa mtDNA-st kontsentreerus *pellet*'i 8. fraktsioonis (sarnaselt Gerhold jt., 2015 ning Rajala jt., 2014 esitatud andmetele), liiguvad mitmed nukleoidiga assotsieerunud valgud (Twinkle, TFAM, mtSSB ja ATAD3) *pellet*'i 5. fraktsiooni, kuhu käesoleva töö Western blot tulemuste järgi liigub ka DNMT3A. Lisaks sellele koondusid *pellet*'i 5. fraktsiooni translatsiooni masinavärgi valgud AlkBh1 ja FASTKD2 (magistritöö, Koit Aasumets). Nukleoidi valkude, DNMT3A, AlkBh1 ja FASTKD2 kolokaliseerumine *pellet*'i 5. fraktsioonis annab alust oletada, et antud valgud võivad osaleda seni tundmatu funktsiooniga kompleksi moodustamises. Võimalik, et need valgud mängivad teatud rolli mitokondriaalse translatsiooni regulatsioonis. Siiski, hetkel olemasolevate teadmiste põhjal ei ole võimalik teha kindlaid järeldusi ning mitokondriaalse *pellet*'i 5. fraktsiooni funktsionaalne tähendus peaks selguma edasiste katsete käigus. See omakorda võib-olla heidaks valgust ka DNMT-de funktsioonile mitokondrites.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö käigus on näidatud mitokondriaalsete DNA metüültransferaaside – DNMT1 ja DNMT3A – esinemine HEK293e rakkude mitokondriaalses fraktsioonis. Töö käigus ilmnis, et DNMT1 ja DNMT3A hulk rakus muutub vähesel määral vastusena kahe mitokondriaalse nukleoidiga assotsieerunud valgu – mitokondriaalse helikaasi Twinkle ja mitokondriaalse transkriptsioonifaktori A (TFAM) – RNAi-vahendatud mahasurumisele, viidates nende valkude omavahelisele seosele.

MtDNA regulatoorselt olulise mittekodeeriva ala (NCR) keskmine CpG metüülatsiooni tase TFAM *knock-down*, Twinkle *knock-down* ja kontrollrakkudes oli vastavalt 6,6% (SD ± 3,5%), 6,2% (SD ± 3,5%) ja 5,6% (SD ± 3%), sealjuures piirmäär, millest alates võib metüülatsiooni signaali pidada positiivseks oli keskmiselt 9,3%. Arvestades madalaid metüülatsiooni signaale, võib järeldada, et HEK293e rakuliini mtDNA NCR piirkonna tsütosiini metüülatsioon on, kui üldse, tühine ning suure tõenäosusega ei oma regulatoorset tähtsust mitokondriaalses geeniekspressioonis.

Rakendades erinevaid proteinaas K kontsentratsioone samaaegsel Triton X-100 detergendi juuresolekul või selle puudumisel selgus, et DNMT1 on seondunud mitokondri välismembraaniga, sealjuures DNMT3A liigub mitokondri membraanidevahelisse ruumi. Antud tulemused näitavad, et DNMT1 ja DNMT3A on füüsiliselt eraldatud oma põhilisest substraadist, s.o mtDNA-st, mis on kooskõlas madalate mtDNA CpG metüülatsiooni väärtustega. Vajab näitamist, milliseid spetsiifilisi funktsioone DNMT1 ja DNMT3A mitokondrites täidavad.

Mitochondrial DNA methyltransferases - potential nucleoid associated proteins and function in mtDNA maintenance

Julija Bolšakova

SUMMARY

Mitochondria are the only organelles in animal cells which possess their own genome. Mitochondrial DNA (mtDNA) is essential for cells to maintain respiratory competency and is present in protein-DNA complexes called nucleoids. Mitochondrial nucleoids are the sites for all mtDNA maintenance functions (replication, translation, repair, segregation etc.). MtDNA maintenance defects, but also other mitochondrial dysfunctions often lead to severe diseases, among which myopathies (Chesnut et al., 2011), neurodegenerative diseases (Coskun et al., 2012) and several cancers (Ferreira et al., 2015) can be found. It is becoming increasingly clear that also cardiovascular diseases and their pathogenesis have important mitochondrial components (Tsutsui et al., 2011).

Mitochondrial epigenetics have come to attention rather recently since it was discovered that such functions are related to a number of severe mitochondrial dysfunctions (Castegna et al. 2015). The current thesis was concerned with the question whether the DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3A, recently reported to localize to mitochondria, can be classified as mtNAPs (mitochondrial nucleoid associated proteins) and what their potential function could be within mitochondria since conflicting data regarding the presence or absence of methylated cytosine in mtDNA have recently been reported. DNA methylation is an epigenetic mechanism that occurs by the addition of a methyl group to DNA, thereby often modifying the function of the genes, but may also influence DNA replication. In order to understand whether mtDNA methylation could have an influence on replication (initiation), and thus control perhaps mtDNA copy numbers and downstream functions (e.g. segregation), the aim of this study was set to determine the location of DNMT1 and DNMT3A in the mitochondrial compartments, and to investigate the relationship between DNMT-s and some of the main nucleoid associated proteins (the mitochondrial DNA helicase Twinkle and the mitochondrial transcription factor A (TFAM)). To achieve this, RNAi mediated knock-down of Twinkle and TFAM were performed to test whether expression of the DNMT proteins changes and if this causes changes to a possible methylation pattern.

In the course of the studies it could be demonstrated that the DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3A are detectable in the mitochondrial fractions of HEK293e cells. Their expression slightly changed in response to reduction of proteins levels of either Twinkle or TFAM, thus indicating a possible direct or indirect coordination of their functions.

Analyses of the methylation level of the non-coding region (NCR) of the human mtDNA in TFAM knock-down, Twinkle knock-down and control mtDNA preparations produced average results between 5,5-7% (SEM \pm 1%) for all samples whereby the threshold for positive methylation signals was set to 9,3%. Considering the over-all low methylation signals it was concluded that the NCR of mtDNA from HEK293e cells is not methylated.

Proteinase K protection assays revealed that DNMT1 is associated with the outer mitochondrial membrane while the clearest signals of DNMT3A localised to the intermembrane space. A more detailed localisation analyses of DNMT3A in highly clean preparations of nucleoids showed vicinity but not clear co-localisation with previously described nucleoid fractions (Gerhold et al., 2015; Rajala et al., 2014). The results revealed that both DNMT proteins are by and large physically separated from their potential substrate, the mtDNA, thereby delivering a logical explanation for the absence of detectable CpG methylation patterns. It remains to be shown which specific functions DNMT1 and DNMT3A fulfill in mitochondria.

KIRJANDUSE LOETELU

Aasumets, K. (2015). Mitokondriaalsete DNA-valk komplekside (nukleoidide) koosluse määramiseks vajalike eraldamisskeemide optimeerimine. Tartu Ülikool, Loodus- ja tehnoloogia teaduskond, molekulaar- ja rakubioloogia instituut, geenitehnoloogia õppekava. Tartu. Bakalaureusetöö.

Adams, K. L. ja Palmer, J. D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 380-395.

Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N. ja Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic acids research*, 31(6), 1640-1645.

Bellizzi, D., D'Aquila, P., Scafone, T., Giordano, M., Riso, V., Riccio, A. ja Passarino, G. (2013). The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. *DNA research*, 20(6), 537-547.

Bianchessi, V., Vinci, M. C., Nigro, P., Rizzi, V., Farina, F., Capogrossi, M. C., Pompilio, G., Gualdi, V. ja Lauri, A. (2016). Methylation profiling by bisulfite sequencing analysis of the mtDNA Non-Coding Region in replicative and senescent Endothelial Cells. *Mitochondrion*, 27, 40-47.

Bjornsson, H. T., Sigurdsson, M. I., Fallin, M. D., ...Launer, L. J. (2008). Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *Jama*, 299(24), 2877-2883.

Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic acids research*, 27(8), 1767-1780.

Breitling, L. P., Yang, R., Korn, B., Burwinkel, B. ja Brenner, H. (2011). Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *The American Journal of Human Genetics*, 88(4), 450-457.

Brown, T. A. ja Clayton, D. A. (2002). Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2', 3'-dideoxycytidine. *Nucleic acids research*, 30(9), 2004-2010.

- Byun, H. M. ja Baccarelli, A. A. (2014). Environmental exposure and mitochondrial epigenetics: study design and analytical challenges. *Human genetics*, 133(3), 247-257.
- Canugovi, C., Maynard, S., Bayne, A. C. V., Sykora, P., Tian, J., de Souza-Pinto, N. C., Croteau, D. L. ja Bohr, V. A. (2010). The mitochondrial transcription factor A functions in mitochondrial base excision repair. *DNA repair*, 9(10), 1080-1089.
- Carelli, V., Ross-Cisneros, F. N. ja Sadun, A. A. (2004). Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Progress in retinal and eye research*, 23(1), 53-89.
- Castegna, A., Iacobazzi, V. ja Infantino, V. (2015). The mitochondrial side of epigenetics. *Physiological genomics*, 47(8), 299-307.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125(7), 1241-1252.
- Chen, X. J. ja Butow, R. A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 815-825.
- Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A. ja Butow, R. A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, 307(5710), 714-717.
- Chen, C. C., Wang, K. Y. ja Shen, C. K. J. (2012). The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33116-33121.
- Chestnut, B. A., Chang, Q., Price, A., Lesuisse, C., Wong, M. ja Martin, L. J. (2011). Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *Journal of Neuroscience*, 31(46), 16619-16636.
- Chinnery, P. F., Elliott, H. R., Hudson, G., Samuels, D. C. ja Relton, C. L. (2012). Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *International journal of epidemiology*, dyr232.
- Clayton, D. A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human reproduction*, 15(suppl 2), 11-17.

Cole, L. W. (2016). The evolution of per-cell organelle number. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4.

Coskun, P., Wyrembak, J., Schriener, S. E., Chen, H. W., Marciniack, C., LaFerla, F. ja Wallace, D. C. (2012). A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(5), 553-564.

Dawlaty, M. M., Breiling, A., Le, T., ...Faull, K. F. (2013). Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Developmental cell*, 24(3), 310-323.

Dawlaty, M. M., Breiling, A., Le, T., ...Jaenisch, R. (2014). Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Developmental cell*, 29(1), 102-111.

Dzitoyeva, S., Chen, H. ja Manev, H. (2012). Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria. *Neurobiology of aging*, 33(12), 2881-2891.

Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239.

Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. A., Relton, C. L. ja Chinnery, P. F. (2008). Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *The American journal of human genetics*, 83(2), 254-260.

Feng, S., Cokus, S. J., Zhang, X., ...Ukomadu, C. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8689-8694.

Ferreira, A., Serafim, T. L., Sardão, V. A. ja Cunha-Oliveira, T. (2015). Role of mtDNA-related mitoepigenetic phenomena in cancer. *European journal of clinical investigation*, 45(s1), 44-49.

Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., ...Boix-Chornet, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10604-10609.

Gal-Yam, E. N., Saito, Y., Egger, G. ja Jones, P. A. (2008). Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu. Rev. Med.*, 59, 267-280.

- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Blik, A. M. ja Spelbrink, J. N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Molecular biology of the cell*, 14(4), 1583-1596.
- Gerhold, J. M., Cansiz-Arda, Ş., Löhmus, M., Engberg, O., Reyes, A., van Rennes, H., Sanz, A., Holt, I. J., Cooper, H. M. ja Spelbrink, J. N. (2015). Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure. *Scientific Reports*, 5, 15292.
- Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A. ja Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a011080.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., ...Pinton, P. (2005). Electron transfer between cytochrome c and p66 Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122(2), 221-233.
- Goffart, S., Cooper, H. M., Tynismaa, H., Wanrooij, S., Suomalainen, A. ja Spelbrink, J. N. (2009). Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Human molecular genetics*, 18(2), 328-340.
- Gray, M. W., Burger, G. ja Lang, B. F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome biology*, 2(6), reviews1018-1.
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A. ja Salter, J. D. (2004). Calcium and mitochondria. *FEBS letters*, 567(1), 96-102.
- Handy, D. E., Castro, R. ja Loscalzo, J. (2011). Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation*, 123(19), 2145–2156.
- He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., ...Sun, Y. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303-1307.
- He, J., Cooper, H. M., Reyes, ...Walker, J. E. (2012). Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic acids research*, 40(13), 6109-6121.

- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J. M. ja Spelbrink, J. N. (2014). To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie*, 100, 219-226.
- Hermann, A., Schmitt, S. ja Jeltsch, A. (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31717-31721.
- Holt, I. J. ja Reyes, A. (2012). Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a012971.
- Hong, E. E., Okitsu, C. Y., Smith, A. D. ja Hsieh, C. L. (2013). Regionally specific and genome-wide analyses conclusively demonstrate the absence of CpG methylation in human mitochondrial DNA. *Molecular and cellular biology*, 33(14), 2683-2690.
- Iborra, F. J., Kimura, H. ja Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology*, 2(1), 9.
- Ibrahim, N. G., Burke, J. P. ja Beattie, D. S. (1973). Mitochondrial protein synthesis in vitro is not an artifact. *FEBS letters*, 29(1), 73-76.
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K. I., Utsumi, H., Hamasaki, N. ja Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*, 88(5), 529-535.
- Ikeda, M., Ide, T., Fujino, T., ...Suomalainen, A. (2015). Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. *PloS one*, 10(3), e0119687.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C. ja Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300-1303.
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, ...Jaenisch, R. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nature genetics*, 27(1), 31-39.

- Jaenisch, R. ja Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, 33, 245-254.
- Jang, H. S., Shin, W. J., Lee, J. E. ja Do, J. T. (2017). CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes*, 8(6), 148.
- Jirtle, R. L. ja Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews genetics*, 8(4), 253-262.
- Jones, P. A. ja Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293(5532), 1068-1070.
- Kang, D., Kim, S. H. ja Hamasaki, N. (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, 7(1), 39-44.
- Kasashima, K., Sumitani, M. ja Endo, H. (2011). Human mitochondrial transcription factor A is required for the segregation of mitochondrial DNA in cultured cells. *Experimental cell research*, 317(2), 210-220.
- Kaufman, B. A., Durisic, N., Mativetsky, J. M., Costantino, S., Hancock, M. A., Grutter, P. ja Shoubridge, E. A. (2007). The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Molecular biology of the cell*, 18(9), 3225-3236.
- Kaupilla, T. E., Kaupilla, J. H. ja Larsson, N. G. (2016). Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metabolism*.
- Kennedy, S. R., Salk, J. J., Schmitt, M. W. ja Loeb, L. A. (2013). Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage. *PLoS Genet*, 9(9), e1003794.
- Kietzmann, T., Petry, A., Shvetsova, A., Gerhold, J. M. ja Görlach, A. (2017). The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*.
- Kim, Y. I. (2005). Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. *The Journal of nutrition*, 135(11), 2703-2709.

- Klose, R. J. ja Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences*, 31(2), 89-97.
- Klosin, A., Casas, E., Hidalgo-Carcedo, C., Vavouri, T. ja Lehner, B. (2017). Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. *Science*, 356(6335), 320-323.
- Kohli, R. M. ja Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472-479.
- Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M. ja Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO journal*, 23(12), 2423-2429.
- Kotiadis, V. N., Duchon, M. R. ja Osellame, L. D. (2014). Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(4), 1254–1265.
- Krauss, S. (2001). Mitochondria: Structure and Role in Respiration. *eLS*.
- Kriaucionis, S. ja Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 324(5929), 929-930.
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spähr, H., Falkenberg, M., Larsson, N. G. ja Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13534-13539.
- Lang, B. F., Gray, M. W. ja Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual review of genetics*, 33(1), 351-397.
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A. ja Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of cell science*, 117(13), 2653-2662.
- Li, H., Liu, D., Lu, J. ja Bai, Y. (2012). Physiology and pathophysiology of mitochondrial DNA. In *Advances in Mitochondrial Medicine* (pp. 39-51). Springer Netherlands.
- Liu, B., Du, Q., Chen, L., Fu, G., Li, S., Fu, L., Zhang, X., Ma, C. ja Bin, C. (2016). CpG methylation patterns of human mitochondrial DNA. *Scientific reports*, 6.

- Lung, B., Zemann, A., Madej, M. J., Schuelke, M., Techritz, S., Ruf, S., Bock, R. ja Hüttenhofer, A. (2006). Identification of small non-coding RNAs from mitochondria and chloroplasts. *Nucleic acids research*, 34(14), 3842-3852.
- Lutz, S., Wittig, H., Weisser, H. J. ...Augustin, C. (2000). Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions?. *Forensic science international*, 113(1), 97-101.
- Lynch, M., Koskella, B. ja Schaack, S. (2006). Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science*, 311(5768), 1727-1730.
- Maekawa, M., Taniguchi, T., Higashi, H., Sugimura, H., Sugano, K. ja Kanno, T. (2004). Methylation of mitochondrial DNA is not a useful marker for cancer detection. *Clinical chemistry*, 50(8), 1480-1481.
- Magnusson, J., Orth, M., Lestienne, P. ja Taanman, J. W. (2003). Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Experimental cell research*, 289(1), 133-142.
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M. R., Su, Y. A., Rennert, O. M. ja Chrousos, G. P. (2007). Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(5), 190-198.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. ja Haaf, T. (2000). Embryogenesis: demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769), 501-502.
- McLean, J. R., Cohn, G. L., Brandt, I. K. ja Simpson, M. V. (1958). Incorporation of labeled amino acids into the protein of muscle and liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 233(3), 657-663.
- Morris, K. V. ja Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics*, 15(6), 423-437.
- Nass, S., ja Nass, M. M. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *The Journal of cell biology*, 19(3), 613-629.

- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D ja Bird, A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature genetics*, 23(1), 58-61.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. ja Li, E. (1999). DNA methyltransferases DNMT3A and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.
- Ott, M. ja Herrmann, J. M. (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(6), 767-775.
- Pellegrini, M., Asin-Cayuela, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Larsson, N. G. ja Gustafsson, C. M. (2009). MTERF2 is a nucleoid component in mammalian mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(5), 296-302.
- Pohjoismäki, J. L., Wanrooij, S., Hyvärinen, A. K., Goffart, S., Holt, I. J., Spelbrink, J. N. ja Jacobs, H. T. (2006). Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Nucleic acids research*, 34(20), 5815-5828.
- Pollack, Y., Kasir, J., Shemer, R., Metzger, S. ja Szyf, M. (1984). Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. *Nucleic acids research*, 12(12), 4811-4824.
- Rajala, N., Gerhold, J. M., Martinsson, P., Klymov, A. ja Spelbrink, J. N. (2014). Replication factors transiently associate with mtDNA at the mitochondrial inner membrane to facilitate replication. *Nucleic acids research*, 42(2), 952-967.
- Rebelo, A. P., Williams, S. L. ja Moraes, C. T. (2009). In vivo methylation of mtDNA reveals the dynamics of protein–mtDNA interactions. *Nucleic acids research*, gkp727.
- Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., ...Jones, H. A. (2013). A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet*, 9(6), e1003572.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*, 283(5407), 1488-1493.

- Schaefer, M. ja Lyko, F. (2010). Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*, 119(1), 35-40.
- Schaefer, A. M., McFarland, R., Blakely, E. L., He, L., Whittaker, R. G., Taylor, R. W., Chinnery, P. F. ja Turnbull, D. M. (2008). Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Annals of neurology*, 63(1), 35-39.
- Schiesser, S., Hackner, B., Pfaffeneder, T., Müller, M., Hagemeyer, C., Truss, M. ja Carell, T. (2012). Mechanism and Stem-Cell Activity of 5-Carboxycytosine Decarboxylation Determined by Isotope Tracing. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(26), 6516-6520.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. ja Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal*, 16(8), 869-871.
- Shock, L. S., Thakkar, P. V., Peterson, E. J., Moran, R. G. ja Taylor, S. M. (2011). DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3630-3635.
- Shmookler Reis, R.J. ja Goldstein, S. (1983). Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. Genome number, integrity, and methylation. *The Journal of biological chemistry*, 258(15), 9078-9085.
- Sondheimer, N., Glatz, C. E., Tirone, J. E., Deardorff, M. A., Krieger, A. M. ja Hakonarson, H. (2011). Neutral mitochondrial heteroplasmy and the influence of aging. *Human molecular genetics*, 20(8), 1653-1659.
- Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., ...Santoro, L. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature genetics*, 28(3), 223-231.
- Spelbrink, J. N. (2010). Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB life*, 62(1), 19-32.
- Sripada, L., Tomar, D. ja Singh, R. (2012). Mitochondria: one of the destinations of miRNAs. *Mitochondrion*, 12(6), 593-599.

- Stroud, H., Feng, S., Kinney, S. M., Pradhan, S. ja Jacobsen, S. E. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome biology*, 12(6), R54.
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H. ja Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of DNMT3A and Dnmt3b through a direct interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27816-27823.
- Sun, Z., Terragni, J., Borgaro, J. G., ...Pradhan, S. (2013). High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mouse embryonic stem cells. *Cell reports*, 3(2), 567-576.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., ...Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935.
- Taylor, S. W., Fahy, E., Zhang, B., ... Ghosh, S. S. (2003). Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nature biotechnology*, 21(3), 281-286.
- Tsutsui, H., Kinugawa, S. ja Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(6), H2181-H2190.
- Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Holt, I. J. ja Suomalainen, A. (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Human molecular genetics*, 13(24), 3219-3227.
- Valle, I., Álvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S. ja Monsalve, M. (2005). PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research*, 66(3), 562-573.
- Van Oven, M. ja Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*, 30(2), E386-E394.
- Wang, W. X., Visavadiya, N. P., Pandya, J. D., Nelson, P. T., Sullivan, P. G. ja Springer, J. E. (2015). Mitochondria-associated microRNAs in rat hippocampus following traumatic brain injury. *Experimental neurology*, 265, 84-93.

- Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *Journal of Biological Chemistry*, 283(20), 13501-13505.
- Wong, M., Gertz, B., Chestnut, B. A. ja Martin, L. J. (2013). Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7.
- Wortmann, S. B., Vaz, F. M., Gardeitchik, T., ...Rodenburg, R. J. (2012). Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nature genetics*, 44(7), 797-802.
- Zeilinger, S., Kühnel, B., Klopp, N., ...Strauch, K. (2013). Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PloS one*, 8(5), e63812.
- Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh, M. Y. ja Zorova, L. D. (1997). Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Bioscience reports*, 17(6), 507-520.

LISAD

Lisa 1

Väljavõtte laboris kasutatavast mitokondriaalse valgu atsetoon-sadestamise protokollist

Acetone Precipitation

[Modified from the protocol posted by the Nevada Proteomics Center]

http://www.unr.edu/inbre/Proteomics/Acetone_Precipitation_Protocol.html

- 1) Prepare 80% acetone solution and store at -20°C in a brown bottle
 - 100% acetone solution at -20°C for taking.
- 2) Add 1 volume of T₁₀E_{0.1} to the sample extract.
- 3) Add 3 volumes chilled acetone to the sample extract. **Vortex well.**
- 4) Incubate tube 30 min or overnight at -20 °C. (The tubes can be left up to 1 week with minimal protein degradation or modification).
- 5) Centrifuge at top speed (at least >12,000x g), 4 °C for 10-20 min or for larger tubes, centrifuge at >8,000x g, 4 °C for 10 min. Remove tubes from the centrifuge as soon as it stopped.
 - I usually centrifuge for 20 min at 19 000x g, 4 °C.
- 6) Gently dump off the supernatant.
- 7) Positioning the tube same as before (pellet should towards the outer wall of the rotor), microfuge briefly to bring any remaining liquid to the bottom of the tube.
- 8) Pipet off the remaining sup, making sure no visible liquid is left behind.
- 9) Wash the pellet with 1 ml (microfuge tubes) or 10 ml (larger tubes) chilled acetone/milliQ. The pellet needs to be thoroughly broken up with a glass rod.
- 10) Repeat steps #5-8.
- 11) Repeat wash 1 more time (steps #9-10).
- 12) Air dry the pellet for 5 min. Do not over dry the pellet or it will be difficult to resuspend.
- 13) Resuspend pellet as described below. (You can freeze the pellets at -80 °C until resuspension step.)
 - I usually take up the pellet in 1X SDS loading buffer (approx. 30 µl to make sure everything goes onto gel) and boil 5 min 95 °C.

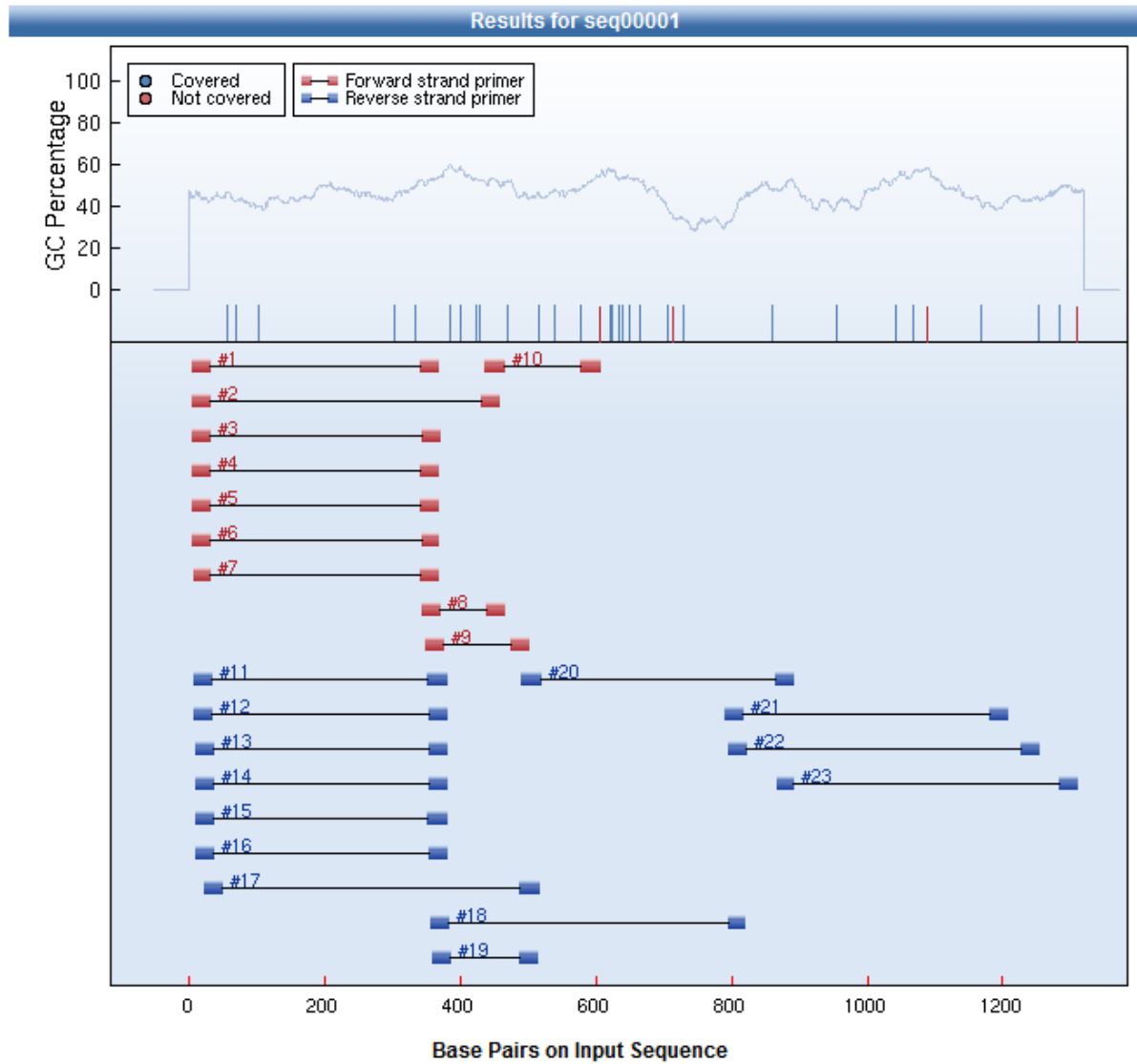
Lisa 2

Väljavõtte laboris kasutatavast mtDNA eraldamise, ekstraheerimise ja sadestamise protokollist

mtDNA isolation, extraction and precipitation [Modified from the protocols posted by (Gaines & Attardi, 1984 MCB, 1605–1617) and (Rajala *et al*, 2014)]

1. Crude mitochondrial preparation (small plates), if necessary measure protein content
2. Take up mitochondria in DNA extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA pH 8.0, 75 mM NaCl)
3. Add SDS to final concentration of 1%
4. Add RNAase A – final concentration 100 µg/ml (10 mg/ml stock at -20 °C)
5. Incubate for 1 h at 37 °C
6. Add 200 µg of Proteinase K (20 mg/ml stock at -20°C)
7. Incubate for 30 min at 37°C
8. Add 1 volume of T10E0.1 buffer
9. Start with phenol-chloroform extraction by adding 1 volume of phenol-chloroform pH 7.5. NB! Work under fume hood!
10. Invert tubes until the mixture is completely whitish
11. Centrifuge for 5 min at 3000g (Eppendorf™ MiniSpin™ Microcentrifuge)
12. Transfer aqueous phase into new tube, do not interrupt the interphase!
13. If the aqueous phase is not clear, repeat extraction with phenol-chloroform
14. After obtaining a clear aqueous phase, add 2.5 volumes of 96% ethanol, mix solution by inverting the tube and leave over night at -20°C
15. Take the solution out of -20°C, leave it for approx. 5 min at RT
16. Start with centrifugation at 14 000 g for 10 min (doesn't have to be cooled down centrifuge)
17. Carefully remove supernatant and add 500 µl of 80% ethanol (v/v), invert tube
18. Centrifuge 2-5 min at 14 000 g
19. Remove supernatant (be careful with pellet) and take up in 20 µl of 10 mM Tris pH 7.5 or ddH₂O, leave it approx. for 30 min at RT, occasionally flick the tube and quick-spin your sample(s)
20. Prior to freezing, aliquot your DNA into suitable portions if necessary, then store samples/aliquots at -80°C

Lisa 3



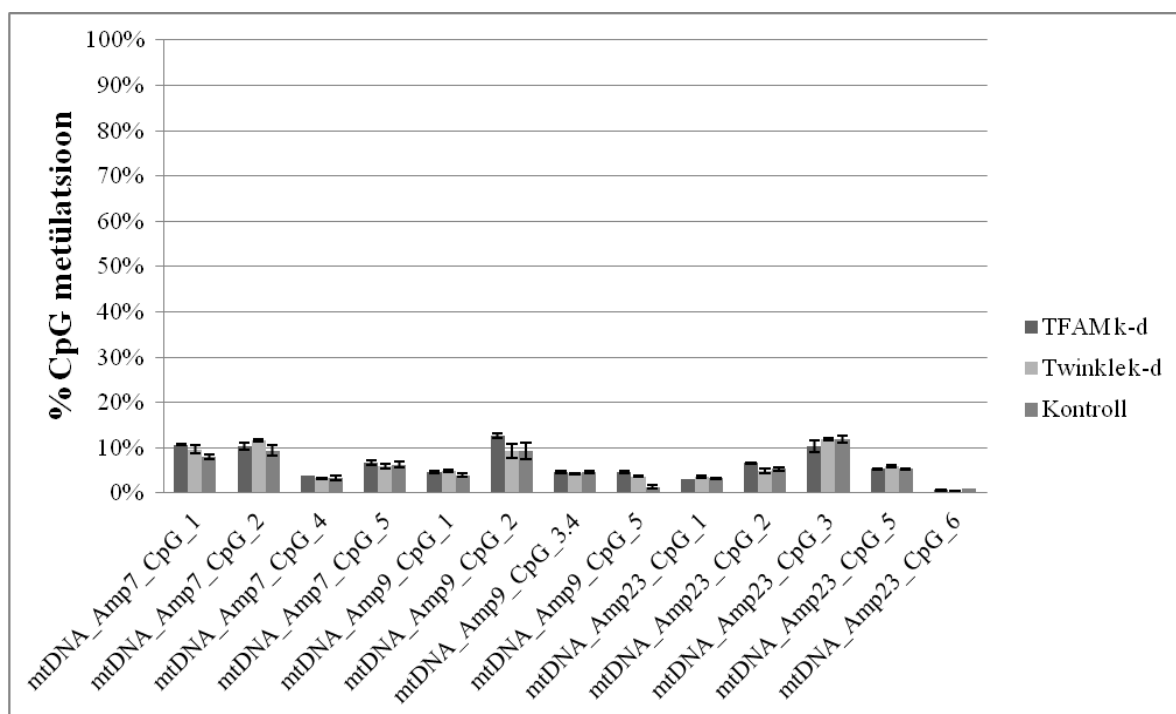
Joonis 1. Väljavõte SEQUENOM EpiTYPER programmi poolt genereeritud praimeritega ja nendele vastavate ampliconidega mtDNA NCR CpG metülatsiooni analüüsimise jaoks.

Lisa 4

Tabel 1. Käesolevas töös EpiTYPER meetodi jaoks kasutatud praimerid.

Praimeri nimi	Seondumiskoht	Järjestus (5'→3')
000_seq00001_007_10F	mtDNA NCR, amplikon 7	aggaagagagGGATGATTTTTT TTAGATAGGGGTTT
000_seq00001_007_T7R	mtDNA NCR, amplikon 7	cagtaatacgactcactataggagaagg ctAATTCACTTTAACTACCC CCAAATA
000_seq00001_009_10F	mtDNA NCR, amplikon 9	aggaagagagTATAATATTTGG GGGTAGTTAAAGTGAA
000_seq00001_009_T7R	mtDNA NCR, amplikon 9	cagtaatacgactcactataggagaagg ctAAAATACCAAATACATA AAAAACTCCC
000_seq00001_020_10F	mtDNA NCR, amplikon 20	aggaagagagGGATTAAATTT ATTTGTTTATGGGG
000_seq00001_020_T7R	mtDNA NCR, amplikon 20	cagtaatacgactcactataggagaagg ctAAATATCTACACAACCA CTTCCACA
000_seq00001_023_10F	mtDNA NCR, amplikon 23	aggaagagagTGTTTGATGTTT GTTTTTTTTGAT
000_seq00001_023_T7R	mtDNA NCR, amplikon 23	cagtaatacgactcactataggagaagg ctAACCACAACACTTAAAC ACATCTCTA

Lisa 5



Joonis 2. TFAM *knock-down*, Twinkle *knock-down* ja kontrollrakkudest eraldatud mtDNA iga NCR piirkonna CpG positsiooni keskmine metülatsiooni osakaal. TFAM k-d – TFAM *knock-down*; Twinkle k-d – Twinkle *knock-down*; Kontroll – transfekteeimata HEK239e rakud.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Julija Bolšakova (01.12.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Mitokondriaalsed DNA metüültransferaasid kui potentsiaalsed mitokondriaalse nukleoidiga assotsieerunud valgud ja nende roll mtDNA säilitamises**”, mille juhendaja on Joachim Matthias Gerhold,
 - 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 alates **31.01.2022** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et 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