

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

**Valgu Sra mõju mtDNA topoloogiale ja katabolismile indutseeritud mtDNA stressi  
tingimustes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Mirjam Reino

Juhendaja kaasprofessor Priit Jõers

TARTU 2021

# Valgu Sra mõju mtDNA topoloogiale ja katabolismile indutseeritud mtDNA stressi tingimustes

Bakalaureusetöö

Mirjam Reino

**Lühikokkuvõte.** Mitokondrid reguleerivad raku energia- ja ainevahetust. Kuigi siiani on peetud mitokondritega seotud haiguste põhjuseks OXPHOS häireid, on meie uurimisgrupp leidnud seoseid mitokondriaalse DNA stressi ning metaboolsete muudatuste vahel, mis ei ole põhjustatud OXPHOS-i defektide poolt. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selgitada, kuidas valk Sra mõjutab mtDNA topoloogiat ja katabolismi antud stressisüsteemi kontekstis. Tulemustest selgus, et Sra koguse vähendamine *Drosophila melanogaster*'is mõjutab lipogeneesi ning põhjustab suurenenud mtDNA fragmenteeritust, eriti mittekodeeriva ala lähedal.

CERCS teaduseriala kood: P320 nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees; P310 proteiinid, ensümoloogia; B220 geneetika, tsütogeneetika

Märksõnad: Sra, ECH1, EcoBI, atsetülatsioon, mtDNA, *Drosophila*, katabolism, topoloogia

## The effects of Sra on mtDNA's topology and catabolism due to mitochondrial stress

Bachelor's thesis

Mirjam Reino

**Abstract.** Mitochondria regulate the energy exchange and metabolism of the cell. Although it has been thought that the main cause for mitochondrial diseases is in the ATP production mechanism, our research group has found connections between stress in mtDNA and metabolic changes that did not lead to defects in OXPHOS. The aim of this thesis was to find how Sra changes mitochondrial DNA topology and catabolism. The results showed that the decreased amount of Sra in *Drosophila* altered lipogenesis and caused fragmentation in mtDNA, especially near the non-coding region.

CERCS research specialization: P320 synthesis of nucleic acids and proteins; P310 proteins, enzymology; B220 genetics, cytogenetics

Keywords: Sra, ECH1, EcoBI, acetylation, mtDNA, *Drosophila*, catabolism, topology

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b> .....	<b>3</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>7</b>
1.1. Mitokonder.....	7
1.2. Mitokondrite struktuur ja morfoloogia.....	7
1.3. Mitokondri funktsioonid .....	9
1.3.1. ATP tootmine mitokondrisse.....	9
1.3.2. Teised funktsioonid .....	11
1.4. mtDNA.....	13
1.4.1. Suurus ja struktuur .....	13
1.4.2. mtDNA nukleoidid .....	16
1.5. Mitokondriaalsed haigused.....	17
1.6. Sra .....	19
<b>2. MEIE UURIMISGRUPI EELNEVAD TULEMUSED</b> .....	<b>20</b>
2.1. mtEcoBI-ga mtDNA stress tekitamine.....	20
2.2. mtDNA stressi põhjustatud muutused metabolismil.....	21
2.2. MtDNA stress indutseerib Sarah üleekspressiooni .....	22
2.3. Sra mõju metabolismile.....	22
<b>3. EKSPERIMENTAALOSA</b> .....	<b>23</b>
3.1. Töö eesmärgid .....	23
3.2. Materjal ja meetodika .....	23
3.2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'i käsitlemine .....	23
3.2.2. mtDNA eraldamine .....	25
3.2.3. Southern blot ja hübriidiseerimine.....	26
3.2.4. CCE1 lõikus .....	27
3.2.5. Western blot.....	27
3.2.6. Statistiline analüüs .....	29
3.3. Tulemused .....	29
3.3.1 ACC ja AcK kvantifitseerimine .....	29

3.3.2. mtDNA topologia muutused mtEcoBI ekspressiooni ja Sra KD korral.....	34
3.4. Arutelu.....	39
<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>44</b>
<b>Tänuõnad .....</b>	<b>46</b>
<b>Kasutatud kirjandus.....</b>	<b>47</b>
<b>LISAD.....</b>	<b>54</b>
Lisa 1. Ristamiskeemid .....	54
<b>Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....</b>	<b>55</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

**ACC** – AcCoA karboksülaas (ingl k *Acetyl-CoA carboxylase*)

**AcCoA** – atsetaadi aktiivne vorm (ingl k *Acetyl-CoA*)

**AcK** – atsetüleeritud lüsiin (ingl k *acetylated lysine*)

**CPT-1** - karnitiini palmitoüültransferaas

**LHON** - mitokondriaalsetest vigadest põhjustatud haigus (ingl k *Leber's hereditary optic neuropathy*)

**MQ vesi** – puhas vesi, mis on puhastatud Millipore Milli-Q süsteeme kasutades, tagatud 18,2 megaoomiline ioonpuhtus

**NCR** – mittekodeeriv ala (ing k *noncoding region*)

**OXPHOS** – oksüdatiivne fosforülatsioon (ingl.k. *oxidative phosphorylation*)

**POLG1** – polümeraasi  $\gamma$  holoensüüm, mis sisaldab katalüütilist alaühikut

**POLG2** - polümeraasi  $\gamma$  holoensüüm, mis sisaldab protsessiivsuse alaühikut

**RITOLS** – (ingl k *transient RNA incorporation throughout the lagging strand*)

**RNAi** – RNA sekkumine, posttranslatsiooniline geenivaigistus

**ROS** – reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)

**RU486** – sünteeriline steroid, progesterooni analoog

**Sra KD** - sarah RNAi ekspresseeriva kasset ristatud kokku tubGS>mtEcoBI tüvega

**SSC**– (ingl k *saline sodium citrate*)

**TAG** - triatsüülgütserool

**TCA** – tsitraaditsükkel (ingl.k. *tricarboxylic acid cycle*)

**TFAM** – mitokondriaalne transkriptsiooni faktor A (ingl.k. *mitochondrial transcription factor A*)

**UAS** – ülespoole aktiveeriv järjestus (ingl.k. *upstream activating sequence*)

## SISSEJUHATUS

Mitokonder on rakuorganell, millel on oluline roll raku energia- ja ainevahetuses. Peamiselt peetakse selle kõige olulisemaks rolliks ATP tootmist, kuid tal on ka mitmeid teisi funktsioone, näiteks rakustressi taseme kontrollimine ning metabolismi regulatsioon.

Mitokondritega seostatud haigused on väga varieeruvad, ajalooliselt on peetud nende tekkepõhjusteks OXPHOS häireid (Zeviani, Spinazzola ja Carelli, 2003). Aina rohkem on aga fookusesse tõusnud mitokondrite roll metabolismi regulatsioonis, mis läbi on leitud mitokondrite seoseid erinevate kataboolsete ja anaboolsete reaktsioonide vahel (Frezza, 2017). Sellisteks reaktsioonideks on näiteks mitmete aminohapete biosüntees, mis muuhulgas osalevad raku homöostaasi reguleerimisel muuhulgas läbi posttranslatsiooniliste modifikatsioonide, millest levinuim on atsetülatsioon. Näiteks on mitokondreid seostatud II tüüpi diabeediga (Wallace, 1999). See annab alust oletada, et mitokondriaalsed haigused pole seotud vaid OXPHOS häirete, vaid ka metaboolse paindlikkuse kadumisega.

Meie uurimisgrupi eelneva töö tulemusena on leitud, et mitokondriaalse DNA manipuleerimine *Drosophila*'s viib ühe valguga, Sra, üleekspressioonini. Seetõttu uuriti käesolevas bakalaureusetöös seoseid Sra ja metabolismi ning mtDNA topoloogia vahel mtDNA stressi tingimustes, mille indutseerimiseks häiriti mudelorganismina kasutatava *Drosophila* mitokondriaalset homöostaasi *in vivo* bakteriaalse endonukleaasiga. Selle tulemusena on toimunud metaboolse paindlikkuse kadu, mis seisneb rasvade eelistamises suhkrutele, kuid millega ei kaasne mitokondri hingamisahela defekti (Bahhir, 2019). Tulemustest selgus, et Sra mõjutab *Drosophila*'s lipogeneesi ning kaitseb mtDNA fragmenteerumise eest, eriti mittekodeeriva ala lähedal.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Mitokonder

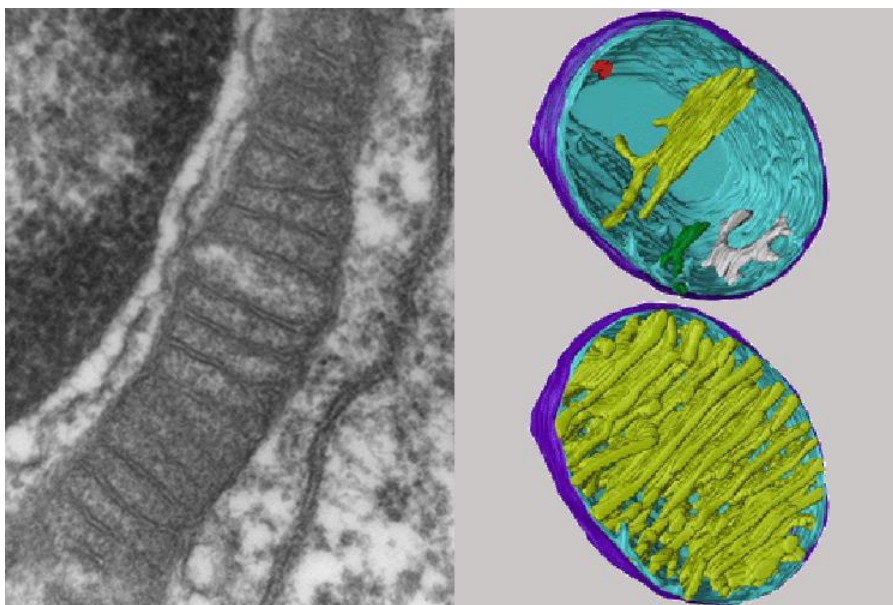
Mitokondrid on organellid, mis pärinevad eukarüoodi ja alfa-proteobakteri eellase sümbioosist assotsiatsioonist umbes kaks miljardit aastat tagasi, mistõttu on nad laialt levinud nii loomades kui ka taimedes (Feng, Cho ja Doolittle, 1997; Blackstone, 2016; Hosp jt., 2017). Nende enimtuntud funktsioon on rakkudele ATP tootmine liikumise ja kasvu jaoks (Hosp jt., 2017). Peale selle funktsiooni on mitokondritel veel terve hulk teisi rolle raku metabolismis, mistõttu häired nende organellide funktsioonis võivad negatiivselt mõjutada raku erinevaid funktsioone (Su jt., 2021). Eukarüootsetel rakkudel on väga varieeruv kogus mitokondreid raku kohta, mis oleneb suuresti raku energiavajadusest (Shadel ja Clayton, 1997). Mitokondrite funktsioone uuritakse pidevalt ning seeläbi laienevad meie teadmised nende kohta pidevalt.

## 1.2. Mitokondrite struktuur ja morfoloogia

Mitokondrid tekkisid umbes 1,5 miljardi aastat tagasi glükolüütilise proto-eukarüootse raku ja oksüdatiivse bakteri sümbioosse assotsiatsiooni teel (Wallace, 1999). Kunagise vabalt elava organismi genoomist on säilinud väike, ca 15-20 aluspaari pikkune mitokondriaalne DNA (mtDNA). Erinevates rakutüüpides on nad erineva suuruse ning rakusisese paigutusega (Inagaki jt., 1992; Arbustini jt., 1998; Wallace, 1999). Kui varasemalt arvati, et mitokondrid on staatilised struktuurid, on tänaseks tänu elusrakkude mikroskoopiale välja selgitatud, et mitokondrid moodustavad rakus võrgustiku, milles toimub pidev liitumine ja lahknemine. Sellised morfoloogilised muutused on tihedalt seotud ka teiste mitokondri funktsioonidega. (Westermann, 2010) Neil on oma geneetiline süsteem, mis erineb nii nende bakteriaalsete esivanemate kui ka eukarüootide omast (Kühlbrandt, 2015).

Kuna mitokondrid on pidevas muutumises, võivad nad varieeruda erinevate kujutüüpide vahel (oakujulised, piklikud, ussikujulised) üpris kiiresti (Yaffe, 1999). Migreerumisele pikema vahemaa taha, näiteks mööda aksonit, vajavad mitokondrid mikrotoubuleid ning mootorvalke kinesiini ning düneiini (Pizzo ja Pozzan, 2007). Uuringutest pärmirakkudega on selgunud, et valgud Mdm1, Mdm10, Mmm1 ning Mdm12 mängivad mitokondrite kuju väljakujunemisel olulist rolli. Mdm1 on intermediaarse filamendi laadne valk, mis meenutab tsütoskeleti karkassi koostist, ning Mdm10, Mmm1, Mdm12 on välimise membraani valgud. Mdm1 funktsiooni kadu viib mitokondriaalsete tuubulite fragmenteerumiseni ning Mdm10, Mmm1 või Mdm12 kadu hävitab mitokondrite tubulaarse võrgustiku, mistõttu mitokondrid vajub kokku kerakujuliseks. (Yaffe, 1999)

Mitokonder koosneb kahest membraanist, millede keskel asub maatriks, mis sisaldab erinevaid ensüüme ja mitokondriaalset DNA-d (mtDNA), mis esineb mitmes korduses ning kodeerib membraanisisesid valke (Frey ja Mannella 2000; Kühlbrandt 2015). Välismembraanil asetsevad poriinid ehk poore moodustavad valgukompleksid, mis võimaldavad membraani läbida ioonidel ning kuni 5 kDa suurustel molekulidel (Yaffe, 1999; Alberts jt., 2015). Suuremad molekulid transporditakse membraansete translokaaside abil (Kühlbrandt, 2015). Sisemisest membraanist moodustuvad kristad, mis on kurrud, millel on torukujulised ühendused sisemembraani perifeerse pinnaga ning teiste kristadega (vt joonis 1) (Frey ja Mannella 2000). Kristade membraanil asetsevad muude valkude ja komplekside hulgas ka elektronide transpordiahela ning ATP süntaasi kompleksid. Nende luumen sisaldab paljusid väikseid tsütokroom C elektronide kandjavalke, mis teeb kristadest põhilise energia konverteerimiskoha mitte-fotosünteesivates eukarüootides. (Kühlbrandt 2015) Kui välisel membraanil poorsuse tõttu membraanipotsentsiaal puudub, siis sisemine membraan toimib tõhusalt ionide ja molekulide difusioonibarjäärina, lastes läbi ainult spetsiifilistele transportvalkudele seondunud ioonid ja molekulid. Sisemise membraani ning maatriksi vahel tekib transmembraanne elektrokeemiline gradient, mis võimaldab ATP sünteesi toimumist kristades (Kühlbrandt 2015).



Joonis 1. Mitokondri struktuur. Vasakul elektronmikroskoopia pilt, paremal elektrontomograafia pilt, millel helesinise näha kristad, helesinise sisemine membraan, lillaga välimine membraan, punase, valge ja tumehelise on eraldiseisvad kristad. (Frey ja Mannella, 2000)

### 1.3. Mitokondri funktsioonid

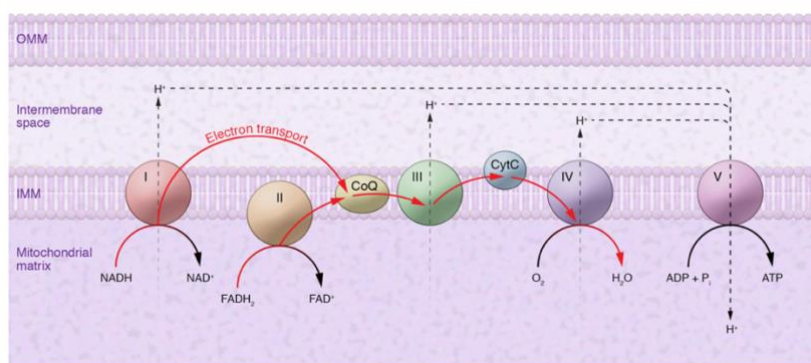
Mitokondrid on ajalooliselt tuntud oma rolli poolest süsiniku katabolismil tänu maatriksis toimuvale TCA tsüklile ning OXPHOS-le, kuid nad on hädavajalikud ka näiteks raud-väävel klastrite ja neuronite heemi biosünteesis, katalüütilistes ja reguleerivates protsessides ning kaltsiumioonide signaalide kontrollimisel jpm (Stehling ja Lill, 2013; Kühlbrandt, 2015; Bahhir jt., 2019; Wang jt., 2020). Mitokondrid osalevad ka apoptoosi ning rakustressi taseme reguleerimises ning neil on oluline roll pärilike haiguste avaldumises, organismi arengus ning metabolismi regulatsioonis (Shaw ja Nunnari, 2002; Westermann, 2010). On leitud seosed mitokondrite ja erinevate kataboolsete ning anaboolsete reaktsioonide vahel. Sellisteks reaktsioonideks on näiteks TCA tsükkel, rasvhapete  $\beta$ -oksüdatsioon ning erinevate metaboliitide, näiteks seriin, 2-oksoglutaraat, atsetüül-Co-A ning mitmed aminohapped, biosüntees. (Westermann, 2010; Martinez ja Hausinger, 2015; Frezza, 2017; Bahhir jt., 2019) Eelnimetatute roll signaalmolekulidena, mis osalevad raku homöostaasi reguleerimisel läbi nukleiinhapete epigeneetiliste ja valkude posttranslatsiooniliste modifikatsioonide, on viimasel ajal aina rohkem tähelepanu pälvinud, sest see näitab nende rolli ka kromatiini struktuuri ja funktsiooni reguleerimisel ning metabolismis (Frezza, 2017). Näiteks on seriin üks peamistest metüülrühma doonoritest ühesüsinikulises metabolismis ning 2-oksoglutaraadi taseme muutused võivad põhjustada metülatsiooni muutuseid (Zeviani, Spinazzola ja Carelli, 2003).

#### 1.3.1. ATP tootmine mitokondrisse

Pea iga endergooniline reaktsioon, mis rakkudes toimub, võib toimuda tänu samaaegsele ATP hüdrolyüsile (Koopman jt., 2013). ATP tootmine mitokondrites toimub läbi protsessi, mida nimetatakse oksüdatiivseks fosforüleerimiseks ehk OXPHOS-iks. See toimub mitokondrite sisemisel membraanil hingamisahela valgukomplekside abil, mis loovad elektrokeemilise gradiendi. (Kühlbrandt, 2015) Selleks vajalik energia tuleb kolmest põhilise süsinikuallika oksüdeerimisest: monosahhariidid (enamasti glükoos, aga ka fruktoos ning galaktoos), aminohapped ja rasvhapped. Tsütosooli jõudnud glükoosist oksüdeeritakse glükolüüsi käigus püruvaat. Selles protsessis osaleb oksüdeerijana ka  $\text{NAD}^+$  (nikotiinamiid adeniin dinukleotiid), mis seob kaks elektroni ja vesinikaatomi ning tekib redutseeritud vorm NADH. Järgmise sammuna siseneb püruvaat tsütoplasmast mitokondritesse, kus talt eemaldatakse karboksüülrühm ning tekib AcCoA (atsetüülkoensüüm-A). Selle reaktsiooni käigus vabaneb üks süsinik  $\text{CO}_2$  kujul ja NADH. Järgmiseks oksüdeeritakse AcCoA TCA tsükli ensüümide poolt, mis toodab kaks molekuli  $\text{CO}_2$ , kolm molekuli NADH ning ühe molekuli flaviin adeniin

dinukleotiidi ( $\text{FADH}_2$ ) ja GTP-d. NADH ning  $\text{FADH}_2$  on substraatideks OXPHOS-ile. (Koopman jt., 2013)

Elektronide transportahela kompleksid I, III, IV koosnevad nii mtDNA kui ka tuuma DNA poolt kodeeritud alaühikutest, samas II kompleks sisaldab vaid tuuma DNA pealt kodeeritud alaühikuid (Orth ja Schapira, 2001). Elektronid, mida kannab NADH, kantakse üle kompleks I-le (NADH dehüdrogenaas) ning seejärel koensüüm Q10-le ning elektronid suktsinaadilt TCA tsüklist kantakse üle kompleks II-le (suktsinaadi dehüdrogenaas, moodustub  $\text{FADH}_2$ ) ning koensüüm Q10-le. Viimaselt kantakse elektronid üle kompleks III-le, seejärel tsütokroom c-le ning seejärel kompleks IV-le (vt joonis 2) (Wallace, 1999). Kompleks IV-lt suunatakse NADH ja  $\text{FADH}_2$ -lt saadud elektronid hapnikule, mille käigus liituvad prootonid ja moodustub vesi (Orth ja Schapira, 2001). Elektronide transportahela ensüümid konverteerivad NADH ja  $\text{FADH}_2$  saadud oksüdatsioonenergia prootongradiendiks, mida kasutatakse ATP tootmiseks ATP süntaasi abil (Koopman jt., 2013). Kuna nendes etappides liiguvad elektronid aina madalamale energeetilisele tasemele, siis selle käigus eraldub energiat, mille arvelt saab pumbata prootoneid ehk teha tööd. Prootongradienti kasutatakse töö tegemiseks, et genereerida ADP-st ja vabast fosfaatrühmast ATP. (Orth ja Schapira, 2001) ATP-d sünteesitakse ADP-st ja fosfaatioonidest ning ühe ATP süntaasi täispöördega suudetakse sünteesida 3 ATP molekuli (Hüttemann jt., 2012; Kühlbrandt, 2015).



Joonis 2. Lihtsustatud mudel aeroobsest energia tootmisest mitokondrites. Joonis kohandatud (Area-Gomez jt., 2019) põhjal.

Elektronide liikumise käigus võib näiteks stressi tõttu esineda kõrvalekaldeid hingamisahela korrektsest tööst, mille käigus osa elektrone liiguvad otse hapnikule enne kompleks IV aktiivtsentrit, mitte ühelt elektronkandjalt teisele (Hüttemann jt., 2012; Zhao jt., 2019). Selle tulemusena tekivad ROS-id ehk reaktiivsed hapnikuühendid. Sellised kõrvalekalded juhtuvad 0,2-2% kõikide elektroni transportahela elektronidega, moodustades kas superoksiide või vesinikperoksiidi. Need molekulid on väga reaktiivsed, reageerides paljude erinevate rakukomponentidega, mis bioloogilises kontekstis on ühemõtteliselt negatiivsed. (Zhao jt.,

2019) Kroonilised ROS-iga kokkupuuted võivad viia mitokondrite ja rakuvalkude ja -lipiidide oksüdatiivsete kahjustusteni, põhjustada rakukahjustusi ning viia rakusurma (Wallace, 1999; Hüttemann jt., 2012). Akuutne ROS-idega kokkupuude võib inaktiveerida raud-väävel klastreid elektronide transpordiahela I, II ning III kompleksis ning TCA tsükli akonitaasi. Need muudatused võivad viia mitokondriaalse energia tootmise seiskumiseni. (Wallace, 1999) Siiski on leitud, et teatud limiteeritud hulgal on ROS-ide tootmine on rakule vajalik, sest need käituvad ka signaalmolekulidena. Näiteks on ROS-id oksüdatiivsed modifitseerijad retseptoritele, kinaasidele, fosfataasidele, kaspasidele, ioonkanalisele ning transkriptsioonifaktoritele, mis aitab muuhulgas kaasa rakkude proliferatsioonile. (Zhao jt., 2019)

### **1.3.2. Teised funktsioonid**

Nagu eespool mainitud, on lisaks OXPHOS-ile mitokondritel kindlaks tehtud ka hulgaliselt teisi rolle. Näiteks on mitokondritel roll apoptoosis ja rakulises stressis, nad reguleerivad rakulise kaltsiumi homöostaasi, rakusurma ning on hädavajalikud raud-väävel klastrite ning neuronite heemi biosünteesis (Shaw ja Nunnari, 2002; Lee ja Tian, 2015; Wang jt., 2020).

Üks olulistest metaboolsetest radadest mitokondris on TCA tsükkel. Kuigi TCA tsükli teatakse enamjaolt selle olulisuse tõttu energia metabolismil ning NADH generatsioonil on sellel tsükli oluline osa ka unikaalsete signaalmolekulide funktsioonis (Frezza, 2017). TCA tsükli energiaallikaks on AcCoA, mis on erinevate metaboolsete radade ristumispunktiks. Kuivõrd eelnevalt räägiti süsivesikutest, rasvadest ning valkudest energiaallikana, siis saab AcCoA-d genereerida rasvhapete  $\beta$ -oksüdatsioonil, süsivesikute katabolismi käigus tekkinud püruvaadist ning leutsiini, isoleutsiini ja trüptofaani degradeerumisel. AcCoA kasutatakse ehituskivina lipiidide, ketokehade, aminohapete ning kolesterooli biosünteesis, samuti kasutatakse seda substraadiks lüsiini atsetülatsioonil, mis on üks levinuimaid üle 20-st erinevast post-translatoorsest modifikatsioonist antud positsioonis. (Menzies jt., 2016) Neist levinuim on atsetüleerimine, mida seostatakse AcCoA ringluse suurenemisega (Hosp jt., 2017). Lüsiinide atsetülatsiooni kontrollitakse kahe grupi ensüümide poolt: lüsiini atsetültransferaaside ning lüsiini deatsetülaaside poolt (Menzies jt., 2016). Lüsiini deatsetüleeritust reguleerivad sirtuiinid on  $\text{NAD}^+$ -sõltuvad, neil on oluline roll rakkude metabolismis ning erinevate haiguste, nt diabeedi kujundamisel (Preyat ja Leo 2013). Imetajates on leitud seitse erinevat sirtuiini (SIRT1-7), millest SIRT3-5 leiduvad vaid mitokondrites (Sebastián jt., 2012). Sirtuiin 3 (SIRT3) on seostatud lisaks lüsiini deatsetüleerimisega ka elektronide transpordiahela komplekside I ja II ning AcCoA süntaasi aktiveerimisega ja see aitab parandada glükoosi

homöostaasi, rasvade metabolismi ning ketokehade tootmist (Schwer jt., 2006; Ahn jt., 2008; Menzies jt., 2016).

Tsitraat aktiveerib AcCoA karboksülaasi, mis on esimene samm rasvhapete sünteesis, ning inhibeerib karnitiini palmitoüültransferaasi 1 (CPT-1) poolt katalüüsitud rasvhapete mitokondrilise transpordi, seega viitab suurenenud tsitraaditase anaboolse metabolismi taseme tõusule. (Saddik jt., 1993; Frezza, 2017)

ACC ehk atsetüülkoensüüm-A-karboksülaas on rasvade sünteesis võtmeensüüm, katalüüsides AcCoA karboksüleerimist malonüül-CoA-ks (Saddik jt., 1993), samuti seostatakse ACC-d mitokondriaalsete rasvhapete  $\beta$ -oksüdatsiooniga, kus ta inhibeerib CPT-1 tema produkti, malonüül-CoA, kaudu (Abu-Elheiga jt., 2000). ACC ekspressiooni reguleerib SREBP (ingl *sterol regulatory element binding protein*), mida on seostatud ka glükoosi metabolismiga (Ren jt., 2018). SREBP on hulgaliselt esindatud lipogeensetes kudedes ning selle transkriptsiooni indutseerib insuliin, mis stimuleerib AMPK fosforüleerimise, mis omakorda inaktiveerib ACC (Shimano, 2001). 1993. aastaks oli leitud kaks ACC isoformi, üks molekulaarmassiga 265 kDa ning teine massiga 280 kDa (Saddik jt., 1993). Need kaks ensüümi on kodeeritud erinevate geenide poolt ning esinevad erinevates kudedes. Nälgutamine ning diabeet mõjutavad ACC-265 ekspresseerimist negatiivselt ning tõstavad ACC-265 fosforüülimise taset (Abu-Elheiga jt., 2000). AMP lisamine keskkonda stimuleerib fosforüülimist ning ACC-265 inaktiveerimist. Seda protsessi kontrollitakse adenülaadi energia arvelt (Yeh, Lee ja Kim 1980). ACC-265 on tsütosoolne valk, mida leidub enamasti lipogeenses koes, näiteks maksas ja valges rasvkoes, ning ACC-280, mis on mitokondriaalne valk, leidub enamasti südames ning lihaskoes (Saddik jt., 1993). ACC-280 aktiivsust reguleerib fosforüülimine-defosforüülimine ning tsitraadi kontsentratsioon (Thampy, 1989). Malonüül-Co-A sünteesitakse lihaskius, südames ning maksas ACC-280 poolt ning see on suure tõenäosusega karnitiin-palmitoüül-CoA süstiksüsteemi regulaator (Abu-Elheiga jt., 2000). Fritz avastas selle süsteemi 1955. aastal ning see hõlmab endas palmitoüülgrupi kandmist tsütosoolist palmitoüül-CoA küljest mitokondri maatriksisse, kus see oksüdeeritakse  $\beta$ -oksüdatsioonisüsteemi kaudu (Fritz, 1955). Selle süsteemi katalüsaatoriteks on CPT1, mis asub mitokondri sisemembraani välispinnal (McGarry ja Brown, 1997) ning CPT2, mis asub sisemembraani maatriksipoolsel küljel. CPT1 viib tsütoplasmaatilise palmitoüülgrupi koensüüm-A juurest karnitiinile, mis tekitab palmitoüülkarnitiini ning vaba CoA. Palmitoüülkarnitiin transporditakse üle sisemise mitokondriaalse membraani ning antakse üle maatriksisse, kus tekib karnitiin ja palmitoüül-CoA. Viimast reaktsiooni katalüseerib CPT2. (Abu-Elheiga jt., 2000)

Üheks oluliseks rajaks mitokondrites on ühesüsinikuliste ühendite (1C) metabolism, mis mängib rolli ATP, NADH ning SAM biosünteesil. See põhineb folaatide võimel olla 1C ühendite aktseptoriteks ning kanda neid edasi erinevatesse metaboolsetesse radadesse. Ühesüsinikulised ühendid on vajalikud anaboolsetes metabolismiradades, näiteks kriitiliste rakukomponentide ning uute molekulide, näiteks nukleotiidide, tootmiseks (Newman ja Maddocks 2017). Üks olulisemaid süsinikku edasi kandvaid folaate on tetrahüdrofolaat, mis on lähteaine metaboolsetes radades, nende hulgas metüültsükli. Metüültsükkel hõlmab endas S-adenosüülmetioniini (SAM) sünteesi, mis on erinevatele substraatidele metüülgrupi edasikandja, et toota kreatiini, fosfatidüületanoolamiini või S-adenüülhomotsüsteiini, mille kaudu on see süsteem seotud glutatiooni sünteesiga (Suomalainen ja Battersby, 2018). Mitokondriaalne folaaditsükkel on oluline mitokondriaalse translatsiooni jaoks, sest selle käigus tekib formüülmetioniin, mis on mitokondriaalse valgusünteesi initsiaator. See omakorda on oluline hingamisahela kompleksi õige kokkupaneku ning OXPHOS õigeks toimimiseks. Selle tsükli regulaatorensüümiks on mitokondriaalne bifunktsionaalne metüüleetetrahüdrofolaadi dehüdrogenaas (MTHFD2), mis on kõrgelt indutseeritud loote arengueas ning primaarsete mtDNA defektidega patsientide rakkudes. Selle raja indutseerimine viitab mitokondrite stressile, kuid hetkel pole täpsed seosed folaaditsükli ja haiguskulu vahel selged (Suomalainen ja Battersby, 2018).

## **1.4. mtDNA**

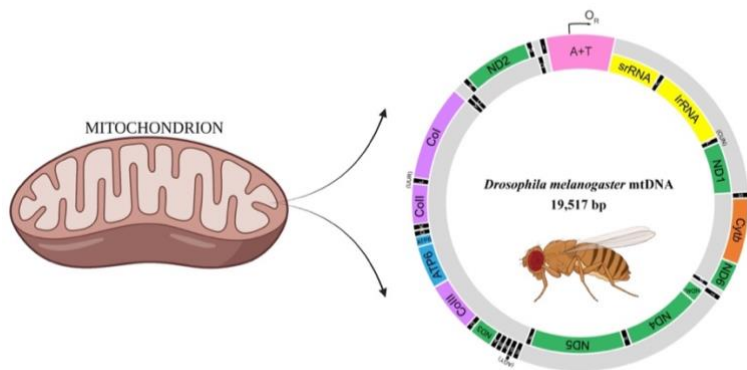
### **1.4.1. Suurus ja struktuur**

Hulkaksetes organismides on mtDNA genoom enamasti 16-20 kb suurune, kuid see erineb organismiti (Heinaru, 2012). On kirjeldatud ka nii oluliselt suuremaid, 48 kb suuruseid mtDNA molekule (Ladoukakis ja Zouros, 2017) kui ka väiksemaid, 10 kb suuruseid (Pett jt., 2011). Loomades kandub mtDNA edasi vaid emaliinipidi, kusjuures isalt pärinev mtDNA hävitatakse paljudel liikidel kohe pärast viljastamist (Nunnari ja Suomalainen, 2012).

Enamasti kodeerib mtDNA loomades vaid hingamisahela komplekside translatsiooniks vajaminevaid RNAsid, 2 rRNA-d ning 22 tRNA-d, ning 13 polüpeptiidi, mis on seotud hingamisahela ensüümide kompleksidega (Maier jt., 2001; Nunnari ja Suomalainen, 2012). Need 13 valku sünteesitakse mitokondriaalsete ribosoomide (mitoribosoomide) poolt sisemisel membraanil (Durigon jt., 2018). 37 mtDNA geenist kodeeritakse seitse alaühikut I kompleksi, üks alaühik III kompleksi, kolm alaühikut IV kompleksi, kaks alaühikut V kompleksi jaoks (Schon, Dimauro ja Hirano, 2012). Need alaühikud on vajalikud hingamisahela komplekside kokkupanekul, sest ilma nendeta kompleksid ei funktsioneer (Schon, Dimauro ja Hirano,

2012). Ülejäänud alaühikuid ja muid mitokondriaalseid valke, millede arv küünib üle 1000, kodeerib tuuma DNA (Iborra, Kimura ja Cook, 2004). Seega on funktsioneerivaks hingamisahelaks vaja nii mitokondri kui tuuma DNA-d.

Käesoleva töö mudelorganismi *Drosophila melanogaster*'i mtDNA on umbes 19,5 kb suurune (vt joonis 3) (Ciesielski jt., 2018). Rakkudes on mtDNA kokku pakitud nukleoidideks, mille struktuur koosneb valkudest ning mtDNA-st (Chen, Wang ja Butow, 2007).

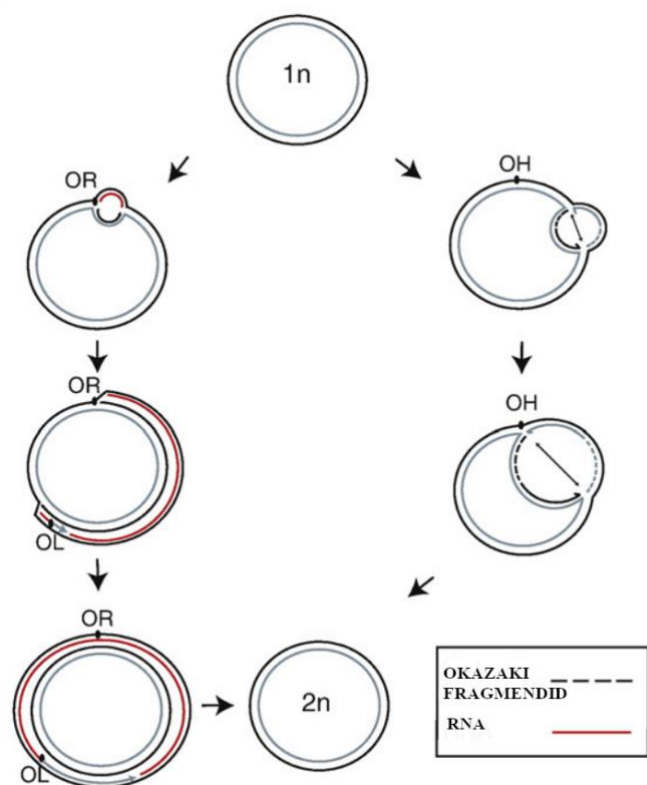


Joonis 3. *Drosophila melanogaster*'i mtDNA. Joonis kohandatud Zhao jt., 2019 põhjal.

Enamasti sisaldab eukariootide mtDNA mitte-kodeerivat ala, mille evolutsioonilisest tagamaast on vähe teada (Andolfatto 2005). Mittekodeeriv ala on eriti A ja T rikas, koosnedes 90-96% deoksüadenülaadi ning tümidülaadijääkidest, mistõttu kutsuti seda algsest A + T alaks (Lewis, Farr ja Kaguni, 1995; González de Cózar jt., 2019). Imetajates on see ala 1- 5 kbp suurune, käesolevas töös kasutatud mudelorganismis, *Drosophila*'s on mittekodeeriv ala 4,6 kbp, mis koosneb viiest koopiast 338-378 aluspaari korduselemendist, millel on suur asendussagedus eri liikide vahel, ning neljast koopiast 470 bp suurusest korduselemendist, mis sisaldavad konserveerunud DNA järjestuselemente. Selles alas ei asu ühtki restriksiooniensüümi seondussaiti. (Lewis jt., 1994)

MtDNA replikatsioon võib toimuda erinevate mudelite põhjal: ühendatud ahelate ehk *strand-coupled*, viivisahelale kaduva RNA liitmise ehk *transient RNA incorporation throughout the lagging strand* ehk RITOLS või asünkroonselt ehk ahela nihke kaudu (Lewis jt., 1994; Zinovkina, 2019). Esimene neist on sünkroonne ning teised kaks asünkroonsed (vaata Joonis 4) (Zinovkina, 2019). Eelmise sajandi lõpus arvati, et kõigil loomadadel toimub mtDNA replikatsioon asünkroonselt, kuid selle sajandi alguses on leitud, et see toimub ka *strand-coupled* ja RITOLS mudelite põhjal (Lewis jt., 1994; Yasukawa jt., 2006). Asünkroonse mudeli põhimõte on, et see toimub peatumata, kuid mahajääv ahel sünteesitakse viivitusega võrreldes juhtiva ahelaga. See protsess algneb raske ahela replikatsiooni alguspunktist (ORI, O<sub>H</sub>), mis

asub mittekodeerival alal. (Robberson, Kasamatsu ja Vinograd, 1972) Ühele ahelale alustatakse replikatsiooni varem, mis tähendab, et replikatsioon erinevatele ahelatele lõpeb samuti erinevatel aegadel (Zinovkina, 2019). See mudel põhineb elektronmikroskoopiaal, mille alusel leiti osaliselt üheaahelalised replikatsiooni vaheühendid (Robberson, Kasamatsu ja Vinograd, 1972). Sünkroonne ehk *strand-coupled* mudel on traditsiooniline replikatsiooni mudel, kus kaks replikatsioonikahvlit alustavad samal ajal samast punktist ning liiguvad mööda juht- ning viivisahelat edasi (Zinovkina, 2019). 2006. aastal avastati imetajate mitokondrites 2D agarose-geelelektroforeesi abil replikatsiooni vaheühendid (RI), millel on *strand-coupled* DNA sünteesi tunnused, kuid puuduvad asünkroonse mudeli tunnused (Yasukawa jt., 2006). Seetõttu eeldatakse, et imetajates toimub RITOLS mudelil põhinev mtDNA replikatsioon, mis põhineb viivisahelale töödeldud transkriptide hübridiseerimisel (Hensen jt., 2014; González de Cózar jt., 2019). DNA sünteesil juhtivale ahelale kasutatakse praimeriks umbes 100 nukleotiidi suurust RNA praimerit. Kui juhtiva ahela süntees on jõudnud 30 aluspaari suuruse mittekodeeriva DNA regioonini, mis sisaldab kerge ahela replikatsiooni *origin*'i ( $O_L$ ), muudetakse see üheaahelaliseks ning sellest moodustub ling, millelt algab viivisahela RNA praimerite süntees. (Wanrooij ja Falkenberg, 2010) RNA kasutamine viivisahelana aitab stabiliseerida ümberasustatud DNA-d ning kaitsta seda replikatsiooni käigus tekkivate kahjustuste eest. (Yasukawa jt., 2006)



Joonis 4. mtDNA replikatsioon. Vasakul RITOLS mudel, paremal *strand-coupled* mudel. Joonis autori poolt kohandatud Wanrooij ja Falkenberg, 2010 põhjal.

#### 1.4.2. mtDNA nukleoidid

Vastupidiselt enimlevinud viisile mtDNA-d kujutada, ei esine *in vivo* eraldiseisvat rõngakujulist mtDNA molekuli. Genoomne mtDNA on rakus organiseeritud hoopis dünaamilise struktuurina, mida kutsutakse nukleoidiks. Tuumas pakitakse DNA histoonide oktameeride poolt nukleosoomideks. (Kucej jt., 2008) Võrreldes tuumas asuvate nukleosoomidega, on mitokondriaalsete nukleoidide dünaamika ning asetuse kohta rakus palju vähem teada (Xin jt., 2005). Teada on, et samad valgud ei täida erinevate organismide nukleoidides sama ülesannet (Chen, Wang ja Butow, 2007).

Mitokondriaalsed nukleoidid on sfäärikujulised, diameetriga umbes 100 nm ning iga nukleoid sisaldab üht või mitut koopiat mtDNA-d (Kühlbrandt, 2015). Iga rakk, olenevalt tingimustest, sisaldab kümneid kuni sadu selliseid nukleoide, kusjuures nukleoidide suurus erineb liigiti ning on ka rakutüübist (Spelbrink, 2010). MtDNA pakkimisel nukleoidideks mängivad rolli erinevad valgud, millede täpsed koosseisus pole veel selgusele jõutud (Lewis, Uchiyama ja Nunnari, 2016). Teatakse, et nukleoidideks pakkimisel on vajalik mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A (TFAM), millel on kõrgkonserveerunud järjestus, mis seondub DNA-le muutes seda kompaktsemaks ning sfäärilisemaks. Tegu on HMG ehk kõrgmobiilse grupi valguga, mis painutab DNA selgroogu moodustades lünga, misjärel täidetakse ära kõik lähedased seondumissaidid kuni DNA on kompaktne. Lisaks transkriptsioonil osalemisele käitub TFAM ka kui mitokondriaalne histoon ehk aitab mtDNA-d pakkida nukleoidiks. (Kaufman jt., 2007)

Nukleoidides esineb veel mitmeid erinevaid valke, mis on seotud basaalse DNA protsessidega, nt replikatsioon ning transkriptsioon: DNA helikaas, DNA polümeraas  $\gamma$ , mitokondriaalne transkriptsioonifaktor B2 (mtTFB2), transkriptsiooni terminatsioonifaktor (mTERF), SLIRP jt (Hensen jt., 2014). Peale selle on nukleoidides identifitseeritud veel mitmeid erinevaid valke, kuid nende täpne koostis pole siiani teada, mille põhjus võib seisneda nukleoidide heterogeensuses ning dünaamilisuses, mistõttu nende koostis ning asukoht muutub vastusena keskkonnatingimustele (Hensen jt., 2014; Lewis, Uchiyama ja Nunnari, 2016). Näiteks on leitud mitmeid valke, millel on teada roll mtDNA metabolismis, kuid millede täpne roll nukleoidides on siiani teadmata (Hensen jt., 2014). Mitokondrites on leitud ka valke, mis ei kuulu nukleoidide koostisesse, vaid funktsioneerivad biogeneesis ja metabolismis. Osa neist osalevad ka mitokondrite stabiliseerimises, mis teeb neist bifunktsionaalsed valgud. (Bateman, Perlman, ja Butow, 2002) Selliseks valguks on näiteks pärmis *Saccharomyces cerevisiae* esinev

ensüüm Ilv5p, mis on vajalik nii hargnenud ahelaga aminohapete biosünteesis kui ka nukleoidi koostises (Macierzanka jt., 2008).

### 1.5. Mitokondriaalsed haigused

Mitokondriaalsed haigused on ühed levinumad metaboolsetest haigustest ning esinemissagedusega 0,02%-0,05% kõikidest sündidest (Iborra, Kimura, ja Cook, 2004; Suomalainen ja Battersby 2018; Vafai ja Mootha, 2012). Nende haiguste põhjuseks on enamasti mitokondrite defektne funktsioon, mis võib olla põhjustatud nii mitokondrite kui tuuma geenide mutatsioonidest (Vafai ja Mootha, 2012). Mitokondriaalsete geenide mutatsioonid võivad põhjustada erinevaid haiguseid (Wallace, 1999).

Enamasti seostatakse mitokondriaalseid haiguseid OXPHOS häiretega, sest see mõjutab ATP tootmist ning ROS-ide liigset tootmist (Zeviani, Spinazzola ja Carelli, 2003). OXPHOS häiretest tulenevaid mitokondriaalseid häireid nimetatakse primaarseteks mitokondriaalseteks haigusteks. Need tulenevad nukleaarse või mitokondriaalse DNA mutatsioonidest, mis kodeerivad OXPHOS süsteemi subühikuid. (Kadowaki jt, 1994) Kõik muudatused tuuma geenides, mis mõjutavad mitokondriaalset replikatsiooni, transkriptsiooni või translatsiooni, võivad mõjutada ka elektronide transportahela tööd (Nunnari ja Suomalainen, 2012). OXPHOS häired on mitmekülgsed ning tüüpiliselt kanooniliste biokeemiliste ning morfoloogiliste omadustega (Schon, Dimauro ja Hirano, 2012). Esinevad ka ROS-iga kokkupuutest põhjustatud haigused (Wallace, 1999). Kroonilised ROS-iga kokkupuuted võivad viia mitokondrite ja rakuvalkude ja -lipiidide oksüdatiivsete kahjustusteni. Akuutne ROS-iga kokkupuude võib inaktiveerida raud-väävel klastreid elektronide transpordiahela I, II ning III kompleksis ning TCA tsükli akonitaasis, mis võib viia mitokondriaalse energia tootmise täieliku seiskumiseni. (Wallace, 1999) Kui hingamisahela töö on häiritud, siis NADH ja püruvaat hakkavad tsütosoolis akumulierima. Liigne tsütosoolne püruvaat konverteeritakse laktaadiks laktaadi dehüdrogenaasi poolt, mis siis omakorda tõstab piimhappe taset, mida on märgatud erinevate mitokondriaalsete haiguste puhul. (Orth ja Schapira, 2001)

Kirjeldatud on nii homoplasmilisi kui heteroplasmilisi haiguseid. Heteroplasmiliste haiguste korral on rakus nii metsiktüüpi kui mutantse mtDNA molekulid ning haigus avaldub vaid siis kui mutantne mtDNA kogus ületab läve (Vafai ja Mootha, 2012). Heteroplasmia avaldumine fenotüübis ilmneb eluea kasvades, kusjuures muutus võib toimuda nii ühe kui teise genotüübi suunas. Seetõttu võib muteerunud mtDNA protsendi kasvades haiguskulg ägeneda (Spelbrink, 2010). Heteroplasmilise *missense* mutatsiooni poolt põhjustatud haigused on näiteks LHON, düstoonia ning Leigh tõbi. LHON ja düstoonia võivad olla põhjustatud sama mutatsiooni

(MTND6 LDYT14459A) poolt, kus on toimunud mitokondriaalses ND6 geenis G transitsioon A-ks. ND6 kodeerib NADH dehüdrogenaasi alaühikut ning see mutatsioon muudab koodon 72 juures olevaalaniini valiiniks. (Wallace, 1999)

Mitokondrite düsfunktsiooni poolt on põhjustatud paljud erinevad pärilikud ning vanusega seotud neurodegeneratiivsed haigused (Westermann, 2010). Mitokondriaalsed haigused erinevad teistest haigustest oma suure fenotüübilise heterogeensuse poolest (Suomalainen ja Battersby, 2018). Näiteks on mitokondreid seostatud kardiomiopaatia, laktatsidoosi, endokriinsete häirete (näiteks diabeedi), LHON, düstoonia, Leigh tõve, Parkinsoni, Alzheimeri ning Downi sündroomiga (Ermak, Morgan ja Davies, 2001; Shaw ja Chang, 2013; Suomalainen ja Battersby, 2018; Wallace, 1999). Loetletud haiguste avaldumine võib varieeruda ealiselt, näiteks LHON võib keskikka jõudes põhjustada äkilist nägemismeele kaotust ning II tüüpi diabeet võib avalduda noorukieas. Sageli on mitokondriaalsed haigused ka progresseeruva kuluga ning letaalsed. (Wallace, 1999) 1980-ndate alguses, samaaegselt mitokondriaalsete sündroomide leidudega, leiti, et 1-metüül-4-fenüül-1,2,3,6-tetraahüdropüridiiniga (neurotoksiin) kokkupuude viis akuutse parkinsonilaadse sündroomini, mida pole kliiniliselt võimalik eristada Parkinsoni sündroomist (Kadowaki jt., 1994). On üritatud leida seoseid Parkinsoni tõve ning mtDNA mutatsioonide vahel, mis on viinud erinevate tulemusteni. Mõned uuringud on leidnud seoseid Parkinsoni tõve ja osaliste mtDNA deletsioonide vahel, teised pole aga seoseid leidnud. (Schon, Dimauro ja Hirano, 2012) Üheks selliseks mutatsiooniks on funktsioonikaotuse mutatsioon PINK1-s, mis on valgukinaas, mida stabiliseeritakse madala membraanipotentsiaaliga (Westermann, 2010). Siiski võib üks mutatsioon põhjustada ka erinevaid haiguseid. Näiteks võib identne asendusmutatsioon põhjustada erineva patoloogilise fenotüübi erinevates patsientides. Üheks selliseks mutatsiooniks on homoplasmiline *missense* mutatsioon ND4 geenis, mis asub 11778G>A, kus arginiini koodon 340 on asendunud histidiiniga (R340H), mis põhjustab LHON-i ning ootamatu algusega pimedust. (Wallace ja Chalkia, 2013)

Põhjused, miks neid haiguseid esineb nii varieeruvalt, võivad tuleneda mitokondrite mitmetahulistest funktsioonidest. Kuna neid on seostatud lisaks OXPHOS-ile nii metabolismi, apoptoosi, kaltsiumi homöostaasi, raud-väävel klastrite jpm funktsioonidega, võivad mitokondrid olla mitmete levinud metaboolsete haiguste põhjuseks, seda ilma elektronide transportahelat mõjutamata.

## 1.6. Sra

Sarah ehk Sra ehk Nebula on valk, mille konventsionaalseks funktsiooniks on kaltsineuriini inhibeerimine. Kaltsipressiinid on kõrgelt konserveerunud kaltsineuriini, mis on seriini-treoniini fosfataas, inhibiitorite perekond, kuhu kuuluvad RCN1P pärmis, CBP1 seentes, Sra äädikakärbses ning DSCR1 hiirtes (Chang, Shi ja Min, 2003). Kaltsineuriini seostatakse mälu ja õppevõimega ning selle vähenenud aktiivsust seostatakse tau valgu hüperfosforüülimisega ning sellest tuleneva neurofibrillaarsete sõlmede tekkega (Chang, Shi ja Min, 2003; Ermak, Morgan, ja Davies, 2001). DSCR1 on Down-i sündroomi regioonis asuva kriitilise regiooni esimene geen (Fuentes, Pritchard, ja Estivill, 1997). See asub 21q22.1-21q22.2 ning kodeerib uudet happelise domääniga valku, millel on seriini-proliini motiiv (Fuentes, Pritchard ja Estivill, 1997; Shaw ja Chang, 2013). Seda ekspresseeritakse kesknärvisüsteemis ja südames, kuid üleekspresseeritakse Down-i sündroomiga loote ajus. (Fuentes, Pritchard ja Estivill, 1997) Seda on leitud ka Alzheimer-i tõvega patsientide ajudes, kus seda esineb pea kaks korda rohkem kui kontrollgrupis (Ermak, Morgan ja Davies, 2001). Samuti leidub palju DSCR1-te loote ajus, mistõttu seda on seostatud aju talitlusega (Fuentes, Pritchard ja Estivill, 1997). Kuna aju tarbib ligi 20% tarbitavast hapnikust, siis peaks sealt leidma kõrge oksüdatsioonitasemega rakke ning oksüdatiivse stressi vastast kaitset, mis arvataksegi olevat DSCR1 funktsioon ajus. (Ermak, Morgan ja Davies, 2001)

Sra't on leitud ka mitokondritest, kus ta ei funktsioneerigi kui kaltsipressiin, vaid omab seninini tundmatut funktsiooni. Teatakse, et tal on roll mitokondriaalsete funktsioonide ning terviklikkuse hoidmises. Sra't leidub enamjaolt sisemise mitokondriaalse membraaniga külgnevas matriksis, mõnikord leidub seda ka membraanidevahelises alas (Chang ja Min, 2005; Shaw ja Chang, 2013). Mitokondrites assotsieerub Sra ADP/ATP translokaatoritega, muutes nende aktiivsust, mis näitab Sarah rolli mitokondriaalsete funktsioonide regulaatorina (Chang ja Min, 2005). Selle üleekspressiooni on seostatud närvirakkude suurenenud suremusega ja vähenenud liikumisaktiivsuse ning elueaga *Drosophila*'s. Lisaks on leitud vähenenud mtDNA ning ATP tasemeid mitokondrites ning kaitset oksüdatiivsest stressist tingitud apoptoosi vastu. (Lee jt., 2016) On uuritud ka Sra *knockdown*'i, mis põhjustab õpidefekte, mitokondriaalset düsfunktsiooni ning suurenenud ROS tasemeid (Chang ja Min, 2005; Chang, Shi ja Min, 2003).

## 2. MEIE UURIMISGRUPI EELNEVAD TULEMUSED

### 2.1. mtEcoBI-ga mtDNA stress tekitamine

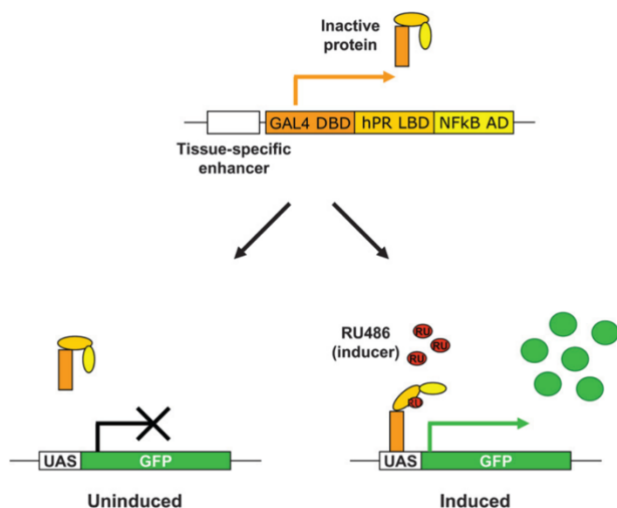
Meie töögrupis on eelnevalt leitud uudne mehhanism, kus I tüüpi restriksiooniendonukleasiga indutseeritud mitokondriaalse DNA stress viib metaboolse reprogrammeerumiseni. Tüüp I restriiktaasid on heteropentameersed ensüümid, mis on võimelised DNA-d lõikama vastavalt nende metüleerituse tasemele (Murray, 2000). Nende tööpõhimõtte seisneb selles, et nad seonduvad kaheaheelalise DNA-ga läbi oma spetsiifilise seondumisjärjestuse (5'-TGAN<sub>8</sub>TGCT-3'), misjärel translokeerib see DNA ning tekitab kaheaheelalise katke juhuslikku kohta, mis võib olla tuhandete nukleotiidide kaugusel nukleasi algsest seondumiskohast. Seeläbi on nukleas võimeline nii translokeerima kui ka juhuslikult degradeerima oma substraadiks olevat DNA ahelat. (Murray, 2000)

Need koosnevad kolmest subühikust: R, M ja S, mida kodeeritakse kolmelt omavahel seotud geenilt: *hsdR*, *hsdM*, *hsdS*. S ehk spetsiifilisuse subühikut seostub DNA-ga domäänides, mis annavad edasi järjestuse eripärasuse nii kompleksi restriksiooni kui modifikatsiooni aktiivsusele (Murray, 2000). M ehk metüleerimise subühikus asub DNA metülatsiooni aktiivsait ja AdoMet'i, mis on modifikatsioonide metüülrühma doonor, seondumissait (Murray, 2000; Meselson ja Yuan, 1968). R ehk restriksiooni subühik vastutab restriksiooni eest ning sisaldab aktiivsaiti ATP hüdrolyüsi jaoks, samuti on selle ülesanneteks DNA translokatsioon ning endonukleasne aktiivsus (Murray, 2000).

Tsitraadi süntaasi geeni mitokondriaalne sihtmärkjärjestus liideti R, M ja S subühikutega ning kloneeriti GAL4-st sõltuva UAS-i kontrolli alla (Bahhir jt, 2019). R subühikule loodi kolm isovormi, mistõttu oli ka kolm tüve: func ehk funktsioonaalne; endo-, millel on punktmutatsioon (D298E) endonukleasii domäänis, mille tulemusena antud ensüüm ei olnud võimeline lõikama DNA-d; endo/trans-, millel on punktmutatsioon ATPaasi domäänis (K477R) ning millel on puudulik endonukleasne ning translokatsiooniline funktsioon.

Nende geenide ekspressioon oli allutatud GAL4/UAS süsteemi kontrollile. GAL4/UAS süsteemis on ekspressiooni algatajaks koespetsiifiline promootor või enhaanser, mis aktiveerib ühes transgeenses konstruktsioonis pärmi transkriptsioonifaktor GAL4. Seejärel GAL4 seondub teise sihtmärkkonstrukti promootoris asuvale ülesvoolu aktiveerivale järjestusele ning aktiveerib transkriptsiooni (Caygill ja Brand, 2016). Geneswitch (vt joonis 5) on edasiarendus GAL4/UAS süsteemist, mis võimaldab tinglikku geeniekspressiooni *Drosophila*'s vaid *inducer*'i olemasolu korral (Osterwalder jt., 2001; Roman ja Davis, 2002; Roman jt., 2001). Geneswitch süsteemi on ühendatud pärmi GAL4 DNA-le seonduv ning transkriptsiooni

aktiveeriv domään, millel on inimese progesterooni retseptori regulaatoridomään (Ford jt, 2007). See seondub UAS-saidile ning aktiveerib transgeeni ekspressiooni ainult progesterooni või selle analoogide, näiteks RU486, keskkonnas esinemise korral (Beckingham jt., 2005; Ford jt., 2007)



Joonis 5. Geneswitch süsteemi toimimine. Paremal on kujutatud RU486 (mifepristoon, punane) abil indutseeritud UAS-iga seotud geenide ekspressioon. RU486 puudumise korral geen ei ekspresseeru. (Nicholson jt, 2008)

## 2.2. mtDNA stressi põhjustatud muutused metabolismil

Varases elustaadiumis mtDNA stressi indutseerimise korral põhjustas endonukleasne ja translokatsiooniline aktiivsus märkimisväärseid topoloogilisi kõrvalekaldeid mtDNA-s. Oodatult viis see akuutsete ETC defektide ning suurenenud ROS-ide tootmiseni ning süsteemse suremuseni. Kui aga mtEcoBI ekspresseeriti täiskasvanud kärbestes, polnud näha klassikalisi muudatusi OXPHOS-is, kuid sellest hoolimata oli see efekt letaalne. Märkimisväärseks metaboolseks muutuseks oli ümberlülitumine rasvade kasutamisele, mis oli tingitud võimetusest tarbida suhkruid. Süsivesikute metabolismi represseeriti DNA lõigustumise ja translokatsiooni kaudu. Translokatsioon vähendas tsütonukleaarsete valkude atsetülatsiooni tsütosoolse AcCoA taseme vähenemise kaudu, samas kui mtDNA lõigustumine inaktiveeris Akt kinaasi, mis on glükoosi raku transpordi üks peamisi regulaatoreid. Täpne seletus kirjeldatud leidudele hetkel puudub, kuid intaktse ETC tõttu on tõenäoline, et see efekt on eelkõige seotud mtEcoBI mõjuga *in vivo* mtDNA kontekstile, mõjutades näiteks nukleoidide struktuuris leiduvate metaboolsete ensüümide aktiivsust. See aga tähendab seda, et mtDNA *in vivo* seisundil on OXPHOS-st eraldiseisev roll süsteemse metaboolse tasakaalu regulatsioonis.

## 2.2. MtDNA stress indutseerib Sarah üleekspressiooni

Transkriptomika analüüs kõiki tüvesid hõlmava promootori (*tubGS*) kontrolli all olevate mtEcoBI isovorme kandvates (*tubGS*>mtEcoBI) tüvedes näitas ühe geeni märkimisväärset üleekspressiooni (Ots, 2018, vt Tabel 1). Selleks geeniks oli *Sarah* ehk *Sra*, mille edasisel uurimisel selgus, et RNAi-vahendatud *Sarah* geeni *knock-down* korral toimub sarnaselt *tubGS*>mtEcoBI tüvedele ka func ning endo- *sra* KD tüvede puhul ATP langus ja märgatav eluea vähenemine. *Sra* KD ei põhjustanud aga suuremat ATP langust kui *tubGS*>mtEcoBI, mis viitab sellele, et *Sarah* valk ei osale ATP taseme reguleerimises, vaid tal on mõni muu funktsioon mitokondrites.

**Tabel 1.** Transkriptomika andmed *sarah* geeni kohta (Ots, 2018).

	Ekspressiooni erinevus kordades	Standardviga	Wald testi p-väärtus
endo/trans- vs endo-	11	0,27	$6,63 \cdot 10^{-39}$
endo/trans- vs func	20,25	0,28	$3,25 \cdot 10^{-54}$

## 2.3. Sra mõju metabolismile

*Sra* RNAi ei elimineerinud mitokondriaalsest stressist tulenevat negatiivset efekti, kuid lipiidide vähenemine polnud nii drastiline kui see seda oli mtEcoBI kärbeste puhul. *Sra knock-down*'i edasi uurides leiti, et see blokeerib TAG-ide tarbimist mtEcoBI kontekstis. *Drosophila*'s on rasvkoos varuaineks glükogeen ning TAG-id (Arrese ja Soulages 2010). Glükogeeni peaks enne rakkudesse transportimist lagundama glükoosiks. Liina Otsa magistratöö tulemustest selgus, et ei kasutatud ei glükogeeni ega TAG-e, seega häiritud oli nii rasvade kui süsivesikute tarbimine, mis oli *Drosophila*'le letaalne.

Nendest tulemustest võib eeldada, et *Sra* üleekspressioon tõenäoliselt päästab rasvade tarbimise võime, mistõttu soovis käesoleva bakalaureusetöö autor välja uurida, kas *Sra* KD mtDNA stressi tingimustes rasva tarbimise võime kaob, kuid suhkrute tarbimise võime ei taastu. Samuti sooviti välja uurida, kas on erinevusi *Sra* KD ning ilma *Sra* KD-ta genotüüpide mtDNA fragmenteeritumiseta, mis näitaks *Sra* kaitsvat rolli mtDNA killustuvuse vastu.

### 3. EKSPERIMENTAALOSA

#### 3.1. Töö eesmärgid

Lõputöö eesmärgiks on välja selgitada, kuidas mõjutab valgu Sra üleekspresseerimine *Drosophila* mtDNA fragmenteeritust ning metaboolseid radu. Selleks esitati järgnevad uurimisküsimused:

1. Kas Sra mõjutab mtDNA stressivastuse metaboolset signatuuri (ACC, atsetülatsioon)?
2. Kas Sra omab mtDNA-d kaitsvat rolli?

#### 3.2. Materjal ja meetodika

##### 3.2.1. *Drosophila melanogaster*'i käsitlemine

*Drosophila melanogaster*'i käsitlemiseks kasvatati neid söötmel, mille valmistusviis ning retsept on toodud tabelis 1.

**Tabel 2.** *Drosophila melanogaster*'i söötme retsept

Koostisosa	Massiprotsent
Agar	1%
Pärm	3,5%
Maisijahu	1,5%
Sojajahu	1%
Sahharoos	1,5%
Glükoos	3%
Suhkrusiirup	3%
Propioonhape	0,5%
Nipangin 10%	1%
MQ-vesi	84%

Omavahel segati agar, pärm, maisijahu, sojajahu ja lisati MQ-vesi. Saadud segu kuumutati keemiseni, kuumutamise ajal segati segu pidevalt. Seejärel lisati sahharoos, glükoos ning suhkrusiirup. Pärast 20 minutit keetmist lasti segul magnetsegajal jahtuda 65°C-ni. Kui segu oli jahtunud, lisati nipangiin, propioonhape ning Geneswitch ekspressioonisüsteemi töötamiseks

vajaduse korral ka mifepristoon. Sööde jagati viaalidesse (8-9 ml) ning pudelitesse (35 ml) ning lasti tarduda vähemalt 2 tundi. Seejärel sööde korgiti ning hoiustati 4°C juures kuni kasutamiseni, kuid mitte kauem kui 3 nädalat.

Kärbeid kasvatati 18°C või 25°C juures. Täiskasvanud äädikakärbeste käsitlemisel mikroskoobi all kasutati vajaduse korral CO<sub>2</sub> anesteasiat. 18°C juures kasvatati emaseid neitsisid, et pikendada nende suguküpseks saamise aega 16-tunnini, mis võimaldas neid isoleerida kaks korda päevas: hommikul kell 8.00 ning õhtul kell 17.00. Pärast soovitud genotüübiga emaste eraldamist ristati neid isastega vahekorras 1 : 2 ning pandi kasvama 25 °C kappi, kus vaheldus valgusperiood, mis kestis 12 tundi, ja pimedusperiood, mis kestis 12 tundi. Ristamisperiood kestis kolm päeva, mille järel eemaldati pudelitest vanemad jättes alles vaid larvistaadiumis järglased. Kärbestes selektiivsete geenide avaldumiseks indutseeriti ristatud kärbeid valmiku faasis mifepristooni (Sigma M8046 200 µM) lisandiga söötmele (0,2% söötme massist), millel neid hoiti 10 päeva, iga kolme päeva tagant kanti üle värsele mifepristooniga söötmele.

Katsetes kasutati kolme tüve: func, endo- ja endo/trans-. Kontrolltüveks on endo/trans-, mis ekspresseerib mtEcoBI inaktiivset vormi, endo- tüves on mtEcoBI-l ainult translokatsiooniline aktiivsus ning func tüvi kannab mtEcoBI täielikult aktiivset vormi, millel on nii endonukleasne kui ka translokatsiooniline aktiivsus. Selleks, et tüvedes õige isovorm ekspresseerida, ristati tüvede emaseid neitsisid *tubGS* tüve isastega. *Sra* KD kärbeste saamiseks ristati *Sra* RNAi ekspresseeriva kasseti kokku *tubGS*>mtEcoBI tüvedega (edaspidi *Sra* KD). Järglaskond sisaldas kõiki vastava mtEcoBI isovormi genee ning *tubGS* transkriptsiooni aktivaatorit (vt Lisa 1). Tüvede nimetused, genotüüpid ning kirjeldused on toodud Tabelis 3.

**Tabel 3.** Kasutatud tüved

Tüvede nimetus	Genotüüp	Allikas	Kirjeldus
tubGS	tubGS/tubGS	Scott Pletcheri grupp	
endo-	UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS; UAS-mtHsdR (D298E)/UAS-mtHsdR (D298E)	Bahhir jt 2019	Endonukleas-defektne mtEcoBI UAS süsteemi kontrolli all
endo/trans-	UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS; UAS-	Bahhir jt 2019	Mittefunktsionaalne mtEcoBI UAS-süsteemi kontrolli all

	mtHsdR (K477R)/UAS- mtHsdR (K477R)		
func	UAS-mtHsdM.UAS- mtHsdS/UAS- mtHsdM.UAS- mtHsdS; UAS- mtHsdR/UAS- mtHsdR	Bahhir jt 2019	Funktsionaalne mtEcoBI UAS- süsteemi kontrolli all.
SraKD	UAS-SraRNAi/UAS- SraRNAi	VDRC Stock Centre, VDRC ID: 107573	kommertsiaalne RNAi tüvi sra vastu

Metaboolsete muutuste uurimiseks viidi läbi Western blot kasutades antikehadeks ACC ning AcK-d, topoloogia uurimiseks viidi läbi Southern blotid kasutades restriksiooniensüümidenä NdeI ja BglII, mis lõikasid mtDNA-d autorit huvitanud kohtadest.

### 3.2.2. mtDNA eraldamine

MtDNA eraldamiseks kanti vastava tüve kärbsed üle tühja pudelisse ning külmutati jääl. Need kanti üle viaali, lisati paar milliliitrit homogeniseerimispuhvrit (225 mM mannitool, 75 mM sahharoos, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1% BSA, 1 mM EDTA) ning homogeniseeriti Dounce homogenisaatoriga 12 korda. Seejärel valati saadud suspensioon 50 ml viaali ning lisati homogeniseerimispuhvrit ruumalade ühtlustumiseni. Koetükkide eemaldamiseks tsentrifuugiti proove 4°C juures 1000 g 1 min (tsentrifuugi mudel Hettich Zentrifugen Universal 32 R), koguti supernatant, lisati homogeniseerimispuhver ruumalade ühtlustuseni. Viimast kolme sammu korrati kokku kolm korda. Seejärel kanti supernatant uude viaali ning tsentrifuugiti (tsentrifuugi mudel Sorvall RC 5B Plus) 4°C juures 9000 g 10 minutit ning resuspendeeriti 2 ml homogeniseerimispuhvrts, seejärel lisati puhvrit kuni ruumalani 20 ml. Supernatant eemaldati. Saadud suspensioon tsentrifuugiti uuesti 4°C juures 9000 g 10 minutit ning sade suspenderiti 1 ml DNA ekstraheerimispuhvrts (25 mM EDTA ph 8,0, 75 mM NaCl). Lisati 0,2 vol 10% SDS ning 200 ug proteinaas K-d. Saadud suspensioonil lasti toatemperatuuril üks tund inkubeerida ning seejärel ekstraheeriti 2 vol fenool-kloroform-isoamüülalkoholiga (25:24:1) kuni interfaasi polnud näha. Sadestati mtDNA 0,2 vol 10 M ammooniumatsetaadi ning 2 vol etanooliga. Sade tsentrifuugiti 16 000 g 20 minutit 4°C juures. Saadut pesti 70% etanooliga, resuspendeeriti Milli-Q vees.

### 3.2.3. Southern blot ja hübriidiseerimine

DNA intaktsuse määramiseks kasutati Southern blot meetodit. MtDNA lõikamiseks segati katsutitesse kokku restriiktaasid (4 U/1 µg DNA), DNA (1 µg/ reaktsioon), puhver (Thermo Scientific 10X Buffer O, orange) ning MQ vesi, reaktsioon viidi läbi kogumahus 160 µl ning asetati 37°C juurde neljaks tunniks. Samal ajal valmistati 0,5% etiidumbromiidita (EtBr) agarosgeel 1× TBE-s. Pärast geeli jahtumist kanti geelile markerid ThermoFisher PageRuler 1 kb ning ThermoFisher PageRuler 1 kb Plus ning proovid viies tehnilises korduses. Geelil lasti joosta 23 h pingel 50 V. Seejärel eemaldati geel vannist, lõigati sobivaks (14 cm x 20 cm), värviti EtBr-ga ning asetati 20 minutiks depuriinimislahusesse (0,25 M HCl), seejärel loputati vee ning denatureerimislahusega (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) ning asetati denatureerimislahusesse 20 minutiks. Viimast sammu korrati veel ühel korral. Viimaks asetati geel neutralisatsioonilahusesse 30 minutiks. Ootamise ajal valmistati ette *blotting* süsteem. Selle jaoks lõigati kuus tükki filterpaberit ning tükk membraani, mis olid sama suurusega kui geel. Neid leotati samuti neutralisatsioonilahuses ning asetati salvrättidele: 3 filterpaberi tükki, geel, membraan, 3 filterpaberi tükki, kile, raskus. Ülekanne toimus 18 tunni vältel, seejärel eemaldati pealmised salvrätid ning geelikiht, alles jäeti vaid vajalik membraan. Membraani hoiti väiksemate agarosüükide eemaldamiseks üks minut 6× SSC puhvris. Seejärel võeti membraan ettevaatlikult puhvrist välja ning eemaldati liigne vedelik. Membraani hoiti ristsidumise masinas (Herolab UV Crosslinker) 24 sekundit 120 mJ juures ning asetati tagasi 6× SSC-sse.

Hübriidiseerimiseks vajaliku proovi jaoks valmistati 1% TAE geel koguvolüümiga 30 ml, lisati 3 µl EtBr. Valmistati 3x PCR jaoks 6 µl 10× PCR puhvrist, 6 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl α<sup>32</sup>P-dCTP-st ja dNTP-st, mis sisaldas ülejäänud kolme nukleotiidi, 3 µl mõlemast praimerist (ingl *forward* ja *reverse*), 1,5 µl TaQ ning 31,5 µl MQ veest *mastermix*, mis jagati kahte katsutisse, mõlemasse 19 µl. Negatiivseks kontrolliks lisati ühte katsutisse 1 µl MQ vett, teisse katsutisse lisati 1 µl 10 µg/ml DNA-d. Radioaktiivseid materjale käsitleti vaid käesoleva töö juhendaja poolt. PCR programmeeriti järgmiselt:

- 1) 95 °C – 5 min;
- 2) 95 °C – 20 sekundit;
- 3) 51 °C – 30 sekundit;
- 4) 72 °C – 40 sekundit;
- 5) 72 °C – 10 min.

Samme 2-4 korrati 30 korda, kogu PCR programmi aeg 1 h 15 min. PCR-produkt lahustati 180 µl MQ-vees, lisati 22 µl naatriumatsetaati ning 600 µl etanooli. Saadud lahus sadestati külmikus

2 tundi, eemaldati liigne vedelik, resuspendeeriti 100 µl MQ-vees ning seejärel lisati see hübridiseerimispuhvriks. Membraani hübridiseeriti üleöö Roller-Blot hybridiser BF-3D masinas 55°C juures. Hommikul eemaldati kasutatud vedelik ning membraani pesti 20 min 5× SSC 0,1% SDS puhvriga, seejärel 20 min 1× SSC 0,1% SDS puhvriga ning veelkord 20 min 1X SSC 0,1% SDS. Membraan kuivatati ning mässiti toidukilesse ning asetati ekraanile. Tulemuste saamiseks vaadeldi membraani kasutades Phosphoimageri ekraani Amersham Typhoon instrumendiga.

### **3.2.4. CCE1 lõikus**

Viidi läbi uus lõige BglIII ning NdeI restriksiooniensüüme kasutades 4 tundi 37 ° C, mida seejärel töödeldi 2 vol fenool-kloroform-isoamüülalkoholi (suhtes 25:24:1) lahusega, segati ning tseentrifuugiti 16 000 rpm 5 minutit, veekiht pipeteeriti uude katsutisse, lisati NaOAc 0,2 vol ning EtOH 2 vol. Saadud suspensiooni sadestati -20 °C juures üle öö, resuspendeeriti MQ vees ning seejärel töödeldi CCE1-ga, mis topoisomeraasi abil lõikus Holliday ühenduse ning lineariseeris selle. CCE1-ga töötlemisel kasutati puhvrina 20 mM Tris pH 8,0, 200 mM NaCl, 0,2 mM DTT, 1 mM EDTA, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml BSA (Schofield, Lilley ja White 1998). Seda inkubeeriti 37 °C juures 2 tundi, seejärel töödeldi ühe korra fenool-kloroformiga, segati laadimispuhvriga ning jätkati Southern blot meetodit kasutades.

### **3.2.5. Western blot**

Western bloti jaoks koguti katsutisse 30 äädikakärbest, kes külmutati vedelas lämmastikus. Neile lisati 300 µl homogeniseerimise puhvrit (PBS; 1,5% Triton X-100; Complete Mini EDTA-vaba proteaasi inhibiitor – 11836170001 Roche) ning purustati jääl. Saadud lüsaat inkubeeriti jääl 15 minutit, seejärel tseentrifuugiti 4° C 13 000 g juures 15 minutit. Saadud supernatant koguti ning selle kontsentratsioon määrati Bradfordini meetodil. Selle jaoks lisati 96-kohalisele plaadile igasse avasse 200 µl Bradfordini reagenti, mis seondub valguga moodustades sinise valgukompleksi, ning 2 µl 5x supernatandi lahjendust. Optilised tihedused mõõdeti 595 nm juures kasutades Omega spektrofotomeetrit. Tulemuste põhjal genereeriti kaliibergraafik, mille alusel määrati iga proovi kontsentratsioon. Mõõtmiste järel segati supernatant ja laadimispuhver (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,01% Serva Blue G; 4% SDS; 12% glütserool; 0,1 M DTT) vahekorras 1:1. See kuumutati 5 minutit 90 °C juures. Westerni jooksumiseks avati BioRad Criterioni gradientne AnyKD (#5671124) eelvalatud geelipakk, eemaldati kamm ning loputati hambaid 10 korda MQ veega. Geeli jooksumati BioRad Criterion voolutussüsteemis,

puhvriks kasutati eelvalmistatud ProSieve EX (Lonza) jooksutuspuhvrit. Igasse hambasse laaditi 80 µg proovi, igat genotüüpi neljas või viies bioloogilises korduses. Geeli jooksutati esimesed 15 minutit 70 V juures, seejärel tõsteti pinget 90 V juurde. Kui geel oli piisavalt kaugele jooksnud, murti geelikassett lahti, lõigati *stacking* osa maha ning inkubeeriti geeli ProSieve EX (Lonza) ülekande puhvris 5 minutit. Samal ajal tehti ka nitrotselluloosmembraan (GE Healthcare Amersham™ Protran® 0,45 µm) õrnalt märjaks MQ vees ning inkubeeriti koos filterpaberitega ülekande puhvris. Ülekanne viidi läbi RioRad Criterioni ülekandesüsteemis, mis koosnes käsnaast, kolmest filterpaberist, geelist, membraanist, veel kolmest filterpaberist ja käsnaast. Ülekande kamber täideti jooneni ülekande puhvriga, sellesse lisati külmakott ning magnetsegaja. Ülekanne kestis 35 V juures 50 minutit. Kui ülekanne oli sooritatud, võeti membraan kassetist välja ning inkubeeriti TBS-is 5 minutit. Pärast ülekannet inkubeeriti membraani primaarse antikeha inkubeerimispuhvris, et vähendada mittespetsiifilise seondumise võimalust. Primaarse antikeha blokeerimispuhvriks kasutati 5% BSA 1X TBS 0,1% Tween. Seejärel eemaldati blokeerimispuhver, mis asendati primaarse antikeha sisaldava puhvri vastu (vt Tabel 1). Membraanid primaarse antikehaga asetati loksutile 4 °C juurde, kus neid hoiti üleöö. Primaarse antikehaga puhver eemaldati, membraane loputati 3 korda 1X TBS 0,1% Tween suspensiooniga, seejärel pesu 3 korda 15 minutit loksutil sama suspensiooniga.

**Tabel 2.** Antikehad ning nende lahjendusastmed

Antikeha	Primaarse antikeha inkubatsioonipuhver	Primaarse antikeha lahjendusaste	Sekundaarse antikeha inkubatsioonipuhver	Sekundaarse antikeha lahjendusaste
Anti-atsetüül-coA-karboksülaas (mAb C83B10)	5% BSA 1X TBS 0,1% Tween	1 : 10 000	5% piimapulber 1X TBS 0,1% Tween	1 : 10 000
Anti-atsetüleeritud lüsiin	5% BSA 1X TBS 0,1% Tween	1 : 10 000	5% piimapulber 1X TBS 0,1% Tween	1 : 10 000

Sekundaarse antikeha blokeerimispuhvriks kasutati 5% rasvavaba lõssipulbrit 1X TBS 0,1% Tween, kuhu lisati 10 0000 x lahendusega peroksüdaasiga konjugeeritud sekundaarne

küülikuvastane antikeha. Sekundaarse antikeha lahuses inkubeeriti membraani 3 tundi. Pesuks kasutati sama meetodit, mis primaarsel antikehal. Visualiseeriti BioRad Clarity Western ECL Substrate abil, mida tilgutati ühtlaselt üle membraani ning lasti inkubeerida 5 minutit. Kogu valgu kogusega võrdlemiseks tehti samadest membraanidest pilt ka Ponceau'ga värvimisest. Selle jaoks inkubeeriti membraane toatemperatuuril 5 minutit 0,1% Ponceau 5% äädikhappe lahuses ning loputati MQ vees. Andmete visualiseerimiseks kasutati BioRad ChemiDoc XR detektsioonisüsteemi ning andmed kvantifitseeriti kasutades ImageLab ja ImageQuant tarkvara. Analüüsimiseks kasutati optimaalse pikkusega säriaega ning kvantifitseerimistulemuse normaliseerimiseks valiti mitu taustapiirkonda membraanil.

### 3.2.6. Statistiline analüüs

Kõikide katsete tulemusi analüüsiti nii Exceli kui ka GraphPad Prism 6 programmidega. Töös kasutati Western blot puhul 4 või 5 bioloogilist kordust, Southern blot puhul 5 tehnilist kordust. Statistiline relevantsus determineeriti kahesuunalise Student t-testiga. Antud testi p-väärtuste tähised graafikutel on ns (ingl k *not significant*) – statistiliselt mitterelevantne, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Graafikud koostati GraphPad Prism 6 programmiga. Jooniste genereerimiseks kasutati Microsoft PowerPointi, GIMP-2.10 ning CorelDRAW2021.

### 3.3. Tulemused

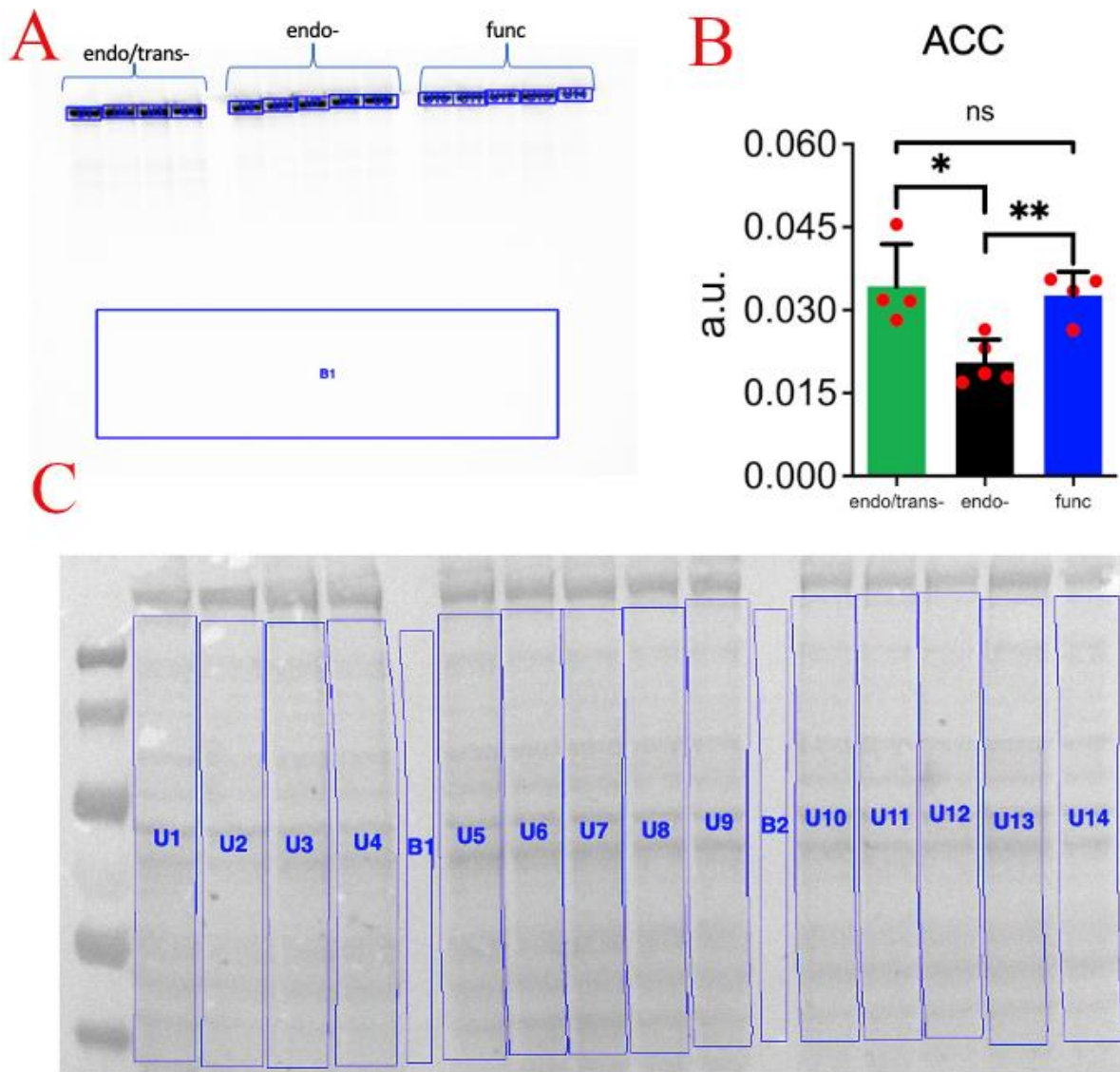
Käesolevas töös uuriti *Sra knockdown*'i (KD) mõju mtDNA topoloogiale ning katabolismi ümberkorraldustele. Transkriptoomika analüüsil on leitud, et võrreldes kontrolltüvega (endo/trans-) on mtDNA stressi tingimustes märgata *Sra* üleekspressiooni (Ots, 2018). Seetõttu on käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, mis juhtub kui vähendada *Sra* taset läbi RNAi. Varasemalt on meie uurimisgrupp näidanud, et mitokondriaalne stress põhjustab *tubGS>mtEcoBI* tüvedes süsivesikute kasutamise defekti (Bahhir jt, 2019) ning erinevalt *tubGS>mtEcoBI* tüvedest, kus lipiide siiski veel kasutati, puudus *Sra* KD puhul ka lipiidide kasutamise võime (publitseerimata andmed). Seetõttu uuriti *Sra* mõju *mtEcoBI* poolt põhjustatud ümberkorraldustele metabolismil ja mtDNA topoloogiale.

#### 3.3.1 ACC ja AcK kvantifitseerimine

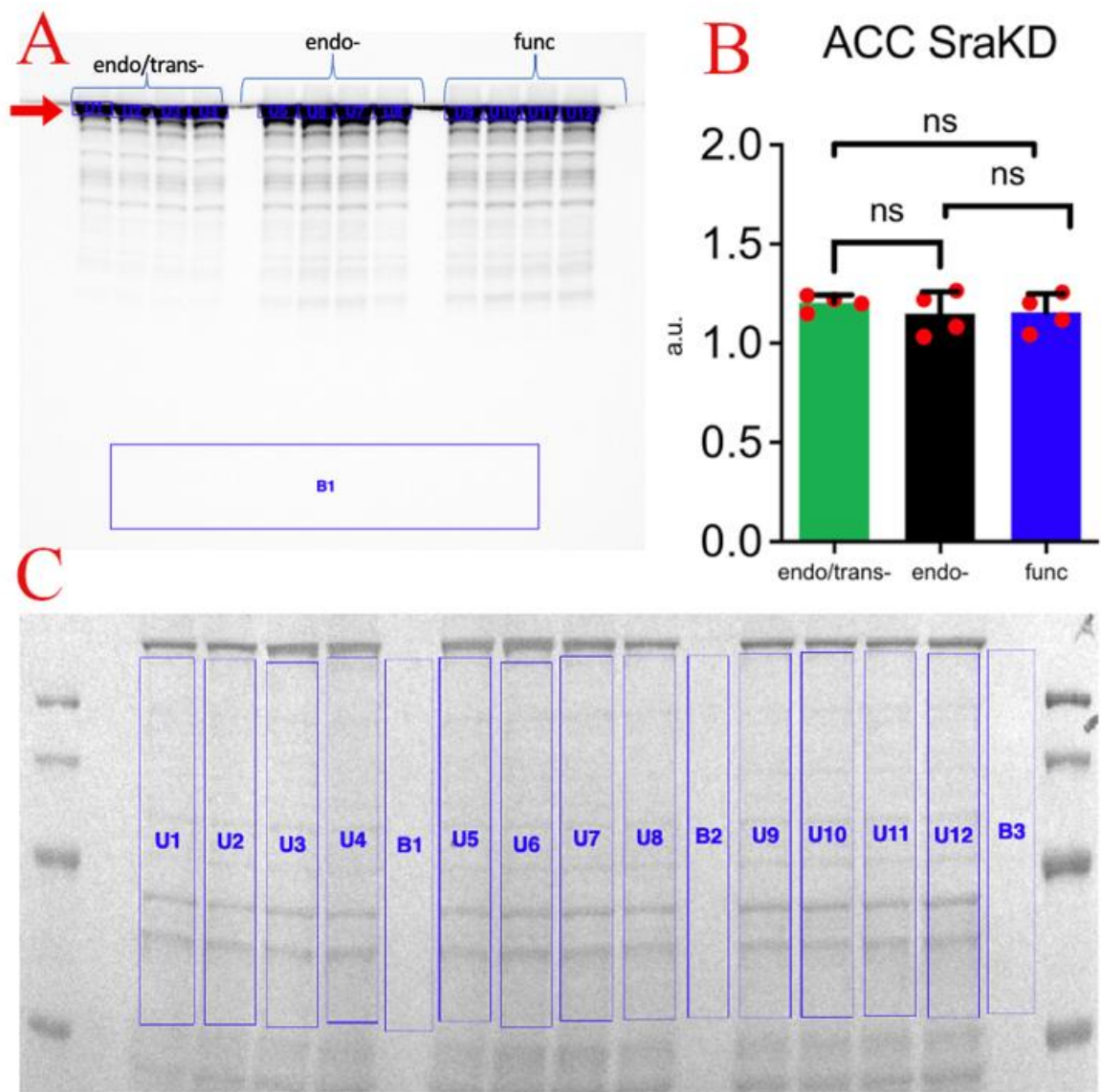
Kuna meie uurimisgrupis on varem leitud lipiidide kasutuse vähenemine mtDNA stressi korral *Sra* KD tõttu, kontrolliti käesolevas töös Western blot meetodi abil *Sra* KD mõju ACC (atsetüül-koensüüm-A karboksülaas) valgu tasemele erinevates *mtEcoBI* isovorme

ekspresseerivates tüvedes. Kuigi lipogeneesi reguleerivaid etappe on mitu, on ACC keskne ensüüm lipogeneesil, mis määrab ka kogu sünteesiraja kiiruse. Seetõttu kontrolliti, kas mtDNA stress mõjutab ACC taset, kuna selle valgu taseme tõus viitaks suurenenud rasvade kasutusele *Drosophila*'s, seega mida rohkem on ACC-d, seda aktiivsem võiks olla lipiidide tootmine. Kuivõrd meie uurimisgrupi eelnevad leiud viitasid, et mtDNA stress inhibeerib suhkrute tarbimist, hakatakse kataboliseerima teist peamist süsinikuallikat, lipiide (Bahhir, 2019). Kui *Sra* tase alla suruda, inhibeeritakse lipiidide tarbimist (Ots, 2018), mistõttu peaks langema ka ACC tase.

Nagu on näha jooniselt 6, on võrreldes kontrolltüvega ehk endo/trans- tüvega märgata vähenenud ACC taset endo- tüves, samas kui funktsionaalses tüves on see võrdväärne kontrolltüvega. Lisaks on *tubGS>mtEcoBI* funktsionaalse ja endo- tüvede vaheline erinevus pea kahekordne, mis viitab suurenenud rasvade kasutamisele funktsionaalses tüves. Kui samaaegselt *mtEcoBI* ekspressiooniga vähendada *Sra* taset, siis ACC taseme erinevus tüvede vahel kaob (vt Joonis 7), mis viitab *Sra* geeni üleekspressiooni rollile süsiniku katabolismi ümberkorraldustes. Samuti pole *Sra* KD korral märgata erinevusi teiste tüvede omavahelisel võrdlusel.



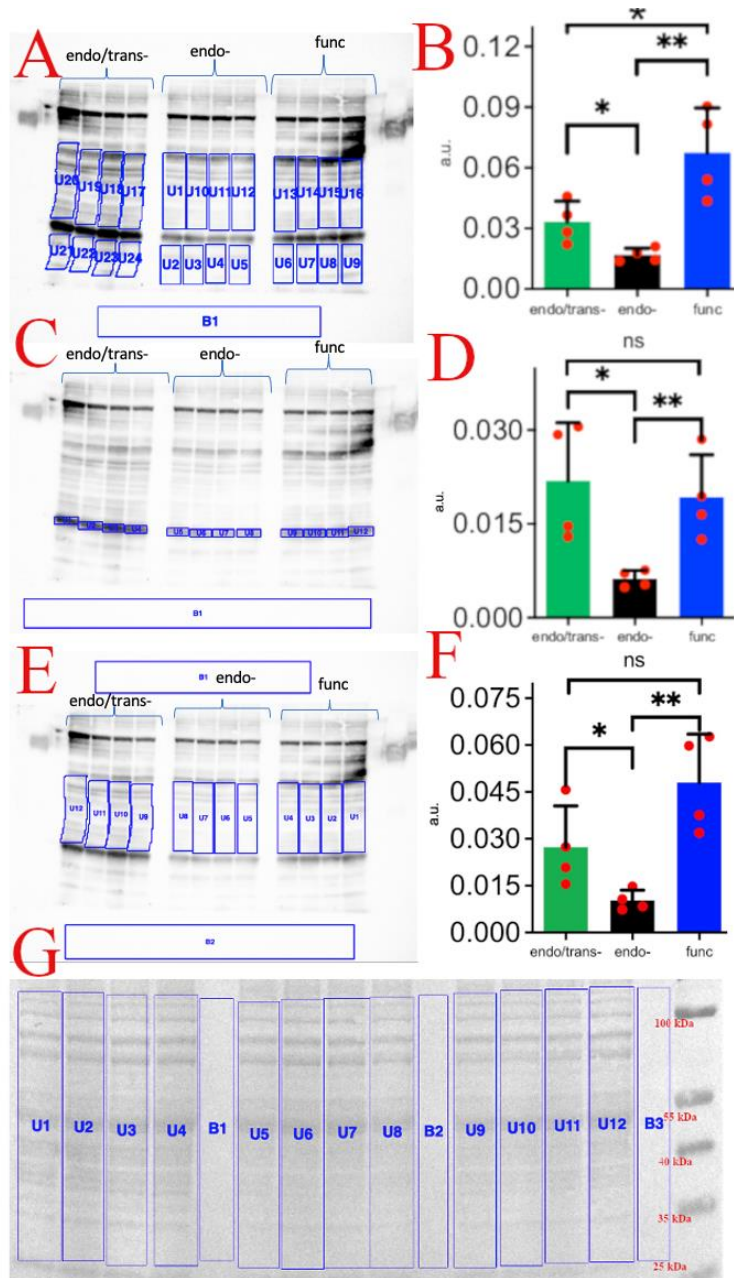
Joonis 6. ACC tulemused ilma *Sra* KD. A – Western blot ACC antikehaga, kvantifitseeritud ala märgistatud siniste kastikestega, B1 tähistab tausta. Endo/trans- tüvi 4 bioloogilises korduses, funktsionaalne ja endo- 5 bioloogilises korduses. B – kvantifitseerimise tulemused Ponceau S-ga visualiseeritud valgusignaali vastu. Funktsionaalse tüve puhul jäeti viimase rea tulemus tehnilistel põhjustel välja, sest selle rea Ponceau S signaal oluliselt madalam kui teistel. C – Ponceau S-ga värvitud membraan, B1 ja B2 on taustad. endo/trans- - inaktiivset mtEcoBI-d kandev tüvi, *tubGS*>mtEcoBI endo/trans-; endo- - translokatsioonilise aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi, *tubGS*>mtEcoBI endo-; func. – translokatsioonilise ja endonukleasse aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi. ns (ingl *not significant*) – statistiliselt mitterelavantne \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



Joonis 7. ACC tulemused *Sra* KD-ga. A - Western blot ACC antikehaga, noolega tähistatud ACC spetsiifiline seostumissait, siniste ruutudega on kvantifitseerimisel kasutatud ala. Endo/trans- tüvi 4 bioloogilises korduses, funktsionaalne ja endo- 5 bioloogilises korduses. B - kvantifitseerimise tulemused Ponceau S-ga visualiseeritud valgusignaali vastu. C – Ponceau S-ga värvitud membraan, B1-B3 defineeritud taustana. endo/trans- - inaktiivset mtEcoBI-d kandev tüvi, *tubGS*>mtEcoBI endo/trans-; endo- - translokatsioonilise aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi, *tubGS*>mtEcoBI endo-; func. – translokatsioonilise ja endonukleasse aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi. ns (ingl k *not significant*) – statistiliselt mitterelevantne, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

Nagu kirjanduse ülevaates kirjeldatud, on tsentraalse süsiniku katabolismi defekti seostatud valkude atsetülatsiooni taseme langusega läbi AcCoA/tsitraadi taseme muutuse (Menzies jt., 2016; Hosp jt., 2017). Kuna atsetülatsioonil on keskne roll mitmete metaboolsete ensüümide regulatsioonil ja see võib olla vähemalt üheks metabolismi muutvaks põhjuseks, sooviti käesolevas töös kontrollida, kas *Sra* KD muudab valkude atsetülatsiooni. Selle uurimiseks viidi läbi Western blot atsetüleeritud lüsiini (AcK) vastase antikehaga. Katsest selgus, et endo- tüvel

*Sra* KD puhul on atsetülatsiooni tase märkimisväärselt langenud (vaata Joonis 8B, Joonis 8D, Joonis 8F), kuid funktsionaalsel tüvel *Sra* KD aga taastab esialgse atsetülatsiooni taseme või isegi ületab seda.



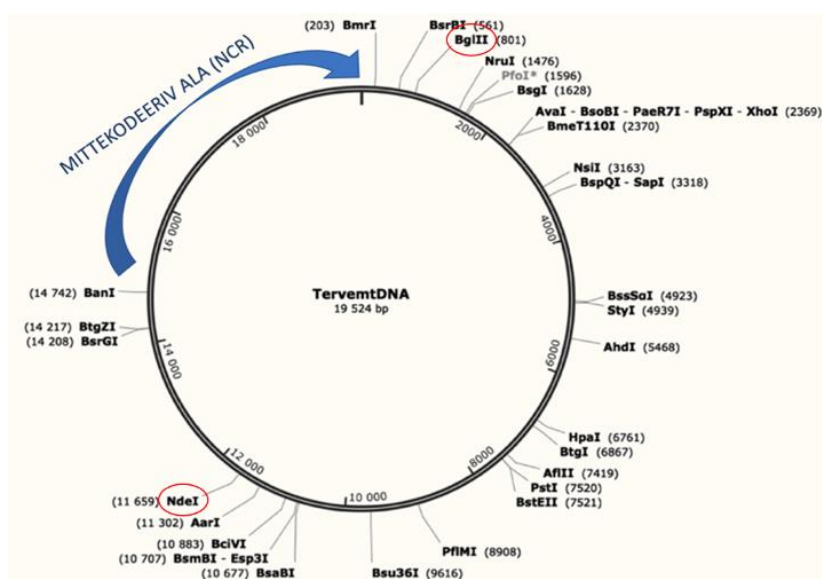
Joonis 8. AcK tulemused *Sra* KD tüvedele. Kõik tüved 4 bioloogilises korduses. A – Western blot AcK antikehaga, sinisega üldatsetüleerituse kvantifitseerimiseks valitud alad. B – kvantifitseerimise tulemused Ponceau S-ga visualiseeritud valgusignaali vastu, kogu rida. C – Western blot AcK antikehaga, 40 kDa suuruse valgu kvantifitseeritud ala. D – kvantifitseerimise tulemused Ponceau S-ga visualiseeritud valgusignaali vastu, ainult 40 kDa valk. E – Western blot AcK antikehaga, atsetüleerituse hindamiseks valitud alad märgitud sinisega. F – kvantifitseerimise tulemused Ponceau S-ga visualiseeritud valgusignaali vastu, 55 kDa – 40 kDa suurused valgud. G – Ponceau S-ga värvitud membraan. endo/trans- - inaktiivset mtEcoBI-d kandev tüvi, *tubGS*>mtEcoBI endo/trans-; endo- - translokatsioonilise aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi, *tubGS*>mtEcoBI endo-; func. – translokatsioonilise ja endonukleasse

aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi. ns (ingl k *not significant*) – statistiliselt mitterelevantne, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

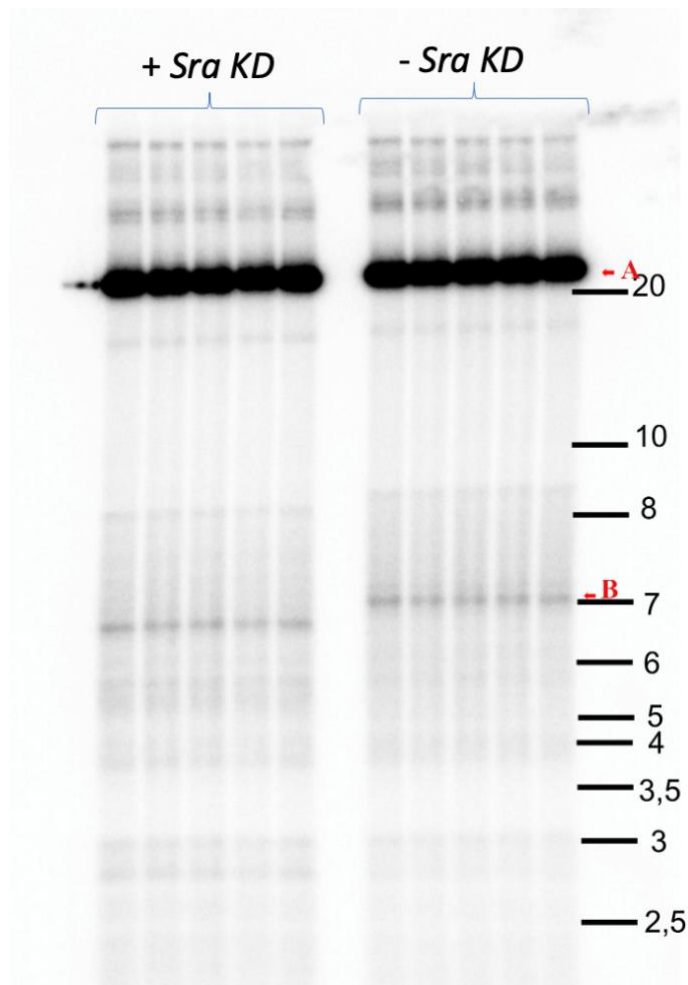
### 3.3.2. mtDNA topoloogia muutused mtEcoBI ekspressiooni ja *Sra* KD korral.

Eelnevalt on leitud, et *Sra* üleekspressioon toimub vastusena mitokondriaalsele stressile (Ots, 2018). See võiks viidata *Sra* mtDNA-d kaitsevale efektile, mis limiteerib mtEcoBI mõju mtDNA-le. Selle kontrolliks ning mtDNA fragmenteerituse uurimiseks viidi läbi Southern blot, kus kasutati restriksiooniensüümide NdeI ja nii NdeI kui ka BglII (vt Joonis 9) poolt lõigatud mtDNA-d.

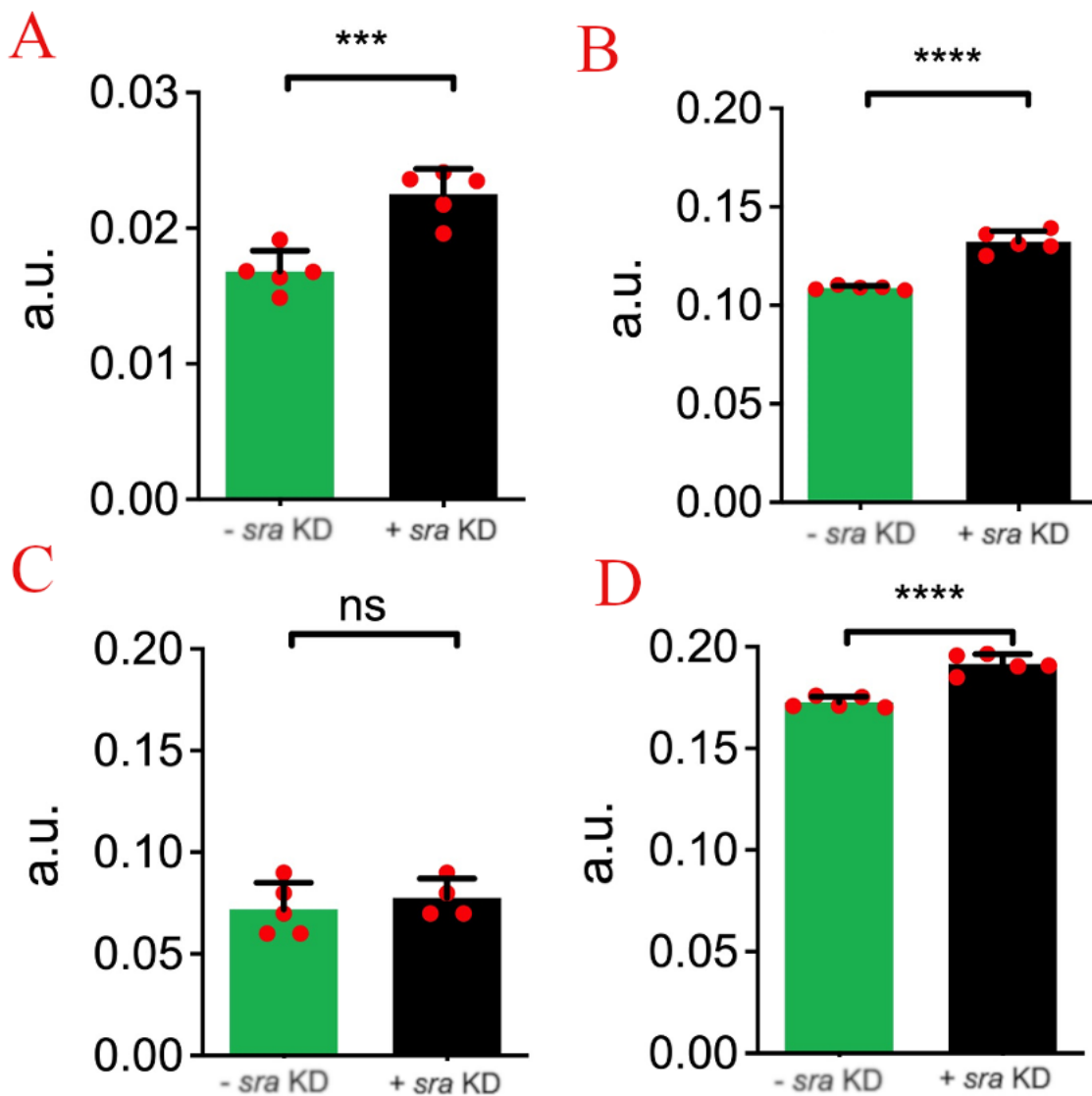
Funktsionaalse tüve Southern bloti analüüsist (vt Joonis 10) selgus, et *Sra* KD korral oli mtDNA fragmenteeritus suurem kui ilma *Sra* KD-ta (vt Joonis 11), mis viitab sellele, et *Sra* üleekspressioon vähendab mtDNA fragmentatsiooni mtEcoBI ekspressiooni kontekstis. Kuna mittekodeerivast alast väljapoole jäänud ala kvantifitseerimisel oli näha väiksemat fragmenteeritust kui mittekodeerival alal (vaata Joonis 11B), võib eeldada, et mtDNA fragmenteeritus, mille eest *Sra* kaitseb, on tugevam just mittekodeerivas regioonis.



Joonis 9. mtDNA molekul koos restriksiooniensüümidega. Mittekodeeriv ala tähistatud sinise noolega. Punaste ovaalidega tähistatud kasutatud restiktsiooniensüümid. Joonis kohandatud SnapGene Viewer põhjal.



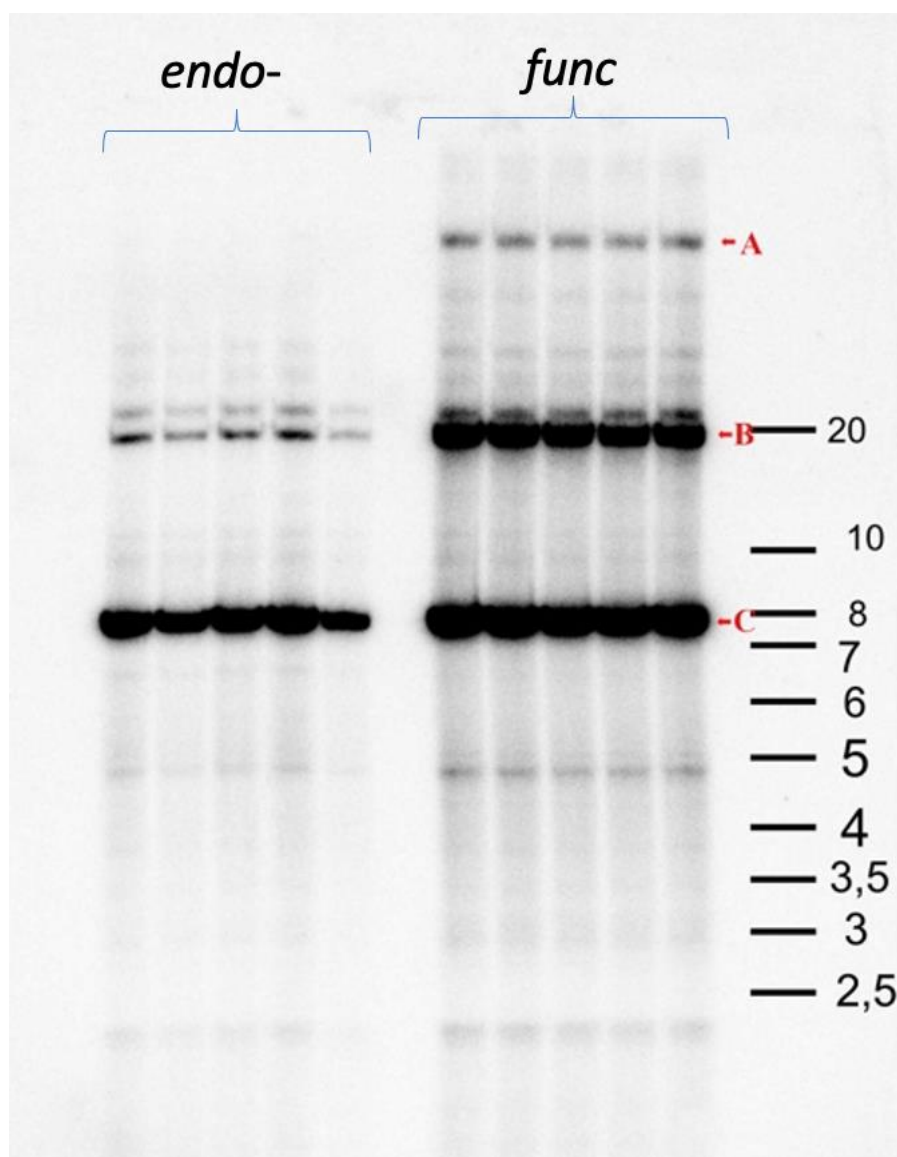
Joonis 10. mtDNA topoloogia NdeI lõikega ainult funktsionaalsele tüvele. + *Sra* KD tähistab *Sra* KD-ga tüve ning – *Sra* KD ilma *Sra* KD-ta tüve. Mõlemat tüve 5 tehnilist kordust. Noolega tähistatud A - mtDNA, B - mittekodeeriv ala (NCR).



Joonis 11. Funktsionaalse tüve + *Sra* KD ehk *tubGS*>funktsionaalne mtEcoBI, *Sra* KD ning -*Sra* KD ehk *tubGS*>funktsionaalne mtEcoBI tulemused. Mõlemat tüve 5 tehnilist kordust. A – mittekodeeriv ala kvantifitseerimise tulemused jagatud terve mtDNA (19,5 kbp) kvantifitseerimise tulemustega. B – mittekodeerivast alast suuremate fragmentide kvantifitseerimiste tulemused jagatud terve mtDNA kvantifitseerimiste tulemustega. C – mtDNA ja mittekodeeriva ala vaheline lõik (15 kbp – 19,5 kbp suurused fragmendid) jagatud mtDNA kvantifitseerimiste tulemustega. D – alla 19,5 kbp suuruste fragmentide kvantifitseerimise tulemused jagatud terve mtDNA (19,5 kbp) kvantifitseerimiste tulemustega. ns (ingl k *not significant*) – statistiliselt mitterelevantne, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

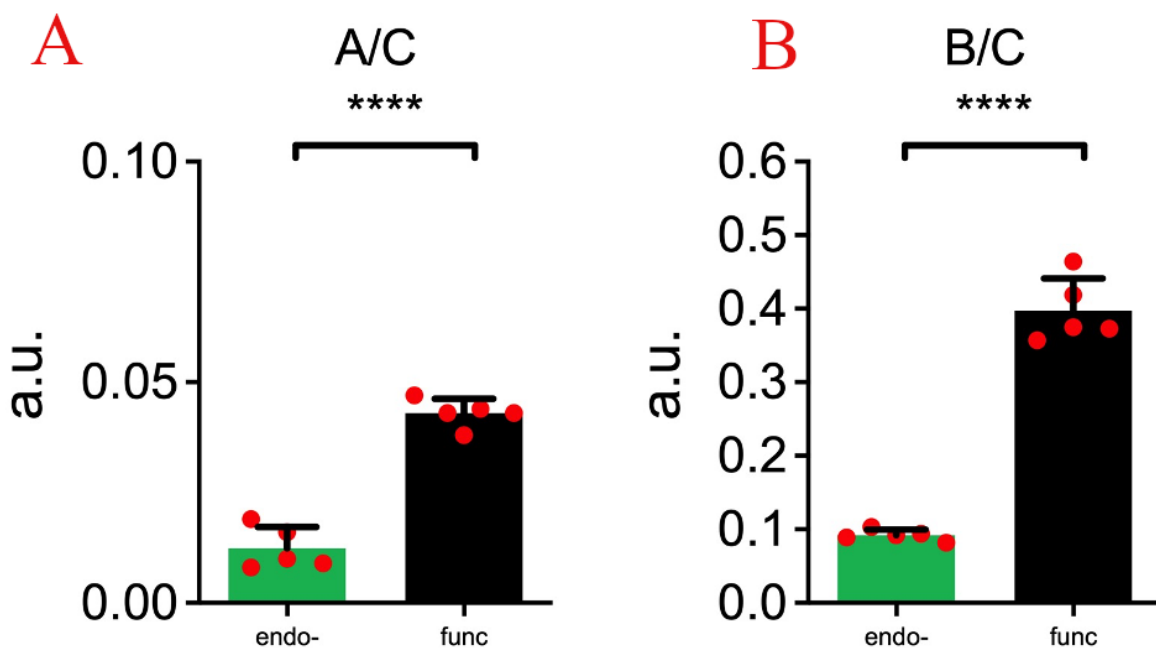
Katsest, mille eesmärgiks oli leida tüvedevahelisi erinevusi, leiti, et funktsionaalsel tüvel oli võrreldes endo- tüvega märgata suuremat lineaarse mtDNA kogust (vaata Joonis 13B). Lisaks suuremale lineaarse mtDNA kogusele on sellel märgata ka tundmatut vormi, mis jooksis kõrgemal geeli lineaarseid molekule lahutavast alast (vt joonis 12). Lahutavast alast väljajäävas regioonis lihtsaid lineaarseid fragmente ei leidu, seal migreeruvad kompleksed struktuurid ja rõngasmolekulid (ingl k *relaxed circles*) (Torregrosa-Muñumer jt., 2019). NdeI lõikuse korral

(vt Joonis 10) polnud seda vormi näha, sest siis lõigati molekuli vaid ühest kohast ning seetõttu oli ilmselt tegu liiga suure molekuliga, et ta üldse hambast välja migreeruks, seega eeldab töö autor, et tegu võib olla kahe mtDNA molekuli vahelise Holliday ühendusega. Kui kaks mtDNA molekuli on omavahelises kontaktis NCR-i kaudu, siis BglII ja NdeI lõikuse korral muundub Holliday ühendusega molekulid restriksiooniensüümide poolt X-kujuliseks molekuliks, mis on väiksem ja võib seetõttu sisenda geeli (González de Cózar jt., 2019) (vaata Joonis 14). Selle tundmatu vormi analüüsiks töödeldi proove enne Southern blottimist CCE1-ga, mis on Holliday ühendusele spetsiifiline endonukleas, mis harutab lahti DNA rekombinatsiooni käigus tekkinud vaheühendid (Schofield, Lilley, White, 1998). See avab X-kujulise struktuuri krossingoveri 3' tümiini juurest, moodustades 4-kordse sümmeetrilise struktuuri (Whitby ja Dixon, 1998).

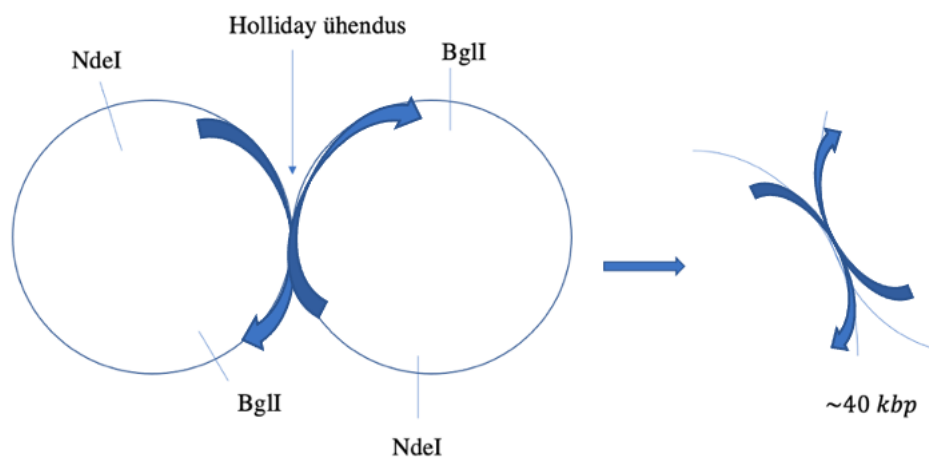


Joonis 12. mtDNA topoloogia mtEcoBI *Sra* KD tüves BglII ja NdeI lõike korral. Mõlemat tüve 5 tehnilist kordust. Joonisel näidatud punase noolega A tundmatu fragment, B on terve mtDNA, C on BglII ja NdeI restriksioonifragment. endo- - translokatsioonilise aktiivsusega mtEcoBI-d

kandev tüvi, tubGS>mtEcoBI endo-; func. – translokatsioonilise ja endonukleasse aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi.

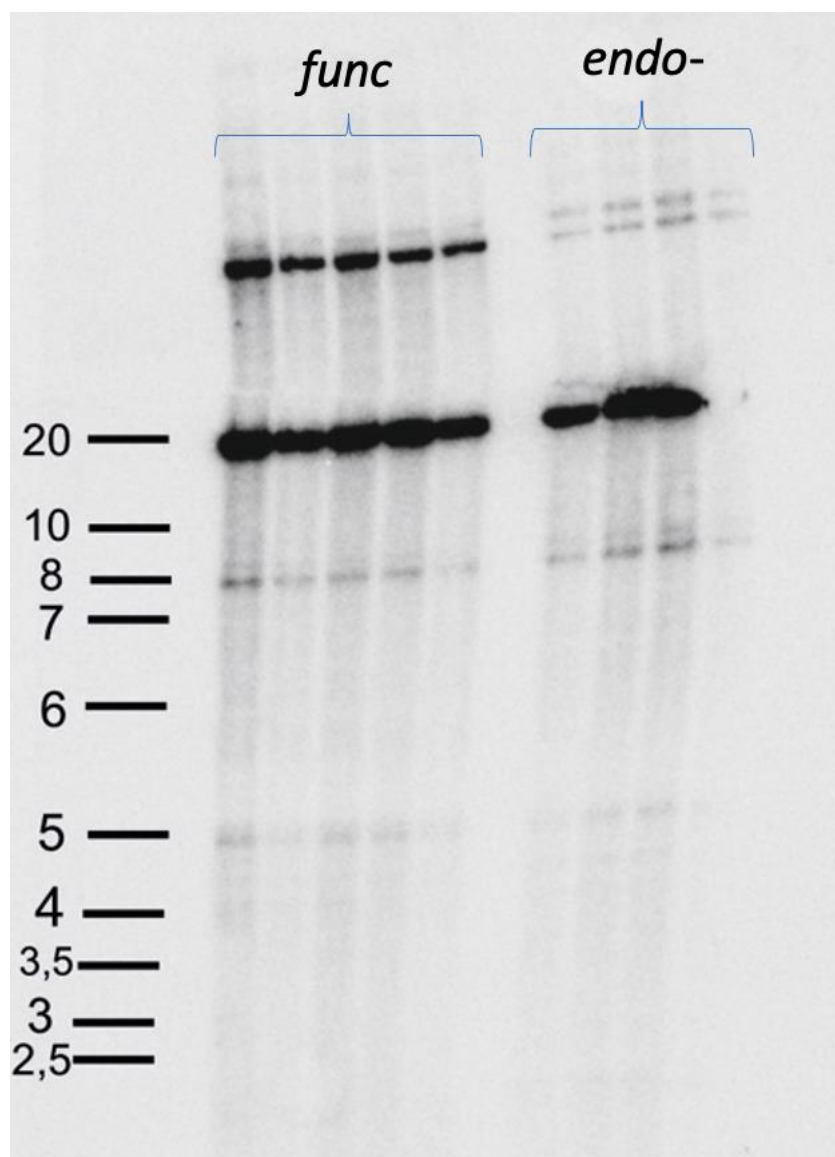


Joonis 13. NdeI ja BglII lõikuse tulemused *endo-* ja *func* tüvedele. Mõlemat tüve 5 tehnilist kordust. A – tundmatu fragmendi kvantifitseerimise tulemused jagatud BglII ja NdeI lõike kvantifitseerimise tulemusega. B – terve mtDNA kvantifitseerimise tulemused jagatud BglII ja NdeI lõike kvantifitseerimise tulemusega. ns (ingl k *not significant*) – statistiliselt mitterelevantne, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$



Joonis 14. Funktsionaalses tüves tekkiva tundmatu fragmendi võimaliku tekke selgitus. Vasakul on kahe mtDNA rõngasmolekuli vahele tekkinud Holliday ühendus. Paremalt on pärast lõiget BglII ja NdeI restriksiooniensüümidega, tekitades X-kujulise molekuli. Siniste nooltega on kujutatud mittekodeeriv ala.

CCE1 töötlus võrreldes ilma CCE1 töötluseta ei vähendanud tundmatu vormi olemasolu funktsionaalsel tüvel (vt Joonis 12; vt Joonis 15). See võib viidata sellele, et tegu ei olnud siiski Holliday ühendusega, vaid hoopis mõne muu mitte-lineaarse molekuliga, mis jookseb ülespool kompressioonipiirkonda.



Joonis 15. mtDNA topoloogia mtEcoBI *Sra* KD funktsionaalses ja endo- tüves BglII ja NdeI lõike korral pärast CCE1 töötlust.

### 3.4. Arutelu

Käesolevas töös leiti vähenenud ACC kogus funktsionaalses tüves *tubGS*>mtEcoBI puhul, kus vahe oli pea kahekordne võrreldes endo- tüvega, mis võib viidata vähenenud lipogeneesi aktiivsusele. Tulemustes presenteeritud ACC väiksem kogus endo- tüves on paradoksaalne, sest endo- tüvel on siiani märgata olnud suuremat triatsüülgütseroolide varu hulka kui teistel tüvedel (Bahhir, 2017). See erinevus leidude vahel viitab seni tundmata mehhanismi toimumisele. Endo- tüves võib võrreldes funktsionaalse tüvega olla rasvade tarbimine piiratum

kuna käesoleva töö autori jaoks tundmatu mehhanismi abil tuntakse ära suurenenud rasvade kogus, mistõttu ACC-d reguleeritakse alla ATP koguse muutmise kaudu. Kui ATP-d on rakus vähe, suureneb 5' AMP kogus, mis aktiveerib 5' AMPK, mis omakorda fosforüleerib ACC, mis inhibeerib rasvade sünteesi (Park jt., 2002). Kuna ATP kogus on funktsionaalses tüves madalam kui endo- tüves (Bahhir jt., 2019), võib ACC suurem kogus võrreldes endo- tüvega olla seotud funktsionaalse tüve suurema „näljaga“ ATP järele, mille tulemusena ACC reguleeritakse üles sellest endo- tasemelt. Sellisel juhul ei ole ATP vähenemine peamine surma põhjus nagu arvas Bahhir oma 2019. aasta magistritöös, vaid pigem on letaalsus tingitud mitme faktori koostoimest.

On teada, et mtEcoBI translokatsiooniline aktiivsus inhibeerib insuliini signaali (Bahhir jt., 2019). Insuliin suurendab rasvhapete hulka adipotsüütides, mis on vajalikud esterdamiseks, stimuleerimaks *de novo* lipogeneesi. Sterooli reguleerivat elementi siduv valk (SREBP) oli algselt identifitseeritud kui transkriptsioonifaktor, mis seondub sterooli reguleerivatele elementidele kolesterooli regulatsioonis ning adipotsüütide diferentseerumises oluliste geenide promootoralal. Kolmest SREBP perekonna valgust (SREBP-1a, SREBP-1c ja SREBP-2) on SREBP-1c hulgaliselt esindatud lipogeensetes kudedes ning selle transkriptsiooni indutseerib just insuliin. SREBP-1c stimuleerib mitmete lipogeensete geenide (*Fas*, *Lpl*, *Acc*, *Elovl6*, *Acl*, *Gpat* jt) transkriptsiooni, ja muuhulgas soodustab *de novo* lipogeneesi. See mehhanism võib olla põhjuseks, miks ACC tase on madalam just endo- tüves. Kuna ATP tootmise defekt on funktsionaalses tüves suurem, võib eelnevalt kirjeldatud mehhanismid näiteks AMP-aktiveeritud valgukinaasi (AMPK) kaudu tõsta ACC ekspressiooni endo- tasemelt kõrgemale. Kui ATP on rakus vähe, suureneb selle võrra AMP kogus, mis aktiveerib 5' AMPK, mis omakorda fosforüleerib ACC, mis inhibeerib rasvade sünteesi (Park jt., 2002). See viib ACC defosforüleerimiseni ehk ACC jälle aktiveerub ning lipogenees suureneb. (Kohjima jt., 2008)

Tulemustes nähtud ACC erinevuste kadu *Sra* KD korral viitab sellele, et mtDNA stressile vastusena tekkinud *Sra* üleekspressioon mängib rolli metaboolsel ümberkorraldusel. Selle täpne mehhanism on hetkel veel selgusetu, kuid kuna *Sra* üleekspressiooni puudumise korral pole näha ACC taseme muutust eri tüvedes, võib vastusena mtDNA stressile kaduda ka võime utiliseerida rasvu analoogselt süsivesikute tarbimise inhibitsioonile. *Sra* üleekspressioon võib seega olla see faktor, mis taastab vähemalt osaliselt rasvade tarbimise võime, mistõttu on näha lipiidide kadu ja ACC regulatsiooni taastumist. Meie andmete põhjal ei ole hetkel küll võimalik selle mehhanismi kohta kaugeleulatuvaid järeldusi teha, kuid tundub, et mtDNA stress mõjutab vähemalt ACC transkriptsiooni regulatsiooni.

Varasemalt oli teada, et valkude atsetülatsiooni tase langeb endo- ja funktsionaalsetes tüvedes vastusena mtEcoBI-le, mis on tõenäoliselt vähemalt üks põhjus drastiliselt lühenenud elueale. Valkude atsetülatsioonile viitab vähenenud tsütosoolse AcCoA tase. Kärbeste varustamine eksogeense tsitraadiga, eesmärgiga taastada tsütosoolse AcCoA tase, kompenseeris eluea kaotust endo- ning funktsionaalsetes tüvedes (Bahhir jt, 2019). See suurendas ka valkude atsetüleeritust ja normaliseeris teatud määral triatsetüülglütserooli taset. *Sra* KD korral on endotüvel endiselt märgata üldise atsetülatsiooni taseme vähenemist, kuid funktsionaalses tüves oli see üle kontrolltüve taseme. Meie uurimisgrupp pole selle fenomeni põhjuseid veel uurinud, kuid selle võimalikuks põhjuseks on atsetülatsiooni inhibitsiooni ületamine funktsionaalses tüves või suurenenud fosforüleeritud Akt koguse leid endo- tüves võrreldes funktsionaalse tüvega (Bahhir jt., 2019). Akt valgu aktiivsus sõltub 505ndas positsioonis oleva seriini fosforüleerituse tasemest ning kuna Akt inhibeerib apoptoosi kasvajakudedes ning mängib rolli ka insuliini reguleerimises, võib selle koguse reguleerimine eelkirjeldatud viisil viia rasvade hulga muutuseni, mis omakorda võib läbi tsitraadi muundumise AcCoA-ks tsitraadi lüaasi abil viia atsetülatsioonitaseme languseni.

mtDNA topoloogia analüüs näitas, et funktsionaalse tüve *Sra* KD korral oli mtDNA fragmenteeritus suurem kui ilma *Sra* KD-ta, mis viitab sellele, et *Sra* omab mtDNA-d kaitsvat rolli. Seetõttu võib varem täheldatud vähene fragmentatsioon (Bahhir jt, 2019) olla tingitud sellest, et mtDNA stressi tulemusena indutseeritakse *Sra* üleekspressioon. Võrreldes teiste aladega esineb katkeid kõige enam mittekodeerivas alas. Kuna Southern blot näitab vaid seda, mis toimub rakkudes mtDNA-ga konkreetsete tingimuste korral, on võimalik, et fragmendid küll tekivad, kuid need degradeeriti endogeense mehhanismi poolt enne geelil visualiseerumist (Peeva jt., 2018).

Mittekodeeriva ala lähedase BgIII lõike võrdlusele sellest kaugema lõikusega võib märgata, et alast kaugemal asuva restriksiooniensüümi lõikesaidil ei esinenud takistusi, seega peab olema blokeeritud mittekodeeriva ala lähedase restriksiooniensüümi lõikesait. Kuna mittekodeerival alal asub ka replikatsiooni *origin*, võib üheks seondumist takistavaks põhjuseks olla probleem replikatsioonikahvli sisenemisel mittekodeerivale alale, mille peatumise ja edasiste transaktsioonide tulemusena tekivad selle ümber erinevad keerulise struktuurid, näiteks lingud. Nende struktuuride esinemine takistab restriksiooniensüümide seondumist ja/või katalüüsi ning seeläbi võimet mtDNA-d lõigata. Samuti on võimalik, et funktsionaalses tüves on mtEcoBI liikumise tõttu mtDNA-l häiritud mitokondriaalne transkriptsioon, mille tulemusena võivad sinna tekkida RNA-DNA heterodupleksid (Shaw ja Arya 2008). RNA-DNA heterodupleksid tekivad kui transkriptid hübriidiseeruvad DNA-le ning protsessitakse

praimeriteks, misjärel algab replikatsioon mahajääval ahelal, kus transkriptsiooni poolt genereeritud RNA-d kasutatakse iga 100-200 nukleotiidi järel (Jöers jt, 2013). Kui selliste DNA-RNA heterodupleksite töötlemine RNA praimeriteks ja edasine DNA süntees on häiritud, võivad RNA-DNA heterodupleksid püsima jääda või muunduda ssDNA-ks (Shaw ja Arya 2008). Samuti ei saa välistada nende kahe mehhanismi koostoimet. Sellest tulenevalt võibki Sra roll olla seotud replikatsiooni elongatsiooni viimase lõiguga ja/või selle terminatsiooniga.

Funktsionaalse tüve korral oli näha palju lineariseeritud mtDNA-d ning tundmatut vormi, mis asus kompressiooniala kohal. Sinna migreeruvad enamasti suure takistusega mitte-lineaarsed molekulid. Näiteks võivad seal asuda replikatsioonivigadest tulenevad y-kujulised replikatsioonikahvli liikumisel tekkinud molekulid või rekombinatiivselt ühinenud lineaarsed fragmendid (Torregrosa-Muñumer jt., 2019). Samuti võivad kompressioonialal asuda katenaanid ning ilma superspiralisatsioonita mtDNA rõngasmolekulid (Torregrosa-Muñumer jt, 2015). Autor leidis, et tegu pole superspiralisatsioonita mtDNA rõngasmolekuliga, mis on tekkinud kahe restriктаasi seondumissaitide blokeerimisel, sest sellisel juhul oleks pidanud signaal olema vähemalt sama tugev (vt Joonis 10, vt Joonis 12) (González de Cózar jt., 2019). Seetõttu oletas käesoleva töö autor, et selleks tundmatuks vormiks on kahe mtDNA molekuli vahele tekkinud Holliday ühendus, mis samuti asub kompressioonitsooni kohal (González de Cózar jt., 2019). Selle hüpoteesi kinnituseks tuleks läbi viia 2D analüüs, mille jaoks käesoleva töö autoril aeg puudus.

Mitokondriaalse CCE1 endonukleaasi töötamise puhul tundmatu fragment küll ei kadunud, kuid siinkohal võib olla põhjuseks ensüümi preparaadi vanus. Ajapuuduse tõttu käesoleva töö autor uut CCE1 preparaati puhastada ei jõudnud. Samuti ei jõutud teha võrdlevat NdeI/BglIII lõikust *tubGS*>mtEcoBI tüvedele, seetõttu ei saa kindlalt väita, et tundmatu fragmendi olemasolu on seotud mtEcoBI või Sra KD-ga, kuigi töögrupi eelnevates katsetes *tubGS*>mtEcoBI tüvedega NdeI/BglIII lõikuse korral pole sellist fenomeni nähtud (publitseerimata andmed), mistõttu on tõenäoline, et Sra takistab mtEcoBI poolt põhjustatud mtDNA fragmentatsiooni/topoloogia muutusi, mis on eriti tugevad NCR-s ja selle vahetus läheduses.

Sral on kindel mõju metabolismi ümberkorraldustele, kuid siiski on ebaselge, kas see mõju on tal läbi tema funktsiooni tsütoplasmas kaltsineuriini inhibiitorina või tema teisest, kaltsineuriinist erinevast ja siiani kirjeldamata, rollist mitokondriaalse valguna. Kaltsineuriini puhul on siiani uuritud küll pigem selle rolli kesknärvisüsteemis, kuid see ei välista, et tal võib olla ka senini tundmatu roll metabolismiradade ümberkorralduses. Näiteks on täheldatud tema rolli TAG-ide tarbimisel (Ots, 2018) ning tema homoloogi, DSCR1, rolli katabolismi

muutmisel, kus DSCR1 üleekspressioon nihutab katabolismi glükolüüsi suunas (Ermak, Morgan ja Davies 2001). Siiski arvestades tema rolli kaasasündinud haiguste puhul, nt Downi sündroom ja Alzheimeri tõbi, võimaldavad käesolevas töös kirjeldatud seosed mtDNA stressi ja Sra vahel leida uusi seoseid mitokondrite ning nende haiguste vahel ning viivad loodetavasti tulevikus uute ravimite loomiseni.

## KOKKUVÕTE

Meie uurimisgrupi varasema töö käigus on avastatud, et mtDNA stressi vastusena toimub ühe valgu, *Sra*, üleekspressioon. *Sra* on valk, mis toimib tsütoplasmas kaltsipressiinina, kuid teda on kirjeldatud ka mitokondrites, kus ta mõjutab mtDNA-d ja OXPHOS-i läbi seni tundmatut funktsiooni. Meie uurimisgrupi varasema töö tulemusena on välja selgitatud *Sra* olulisus metabolismi reguleerimises (Ots, 2018).

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas valk *Sra* mõjutab mitokondriaalse DNA stressivastuse metaboolset signatuuri ning kas see kaitseb mtDNA-d fragmenteerituse eest. Selleks uuriti valkude üldatsetülatsiooni ning võrreldi mtDNA killustust *Sra* taseme langetamise korral ning tavatasemel.

Minu töö tulemusena selgus, et indutseeritud mitokondriaalse DNA stressi korral oli ACC tase translokatsioonilise aktiivsusega mtEcoBI-d kandvas tüves palju madalam, mis viitab, et seal kasutatakse rasvu rohkem kui teistes tüvedes. See erinevus kadus aga *Sra* koguse vähendamise korral. Ka valkude atsetülatsiooni tase oli translokatsioonilise aktiivsusega mtEcoBI-d kandval tüvel märkimisväärselt väiksem, mis viitab süsiniku katabolismi defektidele.

Kuna *Sra* taseme langetamise korral on mtDNA fragmenteeritus suurem kui tavatasemel, tundub *Sra* üleekspressioonil olevat roll mtDNA normaalse metabolismi tagamisel, seda eriti mittekodeeriva ala sees ja vahetus läheduses. Kuna mittekodeerival alal asub ka replikatsiooni alguspunkt, viitab see leid *Sra* rollile mtDNA ning selle replikatsiooni kaitses. Funktsionaalse tüve puhul tekkis mtDNA fragmenteerituse käigus mitte-lineaarne struktuur, milleks võib olla Holliday ühendus.

Käesoleva töö andmetest saab järeldada, et *Sra*l on tõesti roll rasvade metabolismis ning mtDNA kaitsel, kuid täpsete mehhanismide väljaselgitamiseks jätkab uurimisgrupp tööd.

## **The effects of Sra due to mitochondrial stress on mtDNA's topology and catabolism**

Mirjam Reino

### Summary

Previous work done by our research group has shown overexpression of a protein called Sra in response to mitochondrial stress. Sra functions in the cytoplasm as a calcipressin but has been related to changes in mtDNA and OXPHOS in the mitochondria without any clear function to date. Nevertheless, our research group has shown that Sra plays a role in regulating *Drosophila's* metabolism (Ots, 2018).

The aim of this thesis is to find out whether Sra affects mitochondrial DNA's metabolic stress signature and if it protects mtDNA against fragmentation. For that, the acetylation of proteins and the difference of fragmentation between *Sra* knockdown and regular *Sra* levels were analyzed.

My research concluded that in case of induced mitochondrial DNA stress, there was an increase in the use of fats in the strain with translocational activity compared to other strains. This difference faded once Sra knockdown was induced. Furthermore, the level of acetylation in the strain with translocational activity was remarkably lower, which might indicate defects in the catabolism of carbon compounds.

In case of *Sra* knockdown, the fragmentation of mtDNA was significantly higher than in case of normal *Sra* levels. This might indicate that Sra plays a role in maintaining the normal metabolism, especially near and in the noncoding region. The origin of replication is located in the noncoding region which might suggest that Sra plays a role in the protection of both mtDNA and its replication. In case of the functional strain, a non-linear structure was discovered along with the increased fragmentation, but due to time limitations, this discovery was not further studied.

From the data collected from this thesis one can conclude that Sra indeed plays a role in the metabolism of fats and protection of mtDNA and the research group will continue to study the exact mechanisms of this phenomenon.

## **Tänuõnad**

Sooviksin tänada oma juhendajat, kaasprofessor Priit Jõersi, töö kirjutamise motiveerimise ning nutikate nõuannete eest. Samuti sooviks tänada kõiki üldise ja mikroobiokeemia labori töötajaid suurepärase töökeskkonna tekitamise eest. Lisaks sooviks tänada töökaaslast, kes mind raskel ajal motiveerisid ning tehtud tööd tunnustasid ning Koit Aasumetsa ja Liina Otsa, kes töö kirjutamise sujuvamaks muutsid.

## Kasutatud kirjandus

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2015.

Molecular biology of the cell, 6th edition. New York: Garland Science.

Abu-Elheiga, Lutfi et al. 2000. „The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2“.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4): 1444–49.

Ahn, Bong Hyun et al. 2008. „A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating

energy homeostasis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38): 14447–52.

Andolfatto, Peter. 2005. „Adaptive evolution of non-coding DNA in *Drosophila*“.

*Nature* 437(7062): 1149–52.

Arbustini, Eloisa et al. 1998. „Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities

in dilated cardiomyopathy“. *American Journal of Pathology* 153(5): 1501–10.

Area-Gomez, Estela, Cristina Guardia-Laguarta, Eric A. Schon, ja Serge Przedborski. 2019.

„Mitochondria, OxPhos, and neurodegeneration: Cells are not just running out of gas“. *Journal of Clinical Investigation* 129(1): 34–45.

Arrese, Estela L., ja Jose L. Soulages. 2010. „Insect fat body: Energy, metabolism, and

regulation“. *Annual Review of Entomology* 55: 207–25.

Bahhir, Diana et al. 2019. „Manipulating mtDNA in vivo reprograms metabolism via novel

response mechanisms“. *PLoS Genetics* 15(10): 1–31.

Bateman, Joseph M., Philip S. Perlman, ja Ronald A. Butow. 2002. „Mutational bisection of

the mitochondrial DNA stability and amino acid biosynthetic functions of *Ilv5p* of budding yeast“. *Genetics* 161(3): 1043–52.

Beckingham, Kathleen M. et al. 2005. „*Drosophila melanogaster*--the model organism of

choice for the complex biology of multi-cellular organisms.“ *Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* 18(2): 17–29.

Blackstone, Neil W. 2016. „An evolutionary framework for understanding the origin of

eukaryotes“. *Biology* 5(2).

Chang, Karen T., ja Kyung Tai Min. 2005. „*Drosophila melanogaster* homolog of Down

syndrome critical region 1 is critical for mitochondrial function“. *Nature Neuroscience*

8(11): 1577–85.

Chang, Karen T., Yi Jun Shi, ja Kyung Tai Min. 2003. „The Drosophila homolog of Down’s syndrome critical region 1 gene regulates learning: Implications for mental retardation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(26): 15794–99.

Chen, Xin Jie, Xiaowen Wang, ja Ronald A. Butow. 2007. „Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(34): 13738–43.

Durigon, Romina et al. 2018. „LETM 1 couples mitochondrial DNA metabolism and nutrient preference“. *EMBO Molecular Medicine* 10(9): 1–20.

Ermak, Gennady, Todd E. Morgan, ja Kelvin J.A. Davies. 2001. „Chronic Overexpression of the Calcineurin Inhibitory Gene DSCR1 (Adapt78) Is Associated with Alzheimer’s Disease“. *Journal of Biological Chemistry* 276(42): 38787–94.

Feng, Da Fei, Glen Cho, ja Russell F. Doolittle. 1997. „Determining divergence times with a protein clock: Update and reevaluation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24): 13028–33.

Ford, Daniel et al. 2007. „Alteration of Drosophila life span using conditional, tissue-specific expression of transgenes triggered by doxycycline or RU486/Mifepristone“. *Experimental Gerontology* 42(6): 483–97.

Frey, Terrence G, ja Carmen A Mannella. 2000. „The internal structure of mitochondria“. *Trends in Biochemical Sciences* 0004(July): 319–24.

Frezza, Christian. 2017. „Mitochondrial metabolites: Undercover signalling molecules“. *Interface Focus* 7(2): 0–5.

FRITZ, IRVING. 1955. „The Effects of Muscle Extract on the Oxidation of Palmitic Acid by Liver Slices and Homogenates“. *Acta Physiologica Scandinavica* 34(4): 367–85.

Fuentes, J. J., M. A. Pritchard, ja X. Estivill. 1997. „Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) gene“. *Genomics* 44(3): 358–61.

González de Cózar, Jose M. et al. 2019. „RNase H1 promotes replication fork progression through oppositely transcribed regions of Drosophila mitochondrial DNA“. *Journal of Biological Chemistry* 294(12): 4331–44.

Hensen, Fenna, Sirin Cansiz, Joachim M. Gerhold, ja Johannes N. Spelbrink. 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(1): 219–26.
- Hosp, Fabian et al. 2017. „Lysine acetylation in mitochondria: From inventory to function“. *Mitochondrion* 33: 58–71.
- Hüttemann, Maik et al. 2012. „Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation“. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817(4): 598–609.
- Iborra, Francisco J, Hiroshi Kimura, ja Peter R Cook. 2004. „The functional organization of mitochondrial genomes in human cells“. *Biomed Central Biology* 14: 1–14.
- Inagaki, Takao et al. 1992. „Ultrastructural identification of light microscopic giant mitochondria in alcoholic liver disease“. *Hepatology* 15(1): 46–53.
- Kadowaki, Takashi et al. 1994. „A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA“. *New England Journal of Medicine* 327(16): 962–68.
- Kaufman, Brett A. et al. 2007. „Diacylglycerol Is Required for the Formation of COPI Vesicles in the Golgi-to-ER Transport Pathway“. *Molecular Biology of the Cell* 18(September): 3250–63.
- Kohjima, Motoyuki et al. 2008. „SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease“. *International Journal of Molecular Medicine* 21(4): 507–11.
- Koopman, Werner J.H., Felix Distelmaier, Jan A.M. Smeitink, ja Peter H.G.M. Willems. 2013. „OXPHOS mutations and neurodegeneration“. *EMBO Journal* 32(1): 9–29.
- Kucej, Martin et al. 2008. „Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues“. *Journal of Cell Science* 121(11): 1861–68.
- Kühlbrandt, Werner. 2015. „Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes“. *BMC Biology* 13(1): 1–11.
- Lee, Chi Fung, ja Rong Tian. 2015. „Mitochondrion as a target for heart failure therapy - Role of protein lysine acetylation“. *Circulation Journal* 79(9): 1863–70.
- Lee, Soojin et al. 2016. „The calcineurin inhibitor Sarah (Nebula) exacerbates A $\beta$ 42 phenotypes in a *Drosophila* model of Alzheimer’s disease“. *DMM Disease Models and Mechanisms* 9(3): 295–306.

- Lewis, David L., Carol L. Farr, Aimee L. Farquhar, ja Laurie S. Kaguni. 1994. „Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA“. *Molecular Biology and Evolution* 11(3): 523–38.
- Lewis, O. L., C. L. Farr, ja L. S. Kaguni. 1995. „*Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons“. *Insect Molecular Biology* 4(4): 263–78.
- Lewis, Samantha C., Lauren F. Uchiyama, ja Jodi Nunnari. 2016. „ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with Mitochondrial division in human cells“. *Science* 353(6296).
- Macierzanka, Malgorzata et al. 2008. „Maintenance and stabilization of mtDNA can be facilitated by the DNA-binding activity of Ilv5p“. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1783(1): 107–17.
- Maier, D. et al. 2001. „Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*“. *Molecular Biology of the Cell* 12(4): 821–30.
- Martinez, Salette, ja Robert P. Hausinger. 2015. „Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases“. *Journal of Biological Chemistry* 290(34): 20702–11.
- McGarry, J. Denis, ja Nicholas F. Brown. 1997. „The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis“. *European Journal of Biochemistry* 244(1): 1–14.
- Menzies, Keir J., Hongbo Zhang, Elena Katsyuba, ja Johan Auwerx. 2016. „Protein acetylation in metabolism-metabolites and cofactors“. *Nature Reviews Endocrinology* 12(1): 43–60.
- Murray, Noreen E. 2000. „Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle)“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(2): 412–34.
- Newman, Alice C., ja Oliver D.K. Maddocks. 2017. „Serine and Functional Metabolites in Cancer“. *Trends in Cell Biology* 27(9): 645–57.
- Nicholson, Louise et al. 2008. „Spatial and temporal control of gene expression in *drosophila* using the inducible geneSwitch GAL4 system. I. Screen for larval nervous system drivers“. *Genetics* 178(1): 215–34.
- Nunnari, Jodi, ja Anu Suomalainen. 2012. „Mitochondria: In sickness and in health“. *Cell* 148(6): 1145–59.

- Orth, M., ja A. H.V. Schapira. 2001. „Mitochondria and degenerative disorders“. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* 106(1): 27–36.
- Park, S. H. et al. 2002. „Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle“. *Journal of Applied Physiology* 92(6): 2475–82.
- Peeva, Viktoriya et al. 2018. „Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery“. *Nature Communications* 9(1): 1–11.
- Pizzo, Paola, ja Tullio Pozzan. 2007. „Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics“. *Trends in Cell Biology* 17(10): 511–17.
- Preyat, Nicolas, ja Oberdan Leo. 2013. „Sirtuin deacylases: a molecular link between metabolism and immunity“. *Journal of Leukocyte Biology* 93(5): 669–80.
- Robberson, D. L., H. Kasamatsu, ja J. Vinograd. 1972. „Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediates in mouse L cells.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(3): 737–41.
- Saddik, M., J. Gamble, L. A. Witters, ja G. D. Lopaschuk. 1993. „Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart“. *Journal of Biological Chemistry* 268(34): 25836–45.
- Schofield, Mark J., David M.J. Lilley, ja Malcolm F. White. 1998. „Dissection of the sequence specificity of the Holliday junction endonuclease CCE1“. *Biochemistry* 37(21): 7733–40.
- Schon, Eric A., Salvatore Dimauro, ja Michio Hirano. 2012. „Human mitochondrial DNA: Roles of inherited and somatic mutations“. *Nature Reviews Genetics* 13(12): 878–90.
- Schwer, Bjoern et al. 2006. „Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(27): 10224–29.
- Sebastiań, Carlos, F. Kyle Satterstrom, Marcia C. Haigis, ja Raul Mostoslavsky. 2012. „From sirtuin biology to human diseases: An update“. *Journal of Biological Chemistry* 287(51): 42444–52.
- Shadel, G S, ja David A. Clayton. 1997. „MITOCHONDRIAL DNA MAINTENANCE IN VERTEBRATES“. *Annual Review of Biochemistry* 66: 409–35.
- Shaw, Janet M., ja Jodi Nunnari. 2002. „Mitochondrial dynamics and division in budding yeast“. *Trends in Cell Biology* 12(4): 178–84.
- Shaw, Jillian L., ja Karen T. Chang. 2013. „Nebula/DSCR1 Upregulation Delays

- Neurodegeneration and Protects against APP-Induced Axonal Transport Defects by Restoring Calcineurin and GSK-3 $\beta$  Signaling“. *PLoS Genetics* 9(9).
- Shaw, Nicholas N., ja Dev P. Arya. 2008. „Recognition of the unique structure of DNA:RNA hybrids“. *Biochimie* 90(7): 1026–39.
- Shimano, Hitoshi. 2001. „Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): Transcriptional regulators of lipid synthetic genes“. *Progress in Lipid Research* 40(6): 439–52.
- Spelbrink, Johannes N. 2010. „Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: History, recent developments, and future challenges“. *IUBMB Life* 62(1): 19–32.
- Stehling, Oliver, ja Roland Lill. 2013. „The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: Mechanisms, connected processes, and diseases“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(9): 1–17.
- Su, Wanting et al. 2021. „Dual channel mitochondria-targeted fluorescent probe for detection of nitric oxide in living cells and zebrafish“. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 412(March): 113256.
- Suomalainen, Anu, ja Brendan J. Battersby. 2018. „Mitochondrial diseases: The contribution of organelle stress responses to pathology“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(2): 77–92.
- Torregrosa-Muñumer, Rubén et al. 2019. „Replication fork rescue in mammalian mitochondria“. *Scientific Reports* 9(1): 1–16.
- Torregrosa-Muñumer, Rubén, Steffi Goffart, Juha A. Haikonen, ja Jaakko L.O. Pohjoismäki. 2015. „Low doses of ultraviolet radiation and oxidative damage induce dramatic accumulation of mitochondrial DNA replication intermediates, fork regression, and replication initiation shift“. *Molecular Biology of the Cell* 26(23): 4197–4208.
- Vafai, Scott B., ja Vamsi K. Mootha. 2012. „Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle“. *Nature* 491(7424): 374–83.
- Wallace, Douglas C. 1999. „Mitochondrial diseases in man and mouse“. *Science* 283(5407): 1482–88.
- Wallace, Douglas C., ja Dimitra Chalkia. 2013. „Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease“. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(11).

- Wang, Wenzhang et al. 2020. „Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer’s disease: Recent advances“. *Molecular Neurodegeneration* 15(1): 1–22.
- Wanrooij, Sjoerd, ja Maria Falkenberg. 2010. „The human mitochondrial replication fork in health and disease“. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1797(8): 1378–88.
- Westermann, Benedikt. 2010. „Mitochondrial fusion and fission in cell life and death“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(12): 872–84.
- Whitby, Matthew C., ja Julie Dixon. 1998. „Substrate specificity of the SpCCe1 holliday junction resolvase of *Schizosaccharomyces pombe*“. *Journal of Biological Chemistry* 273(52): 35063–73.
- Xin, Jie Chen, Xiaowen Wang, Brett A. Kaufman, ja Ronald A. Butow. 2005. „Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance“. *Science* 307(5710): 714–17.
- Yaffe, Michael P. 1999. „Dynamic mitochondria“. *Nature Cell Biology* 1(6): E149–50.
- Yasukawa, Takehiro et al. 2006. „Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand“. *EMBO Journal* 25(22): 5358–71.
- Yeh, Li-an, Kwei-hwang Lee, ja Ki-han Kim. 1980. „Regulation of Rat Liver Acetyl-coA Carboxylase“. *the Journal of Biological Chemistr* 255(6): 2308–15.
- Zeviani, Massimo, Antonella Spinazzola, ja Valerio Carelli. 2003. „Nuclear genes in mitochondrial disorders“. *Current Opinion in Genetics and Development* 13(3): 262–70.
- Zhao, Ru Zhou, Shuai Jiang, Lin Zhang, ja Zhi Bin Yu. 2019. „Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review)“. *International Journal of Molecular Medicine* 44(1): 3–15.
- Zinovkina, L. A. 2019. „DNA Replication in Human Mitochondria“. *Biochemistry (Moscow)* 84(8): 884–95.

## LISAD

### Lisa 1. Ristamisskeemid

Ristamisskeemides on välja toodud vaid kõnealused kromosoomid. Ristamised tehti kõigi kolme tüve: endo/trans-, endo- ja funk. kohta. Siin on lihtsuse mõttes UAS-i kontrolli all olevate HsdR subühikute isovormide ekspressioonikassetid tähistatud kui HsdRx. Ristamisel kasutati *balancer* kromosoome, mille abil selekteeriti välja huvipakkuva geeniga isendid, antud juhul tegu *CyO* geeniga, mis tekitab *Drosophila*'le kumerusega tiivad.

Ristamine on tehtud eesmärgiga kokku viia *driver* ja mtEcoBI subühikute geenid. Ristamisskeemi tulemusena on kirja pandud vaid huvipakkuva genotüübiga isendid.

*Sra* KD genotüübi puhul tehti järgnev ristamine:

$$\frac{HsdM.HsdS}{HsdM.HsdS}; \frac{tubGS}{CyO} \times \frac{sraRNAi}{sraRNAi}; \frac{HsdRx}{HsdRx} = \frac{HsdM.HsdS}{sraRNAi}; \frac{tubGS}{HsdRx}$$

Ilma *Sra* KD genotüübi puhul tehti järgnev ristamine:

$$\frac{HsdM.HsdS}{sdM.HsdS}; \frac{HsdRx}{HsdRx} \times \frac{+}{+}; \frac{tubGS}{tubGS} = \frac{HsdM.HsdS}{+}; \frac{HsdRx}{tubGS}$$

Ristamisel kasutati *balancer* kromosoome, mille abil selekteeriti välja huvipakkuva geeniga isendid, antud juhul tegu *CyO* geeniga, mis tekitab *Drosophila*'le kumerusega tiivad. Kõik järgneva genotüübiga isendid hävitati:

$$\frac{HsdM.HsdS}{sraRNAi}; \frac{HsdR}{CyO}$$

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Mirjam Reino,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „**Valgu Sra mõju mtDNA topoloogiale ja katabolismile indutseeritud mtDNA stressi tingimustes**“ mille juhendaja on Priit Jõers  
  
reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.2022** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Mirjam Reino*

31.05.2021