

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

**mtDNA stressist tingitud metaboolse paindlikkuse muutused  
äädikakärbse *Drosophila melanogasteri* lihaskoes**

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Diana Bahhir

Juhendaja: dotsent Priit Jõers

TARTU 2017

## INFOLEHT

### **mtDNA stressist tingitud metaboolse paindlikkuse muutused äädikakärbse**

#### ***Drosophila melanogasteri* lihaskoes**

Bakalaurusetöö

Diana Bahhir

**Lühikokkuvõte.** *Drosophila melanogaster* laialt kasutatakse geneetilises eksperimendis inimeste haiguste uurimiseks. *Drosophila* on homoloogsed inimestega geenid ning analoogsed organid inimeste kudedega. Käesoleva bakalaureusetöös näidatakse, et transgeense DNA nukleaasi ekspressiooni poolt indutseeritud mtDNA stress lihaskoes viib tõenäoliselt metaboolse paindumatuse tekkeni ja kallutas energiavarude tarbimist tugevalt lipiidide suunas, demonstreerides uut seost mtDNA stressi ja diabeedi vahel.

**CERCS teaduseriala:** P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees; B220 Geneetika, Tsütogeneetika

Märksõnad: mtDNA stress, diabeet, metaboolne paindlikus, rasvumine

### **Changes in metabolic flexibility in muscle tissue of *Drosophila melanogaster* caused by mtDNA stress signal**

Bachelor's thesis

Diana Bahhir

**Abstract.** *Drosophila melanogaster* is widely used in genetic experiments for studying human diseases. *Drosophila* gene content has a significant degree of homology with humans and all main analogues of human organs. In this thesis work I demonstrated that transgenic expression of exogenous DNA nuclease caused mtDNA stress in muscle tissue, which in turn led to metabolic inflexibility. As a result, catabolism pivots toward lipid oxidation, demonstrating a novel link between mtDNA stress and diabetes.

**CERCS research specialization:** P320 Nucleic acids, protein synthesis; B220 Genetics, Cytogenetics

Keywords: mtDNA stress, diabetes, metabolic flexibility, obesity

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 <i>D. melanogaster</i> mudelisüsteemi ülevaade .....	6
1.1.1 Elustsükkel.....	7
1.1.2 Mudelorganism geneetikas ja molekulaarbioloogias .....	8
1.1.3 Transgeensete valkude ekspressioon <i>Drosophilas</i> .....	9
1.2 Mitokondri struktuur ja funktsioonid .....	11
1.3 mtDNA nukleoidid ja nende võimalik roll signalisatsioonil .....	12
1.4 Metaboolne paindlikus .....	14
1.5 Energiavarud <i>Drosophilas</i> .....	15
1.6 Töögrupi publitseerimata andmed .....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	19
2.1 Töö eesmärk .....	19
2.2 Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1 <i>Drosophila</i> käitlemine, tehnikad ja tüved .....	19
2.2.2 Triatsüülglütseriidide mõõtmine.....	22
2.2.3 Süsivesikute mõõtmine.....	23
2.2.4 Valgu kontsentratsiooni määramise meetodikad.....	25
2.3. Tulemused .....	26
2.4 Arutelu .....	31
KOKKUVÕTE.....	33
SUMMARY.....	34
TÄNUSÕNAD .....	36
KASUTATUD KIRJANDUS.....	37
LIHTLITSENTS.....	41

## KASUTATUD LÜHENDID

**L1, L2, L3** – vastse staadiumid (ingl.k. *larval stages*)

**UAS** – ülesvoolu aktiveeriv järjestus (ingl.k. *upstream activation sequence*)

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

**ETC** – elektrontide ransportahel (ingl.k. *electron transport chain*)

**mtDNA** – mitokondrionaalne DNA (ingl.k. *mitochondrial DNA*)

**mTERF** – mitokondriaalne transkriptsiooni terminatsioonifaktor (ingl.k. *mitochondrial transcription termination factor*)

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

**JNK** – c-Jun N-terminaalne kinaas (ingl.k. *c-Jun N-terminal kinase*)

**mtSSB** – mitokondriaalne üheahelalist DNA-d siduv valk (ingl.k. *mitochondrial single-stranded DNA binding protein*)

**POLG** – DNA polümeraas gamma (ingl.k. *DNA polymerase gamma*)

**POLRMT** – mitokondriaalne RNA polümeraas (ingl.k. *mitochondrial RNA polymerase*)

**ROS** – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl.k. *reactive oxygen species*)

**TGL** – triglütseriidi lipaas (ingl.k. *triglyceride lipase*)

**ATGL** – adipoosi triglütseriidi lipaas (ingl.k. *adipose triglyceride lipase*)

**Lsd1** – lipiiditilga valk 1 (ingl.k. *lipid storage droplet-1*)

**Lsd2** – lipiiditilga valk 2 (ingl.k. *lipid storage droplet-2*)

**AKH** – adipokineetiline hormoon (ingl.k. adipokinetichormon)

**TAG** – triatsüülgütseriid (ingl.k. *triacylglyceride*)

**ETF** – elektrone transportiva flavoproteiini dehüdrogenaas (ingl.k. *electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase*)

**BCA** – bikinkoniinhappe katsesüsteem (ingl.k. *bicinchoninic acid assay*)

**OMM** – mitokondri välismembraan (ingl.k. *outer mitochondrial membrane*)

**IMM** – mitokondri sissemembraan (ingl.k. *inner mitochondrial membrane*)

**MFN1** – mitofusiin 1 (ingl.k. *mitofusin 1*)

**MFN2** – mitofusiin 2 (ingl.k. *mitofusin 2*)

**OPA1** – optilise atroofia valk 1 (ingl.k. *optic atrophy protein 1*)

**GTP** – guanosiin-5'-trifosfaat (ingl.k. *guanosine triphosphate*)

**MP** – RU486 ehk mifepristoon (ingl.k. *mifepristone*)

## SISSEJUHATUS

*Drosophila melanogaster* on laialdaselt kasutusel mudelorganismina geneetikas ja molekulaarbioloogias. Tänu oma suurele viljakusele ja lühikesele generatsiooniajale on võimalik genereerida lühikese aja jooksul suurt hulka isendeid, mis võimaldab saada usaldusväärseid statistilisi andmeid. Aastakümnete jooksul on loodud suur hulk meetodeid ja geneetilisi tööriistu *D.melanogasteri* uurimiseks, mis annab märkimisväärse eelise teiste mudelorganismide ees. Umbes 50% *D.melanogasteri* geenidest on homoloogsed inimese geenidega ning 60-70% inimeste pärilikkude haigustega seotuid geene on olemas ka *D.melanogasteris* (Fortini jt., 2000; Reiter jt., 2001). Erinevate haiguste mudelite genereerimine *Drosophilas* on osutund väärtuslikuks lähenemiseks mitmete inimeste patoloogiate uurimisel. Lisaks sellele on *Drosophilal* olemas kõikide inimeste kudedele analoogilised organid alates kesknärvisüsteemi ja lõpetades rasvkehaga, mis seob endas nii maksa kui ka rasvkoe funktsioone. Rasvkeha on seega energiavarude säilitamise koht, mis ühtlasi koordineerib hormonaalselt metaboolset homöostaasi vastavalt muutustele keskkonnas.

Peamised energiataoavarad on *Drosophilas* nagu inimeseski triatsüülglütseriidid ja glükoosi polüsahhariid glükogeen. Neid utiliseeritakse ATP sünteesil kas ainult mitokondris (triatsüülglütseriidid) või esmalt glükolüüsil ja hiljem mitokondris (püruvaat). Võimet kasutada kas üht või teist allikat peamise energiareervuuarina nimetatakse metaboolseks paindlikuseks. Defektid ümberlülitumises nende kahe allika vahel on tihedalt seotud tänapäeval pandeemilise mõõdu omandanud haigustega nagu diabeet, rasvumine ja südame-veresoonkonna haigused. Tänu sellele on see nähtus intensiivse uurimistöö objekt, kuid siiani pole suudetud rahuldavalt seletada, mis on metaboolse paindlikuse kadumise algpõhjus. Mitokondri on peamine ATP sünteesi koht rakus, seega on mõeldav, et muutused tema funktsioonil võivad otseselt mõjutada metaboolse jääkuse teket. Siiski on otsene seos mitokondri funktsiooni ja energiaallika eelistuse vahel jäänud siiani ähmaseks.

Käesoleva bakalaureusetöö teoreetilise osa eesmärk on anda lühiülevaade mitokondri struktuurist ja funktsioonidest, mitokondriaalsest DNA-st (mtDNA) ja tema pakkumisest nukleoididesse ning kirjeldada meie uurimisgrupi seni avaldamata andmeid, mis viisid antud töö teemani. Eksperimentaalse osa ülesandeks on uurida, kuidas mõjutab eksogeense bakteriaalse tüüp I nukleaasi poolt indutseeritud mtDNA stress *Drosophila* lihaskoes energiavarude utiliseerimist.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 *D. melanogaster* mudelisüsteemi ülevaade

*D. melanogaster* ehk harilik äädikakärbes on seltsi Diptera kuuluvputukas (*Drosophilidae* perekond), mis on laialdaselt kasutusel mudelorganismina molekulaarbioloogias ja geneetikas juba sada aastat. Äädikakärbeste areng on kiire ja ühe aasta jooksul võib üles kasvada kümneid põlvkondi. Viljastatud munast valmiku tekkeni läheb optimaalsetel tingimustel (25°C) umbes 10 päeva, mis võimaldab mugavalt jälgida geneetilisi muutusi põlvkondade lõikes suhteliselt lühikese aja jooksul (Sang, 2001). Äädikakärbeid kasutatakse geneetilises modelleerimises, kus uuritakse mitmeid olulisi inimeste haigusi, näiteks parkinsonism, Huntingtoni ja Alzheimeri tõbi. Lisaks kasutatakse *Drosophila* liike erinevate mehhanismide uurimiseks: immuunsus, diabeet, vähk ja narkomaania. Kogu perekond sisaldab rohkem kui 1500 liiki (Pierce, 2004).

*D. melanogaster* on väike (umbes 2-4 mm pikk) punaste silmadega kärbes, kehavärv varieerub kahvatukollasest punakaspruuni ja mustani. Esineb suguline dimorfism: emaste keha pikkus on umbes 2,5 mm, kuid isaste keha pikkus on 2 mm ja nende tagakeha on tumedam. Veel on isastel harjased, mis paiknevad käppadel ja ümbritsevad päraikut ning isase genitaale. (vt. Joonis 1). Mitmed morfoloogilistest tunnustest on kasutusel selektsioonimarkeritena, kõige tuntum neist on silmade pigmentatsiooni määrav geen, mille olemasolul on silmad punased (Demerec ja Kaufmann, 1972).



**Joonis 1.** *D.melanogaster* emane (vasakul) ja isane (paremal).

### 1.1.1 Elustsükkel

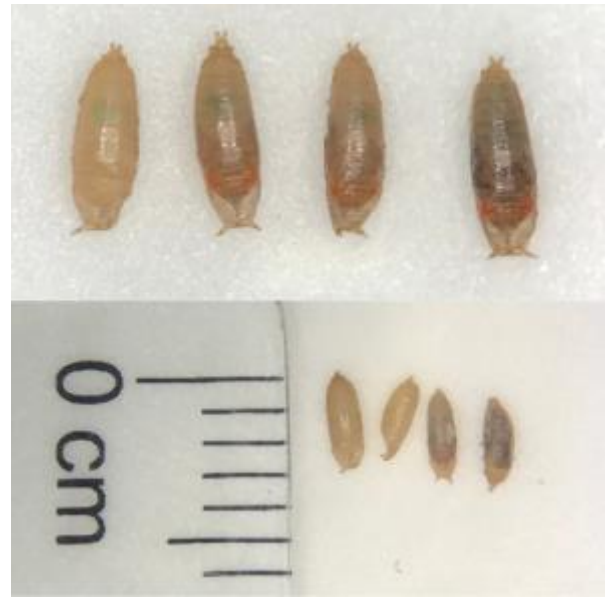
*D. melanogaster* ontogeneesi kestus (munast kuni valmiku väljumiseni nukust) on temperatuuril 25°C umbes 10 päeva, madalamatel temperatuuridel on see oluliselt pikem (näiteks temperatuuril 18°C on see kaks korda pikem) (Demerec ja Kaufmann, 1972). Emane muneb päeva jooksul kuni 100 muna pehkinud puu või muu kõduneva orgaanilise materjali sisse. Iga muna on umbes 0,5 mm pikk (Ashburner jt., 2005; Markow, 2009).

Optimaalsetes tingimustes (25°C) kooruvad vastsed 24 tunni pärast. Vaststestaadium kestab 25°C juures piisava toiduvaru olemasolul 5 päeva, mille jooksul nad suurendavad oma massi mitmeid kordi. Toiduks tarvitavad nad kõdunevat taimset orgaanikat, eelistatult puuvilju (Demerec ja Kaufmann, 1972). Teatud kehaosade (suised, spiraaklid) morfoloogia muutumise ja kehamassi suurenemise alusel jaguneb vastseperiood L1, L2 ja L3 staadiumiks. Olles omandanud teatud kehamassi L3 faasis (nn. kriitilise suuruse) aktiveeritakse signaalirajad, mille tulemusena muutub vastse käitumine: ta lahkub toiduks tarvitatud orgaanikast, roomab negatiivset geotaksist järgides võimalikult kõrgele ja alustab nukkumist, mille käigus ümbritseb vastne end kestaga (vt. Joonis 3) (Tyler, 2000). Nukustaadium kestab umbes viis päeva. Nukus toimuva metamorfoosi tulemusena muunduvad vastse organid valmiku elunditeks (Ashburner jt., 2005).

Emased omandavad võime paarituda 25°C juures mitte varem kui 8-10 tundi pärast nukust väljumist. Emased on võimelised säilitama isaste spermat oma kehas selleks, et seda oleks võimalik hiljem kasutada munade viljastamisel. Seega piisab ühest paaritumisest, et emane oleks viljastatud ja võimeline munema ka veel nädalaid hiljem. Just seetõttu on vajalik laboratoorsetes tingimustes eemaldada kooruvad emased äädikakärbsed isastest antud perioodi jooksul, et neid saaks hiljem kasutada soovitud ristamisel (Ashburner jt., 2005; Demerec ja Kaufmann, 1972).



**Joonis 2.** *D.melanogasteri* vastne.



**Joonis 3.** *D.melanogasteri* nukk.

### 1.1.2 Mudelorganism geneetikas ja molekulaarbioloogias

*D. melanogaster* võeti kasutusele geneetiliste uurimisobjektidena juba enne baktereid ja pärme, 1909. aastal. Esimene, kes oma katsetes kasutas *D. melanogaster* mudelorganismina, oli Thomas Hunt Morgan, kelle avastused selle kahetiivalisega pani aluse modernsele geneetikale. Morgani tudengid nagu näiteks Calvin Bridges, Hermann Joseph Muller ja Alfred Sturtevant jätkasid äädikakärbeeste kasutamist oma uurimistöös ja viisid edasi Morgani avastusi, rajades vundamenti uutele teadusharudele nagu tsütogeneetika ja molekulaarbioloogia (Letsou ja Bohmann, 2005). *Drosophilate* kasutamine teadusuuringute mudelina jätkus ja laienes ka pärast neid, mängides kesksel rollil näiteks tsirkaadsete rütmide ja oogeneesi etappide kirjeldamisel ning kehakuju määravate hox-geeniklastrite avastamisel. Ta oli samuti teine hulkrakne loomne organism, kelle genoom sekveneeriti täies ulatuses (2000 aastal) (Adams jt., 2001). Peamised põhjused, miks *Drosophilad* on osutunud suurepäraseks mudelorganismideks, on järgmised:

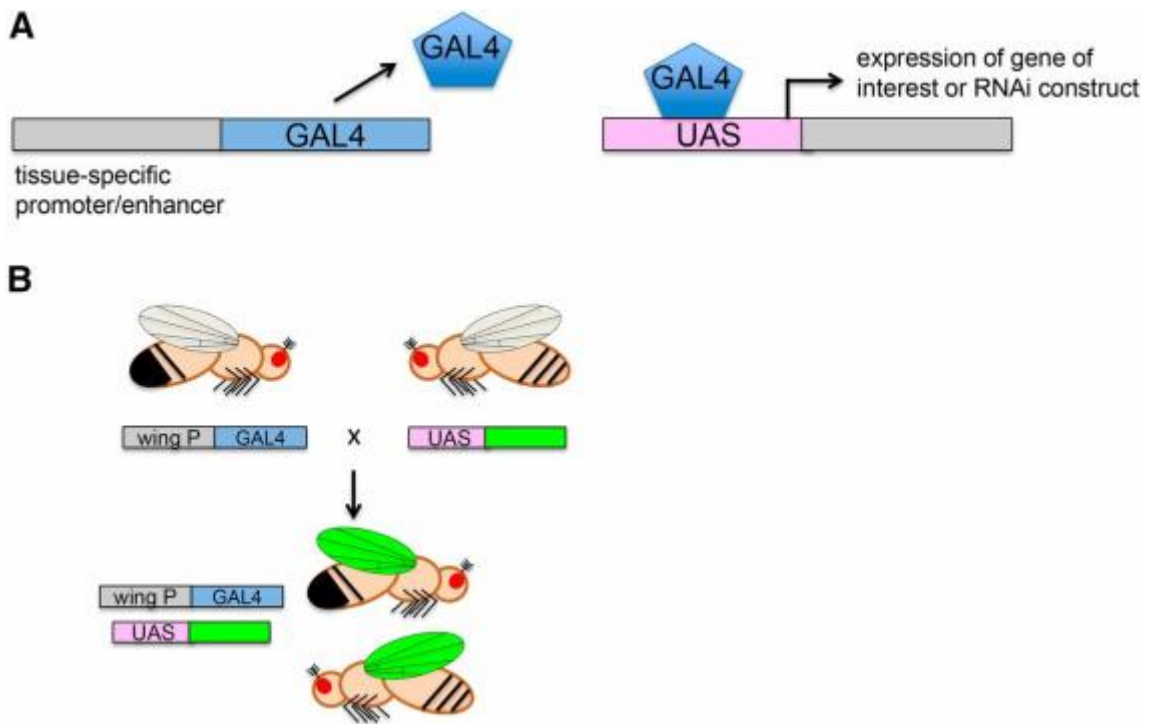
1. Nende kultiveerimine nõuab lihtsamat varustust ning nad on vähem nõudlikumad keskkonna suhtes kui imetajate mudelid (näit. hiir), isegi suurte koguste kultiveerimine on suhteliselt odav.
2. *Drosophila* generatsiooniaeg on lühike (umbes 10 päeva optimaalsel temperatuuril), mis võimaldab genereerida mitu põlvkonda suhteliselt lühikese aja jooksul. Lühike eluiga

võimaldab suhteliselt piiratud aja jooksul kontrollida geneetiliste modifikatsioonide mõju eluea pikkusele.

3. Nad on väga viljakad (emased munevad kuni 100 muna päevas). (Sang, 2001)
4. Isased ja emased on selgelt eristatavad, seetõttu saab emaseid nn. neitsiperioodil kergesti isoleerida, hõlbustades geneetilist ristumist.
5. Äädikakärbestel on ainult neli paari kromosoomi (kolm autosoomi ja üks paar sugukromosoomi) ja suhteliselt lihtne genoom.
6. *Drosophila*l tekivad teatud organites nagu süljenäärmetes DNA replikatsiooni, millega ei kaasne rakkude jagunemist, tulemusena eriti suured polüteensed kromosoomid, mis eriti mikroskoopia alfaasis olid olulised tsütogeneetika kujunemisel.
7. Tänu pikaajalisele kasutamisenä mudelorganismina on kogunenud väga suur hulk tehnikaid ja geneetilisi tööriistu, mis võimaldavad ulatuslikult ja spetsiifiliselt modifitseerida *Drosophila* genoomi.
8. Nende genoom on täielikult sekveneeritud juba aastast 2000, olles ajaliselt teine loomne mudelorganism pärast *Caenorhabditis elegansi* (Adams jt., 2000).

### 1.1.3 Transgeensete valkude ekspressioon *Drosophilas*

Transgeenide ekspresseerimiseks *D. melanogasteris* kasutatakse peamiselt kaheosalist GAL4-UAS ekspressioonisüsteemi. See süsteem koosneb kahest komponendist: pärmi transkriptsiooni aktivaatorist GAL4-st ja tema seostumisjärjestusest ehk nn. UAS-st (inglise keeles *upstream activating sequence*). Asetades UAS järjestuse suvalise geeni ette, saab aktiveerida selle geeni ekspressioon juhul kui süsteemis esineb ka GAL4 valk. GAL4-UAS süsteemi abil saab kas ekspresseerida nii endo- kui ka eksogeenseid valke ning samuti RNAi-järjestuste kaudu repressseerida ühe või teise valgus taset (vt. Joonis 4). Selline süsteem on leidnud laialdast rakendust *D. melanogasteris* ning on edukalt kasutatud erinevates rakendustes: “mosaiikne” transgeenide ekspressioon rakuspetsiifilistes mutantsetes fenotüüpides, spetsiifiliste rakkude ablatsioonil ning signaalradade geneetiline häirimisel (Osterwalder jt., 2001). Liites GAL4 järjestuse endogeense promootoriga on võimalik tagada selle transkriptsioonifaktori ekspressioon ainult kas kõikides või ainult teatud kudedes. Selleks, et saavutada GAL4 ekspressiooni indutseeritavus, on konstrueeritud keemiliselt indutseeritav GeneSwitch-GAL4 (GS) süsteem (Scialo jt., 2016).



**Joonis 4.** GAL4/UAS transgeenide ekspressiooni süsteem *Drosophila* spetsiifilises koes. (A) Selleks, et ekspresseerida konkreetset koes transgeeni või RNAi konstrueerimist on vaja kahte kärbselise, millest ühe genoom sisaldab GAL4 transkriptsiooni aktivaatorit koos koespetsiifilise promotori-/enhaanseriga (nn. „driver“) ja teise genoomis on geeni või RNAi konstrukti järjestus, mille ette on asetatud UAS-element (B) Transgeensed emased, mis kannavad UAS “responderit” ja huvipakkuvat geeni (roheline) ristatakse transgeensete isastega, kellel on koespetsiifiline (antud juhul ekspresseeritud tiibades) “driver”. Järglastel on mõlemad süsteemi elemendid. Joonis on kohandatud artiklist Hales jt., 2015

GeneSwitch GAL4 (GS) süsteem on GAL4-UAS süsteemi modifitseeritud versioon, mis baseerub GAL4 transkriptsioonifaktori ja progesterooni retseptori liitvalgul. See kimäärne valk omandab võime aktiveerida transkriptsioon vaid siis, kui progesterooni retseptori domään seondub ligandiga, milleks antud juhul on sünteetiline keemiline ühend RU486 ehk mifepristoon. *Drosophila* genoomi lülitatakse ülalpool kirjeldatud konstruktid enamasti P-elementide järjestuste abil. P-element on *Drosophila* transposon täisjärjestusega 2907 aluspaari. P-elementid kodeerivad funktsionaalset transposaasi, mis võimaldab liikuda genoomis “cut-and-paste” mehhanismi abil. See transposaas tunneb ära kahte spetsiifilist, transposoni otstes paiknevat järjestust, mille kaudu toimub genoomist väljalõikamine ning uus juhuslik insertioon. Seega saab kasutada seda süsteemi suvalise DNA

järjestuse sisseviimiseks *Drosophila* genoomi, kui see paikneb kahe P-järjestuse vahel. Brand ja Perrimon kasutasid esimesena seda lähenemist, kloonides GAL4 P-elementi vektorisse ja demonstreerides sellise meetodika kasutatavust geenide ekspressiooni kontrollimisel. Viimasel aastakümnel on sellele lisandunud ka teisi, uudsemaid genoomi inserteerimise meetodikaid, mis põhinevad näiteks PhiC31 faagi elementidel, mille abil on võimalik inserteerida uusi gene täpselt määratletud kohtadesse genoomis (Hales jt., 2015; Scialo jt., 2016; Ou, 2013).

## 1.2 Mitokondri struktuur ja funktsioonid

Mitokondri on eukarüootse raku organell, millel on palju erinevaid funktsioone, kuid on eelkõige tuntud kui ATP tootmise kohana oksüdatiivse fosforüleerimise kaudu (Kühlbrandt, 2015). Kuigi klassikaliselt on kujutatud mitokondreid kui ovaalseid eraldiseisvaid struktuure, on selline vaatenurk eksitav. Nad ei ole staatilised struktuurid, vaid moodustavad läbi kogu raku ulatuv võrgustiku, mille morfoloogia on pideva liitumis- ja lahknemisprotsessi tulemus. Tasakaalu kaldumine ühes või teises suunas põhjustab selle võrgustiku homöostaasi muutusi, vastavalt siis tugevalt hargnenud ühtse retiikuli või paljude väiksemate omavahel eraldatud üksuste teket. Sellised morfoloogilised muutused, mis on vahendatud ja reguleeritud valkude nagu näit. MFN1, MFN2 ja OPA1 poolt, omavad rolli kahjustatud mitokondriaalse võrgustiku osade eemaldamisel läbi mitofaagia ja on samas indikaatoriks raku metabolismi ümberprogrammeerimisest (McInnes, 2013; Hall jt., 2014).

Mitokondri sisemine struktuur moodustub sise- ja välismembraanist, mille vahele jääb membraanidevaheline ruum. Sisemembraani pinda suurendavad omapärased väljasopistused (kristad). Elektroni transpordiahela ensüümid asuvad sisemembraanis, kus kemoosmootse protsessi tulemusena toimub ATP süntees. Välismembraan on ühtlane ja suhteliselt väikese selektiivsusega metaboliitide ja madala molekulmassiga valkude (kuni 6kDa) suhtes, kuna seal paiknevad hulgaliselt mitteselektiivsed membraani läbivaid valgulisi kanaleid. Seepärast on membraanidevahelise ruumi koostis on sarnane tsütosooliga ioonide ja väikeste molekulide suhtes. Sisemembraan on aga hoopis selektiivsem barjäär ka väikesetele molekulidele, millede transport üle selle membraani on täpselt reguleeritud. See on ka kohaks, kus toimub mitokondri funktsioonidest enim tuntud, nimelt ADP oksüdatiivne fosforüleerimine ATP-ks. Selles membraanis paiknevad neli suurt valkkompleksi moodustavad elektronide transpordiahela (ETC), mille ülesanne on tekitada prootonite gradient kasutades selleks elektronide liikumisel kõrgemalt

energeetiliselt tasandilt madalamale vabanevat energiat. Kompleksid I ja II saavad elektrone vastavalt aktiveeritud kandjatelt NADH-lt ja FADH<sub>2</sub>-lt (McInnes, 2013). Elektronid liiguvad I, III ja IV komplekside vahel elektronide kandjate nagu ubikvinoon ja tsütokroom C abil, kuni kompleks IV kannab nad terminaalsele elektronide aktseptorile hapnikule. Liikumisel mööda elektronide transpordiahelat loovutavad elektronid osa oma energiast ning selle arvelt pumpavad kompleksid I, III ja IV vesinikioone ehk prootoneid (H<sup>+</sup>) maatriksist membraanidevahelise ruumi, mille tulemusena tekib üle sisemembraani prootongradient. See elektrokeemiline gradient saab võimaluse tasakaalustuda tänu kompleks V-le ehk ATP süntaasile, mis moodustab selektiivse poori läbi sisemembraani. Prootonite liikumine läbi selle kompleksi käivitab morfoloogilised muutused, mis on vajalikud fosfaatrühma lisamiseks ADP-le kompleks V aktiivsentril, mille tulemusena tekib ATP. Seega kasutatakse NADH-lt ja FADH<sub>2</sub>-lt saadud kõrge energiaga elektronide arvelt tekitatud prootongradient ära selleks, et toota ATP-d nn. oksüdatiivse fosforüleerimise kaudu. Häired hingamisahelas (näit. defektne komplekside struktuur) põhjustab elektronide enneaegset liitumist hapnikuga ülekande käigus, seda enamasti komplekside I ja III kaudu. Selle tulemusena tekib grupp kõrge reaktiivsusega ühendeid, mida nimetatakse vabadeks hapniku radikaalideks (ROS) (Navdeep, 2014). Kuna tegemist on väga reageerimisvõimeliste molekulidega, on nad võimelised koheselt reageerima kõikide biokeemiliste molekulide põhitüüpidega (valgud, lipiidid, süsivesikud, nukleiinhapped). Kuna selline kontrollimatu reageerimine põhjustab pöördumatuid muutusi nendes biokeemilistes molekulides, on suurenenud ROS-de produktsioon tugevalt negatiivse mõjuga organismi homöostaasile, põhjustades või halvendades erinevaid patoloogiaid (McInnes, 2013; Kühlbrandt, 2015; Youle ja Blic, 2016).

### **1.3 mtDNA nukleoidid ja nende võimalik roll signalisatsioonil**

Mitokondrionaalne DNA (mtDNA) on ainus loomsete organismide DNA, mis paikneb väljaspool tuuma. Hulkraksete loomade mtDNA on tsirkulaarne kaheaahelaline DNA molekul, mis sisaldab sõltuvalt liigist 13000-20000 aluspaari. Nende mtDNA kodeerib 13 polüpeptiidi, mis kõik on ETC komplekside ja ATP süntaasi subühikud ning nende sünteesiks vajalikku täiskomplekti tRNA-si ja kahte rRNA-d (12S ja 16S rRNA). Nagu ka kromatiin tuumas, moodustab mtDNA koos erinevate valgulistega teatud spetsiifilise struktuuri, mida nimetatakse nukleoidiks. Need on sarnaselt kromosoomidega segregatsioonilised ühikud, mis liiguvad koos mitokondritega tütarakkudesse mitoosi ja meiosis käigus (Gilkerson jt., 2013). Kuna mitokondriaalses nukleoidis

toimub mtDNA süntees ja transkriptsioon, on seal osalised valgud, millede funktsioon on otseselt seotud nende transaktsioonidega nagu universaalselt esinev valk TFAM ja sünteesi/ekspressiooniga seotud valgud mTERFs, polümeraas gamma, mtSSB, mtDNA helikaas Twinkle jne (Chen ja Butow, 2005). TFAM on 24 kDa valk, mida peale osalemise mitokondriaalse transkriptsiooni regulatsioonis peetakse ka peamiseks mtDNA pakkimisel osalevaks faktoriks (Kang jt., 2007; Kukat ja Larsson, 2013). Kuigi erinevate nukleoidide täielik valguline komponent pole identne, esineb teadaolevalt TFAM kõikides nukleoidides. Lisaks sellele esinevad mitokondriaalses nukleodis ka rühm valke, millel teadaolevalt puudub otsene roll mtDNA homöostaasil ja millel on teoretiseeritud rolli mitokondriaalses biogeneesis, metabolismi regulatsioonis, apoptoosi induktsioonis ning retrograadses mitokondri-tuum signaali ülekandes (Malka jt., 2006; Rajala jt., 2015). Sarnaselt mitokondriga on ka nukleoidid dünaamilised ühikud, millede valguline komponent ning seetõttu ka tõenäoliselt funktsioon muutub vastusena välismõjudest põhjustatud signaalidele. Kuigi on pikalt peetud võimalikuks nende rolli signaaliradades osalemisel või ka nende käivitamisel, ei ole siiani kindlaid näiteid sellistest mehhanismidest. Küll on aga teada, et häired mitokondri funktsioonil käivitavad teatud signaalirajad, eriti need, mis kontrollivad mitokondriaalset biogeneesi peamist regulaatorit transkriptsioonifaktorit PGC-1 $\alpha$  ja sellega seotud faktoreid (Jornayvaz ja Shulman, 2014). Siiani on peetud selliste stressisignaalide vallandajateks ETC häiretest põhjustatud vabade hapniku radikaalide produktsiooni tõusu või ebaefektiivsest oksüdatiivse fosforüleerimisest tingitud ATP taseme langust. On olemas andmeid, et läbi nendest tingitud retrograadsete signaalide kaudu on mitokondri ühenduses teiste raku funktsioonidega. Eksperimendid *D. melanogaster*-iga on näidanud, et mitokondriaalsete geenide deleteerimisest põhjustatud mitokondri funktsiooni defekt viib rakutsükli blokeerumisele JNK signaali või AMP kinaasi aktivatsiooni (madalal ATP tasemel) kaudu (Botella jt., 2001). Uuringud imetajates on näidanud, et nii geneetiliselt kui ka farmakoloogiliselt põhjustatud mitokondriaalse funktsiooni häirete tulemusena programmeeritakse ümber signaaliradadel osalevate valkude ekspressioon tuumas. Kuigi on juba pikka aega olnud teada, et mtDNA koopiaarvu langus või topoloogia muutus on kahjulik raku homöostaasile, on siiani peetud selliste signaalide vahendajateks eelkõige eelpool mainitud ROS-de üleproduktsiooni ja/või ATP langust, kuna muutused mitokondris kodeeritavate ETC subühikute ekspressioonil omavad otsest mõju ETC funktsioonile. (Gilkerson jt., 2013).

## 1.4 Metaboolne paindlikus

Nagu varem mainitud, on oluline roll mitokondriaalsel ATP sünteesil aktiveeritud kandjatel NADH ja FADH<sub>2</sub>, mis transpordivad kõrge energiaga elektrone ETC kompleksidele I ja III. Need kandjad n.ö. „laetakse“ ära glükolüüsil ja tsitraadi- ehk TCA tsükli. Mitokondri maatriksis aset leidvas TCA tsükli toimub see tänu erinevatel kataboolsetel radadel sünteesitud aktiveeritud kandja AcCoA liitumisel oksaloatsetaadiga, mille produkt tsitraat muundub järjestikuste reaktsioonide tulemusena tagasi oksaloatsetaadiks, loovutades kaks süsinikku CO<sub>2</sub> vormis ja kandes elektrone NADH-le ning FADH<sub>2</sub>-le. AcCoA allikas on tavaliselt suhkrute ja lipiidide katabolism. Võimet kasutada eelistatult kas üht või teist gruppi AcCoA allikana vastavalt keskkonnatingimustele ja organismi metaboolsele tasakaalule nimetatakse metaboolseks paindlikuseks. See nähtus tagab energiaallikate võimalikult efektiivse kasutamise ning on täpselt reguleeritud. Juhul kui selline ümberlülitamise võime ühel või teisel põhjusel kaob, saab organism kasutada oma ATP sünteesiks vaid teatud fikseeritud segu rasvadest ja suhkrutest, mis on tihtipeale tugevalt ühe või teise allika poole kaldu. Selline nn. metaboolse paindumatus teke on seotud mitmete tänapäeva ühiskonnas pandeemia mõõdu omandanud patoloogiatega nagu rasvumine, steatoos, diabeet ja südameveresoonkonna haigused. Hetkel pole veel lõplikku konsensust, kuhu täpselt see nähtus ajaliselt asetub nende haigust etioloogias. Siiski, üha suurenev hulk eksperimentaalandmeid loomsetest mudelorganismidest ja inimpopulatsiooni vaatlused toetavad metaboolse paindumatus teket kui patoloogiate algpõhjust (Muoio jt., 2012; Tataranni jt., 2003). Põhjuseid, mis viivad metaboolse paindumatus tekkeni, võib olla mitmeid – kataboolsete radade üle- või alatalitus, nende metaboliitide ebaefektiivne liikumine rakku või mitokondrisse, ETC langenud efektiivsus jpm. Võib-olla enim tuntud nendest on glükoosi üle rakumembraani transportiva mehhanismi sensitiivsuse langus oma induktori insuliini suhtes. Sellist nähtust nimetatakse insuliini resistentsuseks ja selle teket peetakse diabeedi väljaarenemise üheks peamiseks põhjuseks. Kuna diabeet on tänu halbadele toitumisharjumustele ühe suurenev koorem meditsiinisüsteemile, on see fenomen olnud intensiivse uurimise objektiks juba aastakümneid. Mitokondri funktsioon seost metaboolse paindumatus tekkega pole siiani väga hästi kirjeldatud, kuigi korrelatsiooni nende kahe vahel on täheldatud juba pikalt. Enamus uurimistööst on keskendunud häiretele mitokondri funktsioonis, mis põhjustaksid ebaefektiivset rasvade katabolismi, kuna vaid mitokondri on võimeline tootma ATP-d AcCoA-st. Häireid mitokondri funktsioonil on seetõttu pikalt peetud üheks peamiseks intramüotsellulaarsete lipiidide kuhjumise põhjuseks, mis on sarnaselt insuliini resistentsusele üheks peamiseks nähtuseks diabeedi patoloogias. Siiski on viimasel ajal hakanud

see seisukoht muutuma, kuna ühe suurenev hulk eksperimentaalseid andmeid viitab sellele, et lipiidide kuhjumine on eelkõige tingitud tugevalt tõusnud lipiidide sünteesist, mis küllastab ära mitokondri võime neid kataboliseerida (Goodpaster ja Sparks, 2017). Seega on seos mitokondri ja metaboolse paindumatuse tekke vahel hetkel veel ebaselge ning ei saa välistada teiste, seni kirjeldamata mehhanismide toimimist. (Galgani jt., 2008).

## **1.5 Energiavarud Drosophilas**

Rasvkeha mängib olulist rolli putukate füsioloogias. See on multifunktsionaalne kude, mille funktsioonideks on energiavarude säilitamine, hormoonide sekreteerimine, immuunvastuse tagamine ning toitumise sensoriks olemine. Peamisena endokriinse organina Drosophilas võib see sünteesida triatsüülgütseriide, diatsüülgütserooli, trehaloosi ja glükogeeni vastuseks energeetilistele nõuetele. Putukate energiavarud säilitakse glükogeeni ja triatsüülgütseriidide vormis rasvkeha adipotsüütides (rasvarakud, mis on olulised keha energiatasakaalu hoidmisel) (Arrese ja Soulages, 2010). Glükoosivarud talletakse organismis polüsahhariididena - glükogeenina, mis kasutatakse glükolüütilise kütusena. Glükogeeni kasutatakse in situ glükolüütilistes lihaskiududes selleks, et varustada glükolüüsi suure koormuse ajal. Drosophilas on see primaarne energia allikas lihaste kontrakteerumisel. Glükogeenivarud vastse lihastes omavad sarnast rolli, tagades primaarse energia lihaste funktsioneerimiseks limiteeritud toitainete tingimustes. Lisaks glükogeenile omavad täiskasvanud Drosophilad ka teist metaboolset süsivesikute tagavara – glükoosi disahhariidi trehaloosi, mis on peamine suhkur rasvkehas, tiivalihastes ja hemolümfis. Kuna glükoos on osmootselt aktiivne ning ka redutseeriv suhkur, on füsioloogiliselt parem hoida seda suhkrut inertse disahhariidi kujul. Samuti vallandab glükosiidsideme lõhkumine trehhaloosis kaks glükoosi molekuli, erinevalt ühest sama sideme lõhkumisel glükogeenis. Seepärast funktsioneerib trehhaloos kiirelt kättesaadava esmase energiatagavarana näit. lennu alustamisel (Reyes-DelaTorre jt., 2012). Kui glükogeeni esineb märkimisväärtetes kogustes ka teistes organites (näit. lihaskoes), on lipiidide kataboolse tagavara hoiustamise peamiseks kohaks rasvkeha (vähemal määral ka pea). Adipotsüütid võivad hoida suuri lipiidide varusi tsütoplasmaatiliste lipiiditilkade kujul. Lipiiditilkade metaboolne aktiivsus sõltub nendega assotsieerunud valkudest, mis reguleerivad triatsüülgütseriidide kogumist ja mobilisatsiooni. Kui organismi energiatarvidus tõuseb, mobiliseeritakse triatsüülgütseriidide varud lipaaside poolt läbi viidud lipolüüsi kaudu. Lipolüütiline aparaat sisaldab kahte lipaase TGL

(triatsüülgütseriidi lipaas) ja Brummer lipaasi ning kahte evolutsiooniliselt konserveerunud lipiidtilkade valke Lsd1 ja Lsd2. Brummer on ATGL lipaasi homoloog, mis kodeerib Lipiidtilkade-assotseerunud triglütseriidi (TG) lipaasi, stimuleerib lipolüüsi ja kontrollib täiskasvanu *Drosophila* TG süsteemi tasemeid. Lsd2 soodustab lipiidide kogumist ning Lsd1 stimuleerib triatsüülgütseriidide hüdrolyüsi. Lsd1 fosforüülimise tulemusena hakatakse adipokineetilise hormooni (AKH) lipolüütilist toimet ja aktiveeritakse TGL (Zhang ja Xi, 2014; Arrese ja Soulages, 2010).

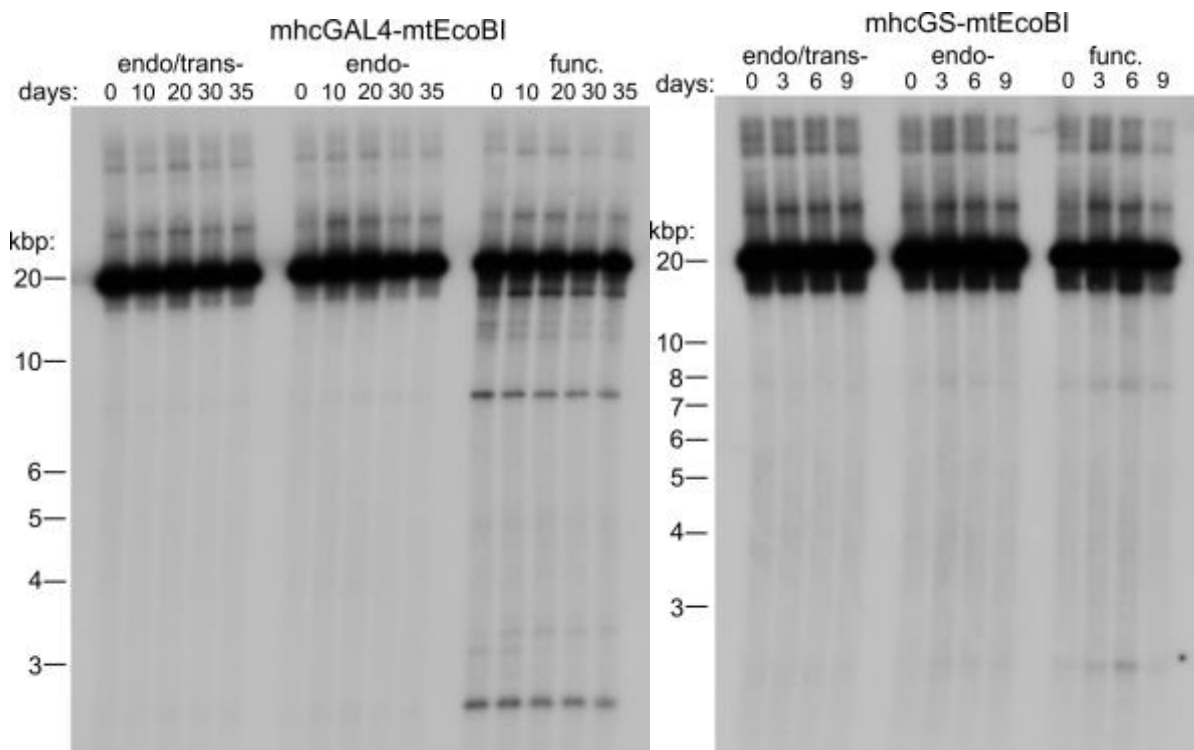
Rasvkeha energiavarude mobilisatsiooni reguleeritakse AKH kaudu, mis toodetakse spetsiifilise kesknärvisüsteemi osas nimega corpora cardiaca. Rasvkehas AKH stimuleerib glükogeeni lagundamist glükoosi disahhariidiks ehk trehaloosiks ning aktiveerib lipiidtilkade lipolüüsi. AKH poolt stimuleeritud lipolüüs *Drosophila* rasvkehas põhineb signaali ülekandel AKHR retseptori kaudu, mis on seotud G-valguga (Zhang ja Xi, 2014; Arrese ja Soulages, 2010).

## 1.6 Töögrupi publitseerimata andmed

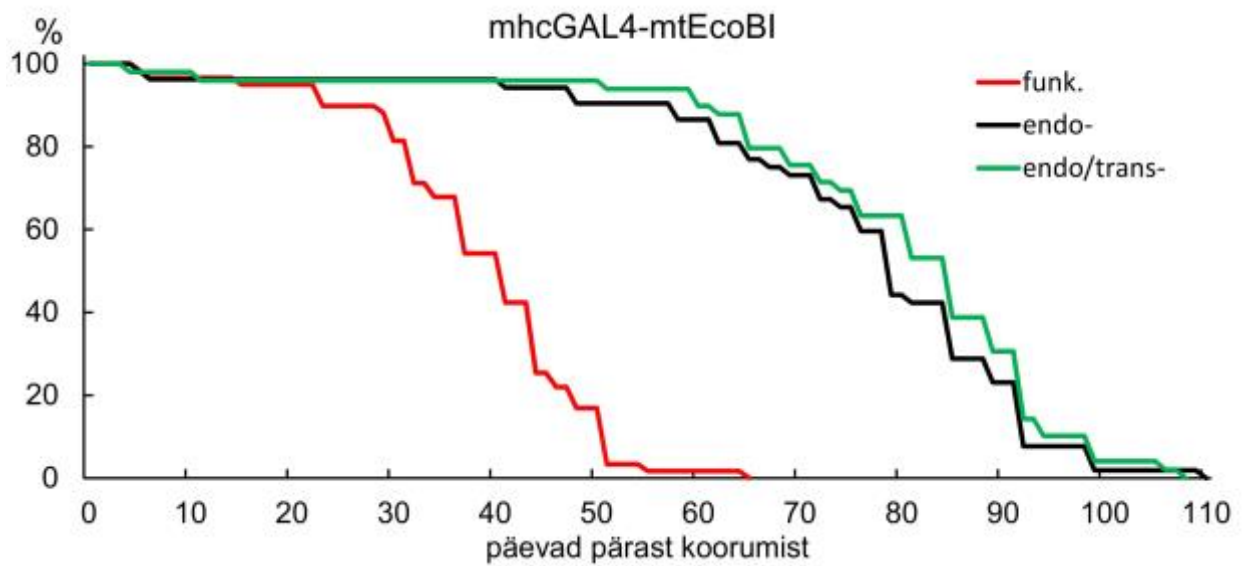
Meie töögrupp on avastanud eelneva uurimistöö käigus uudse seose mtDNA stabiilsuse ja metaboolse paindumatuse tekke vahel. Oleme konstrueerinud *Drosophila* tüve, mis ekspresseerib üheaegselt GAL4-UAS süsteemi kontrolli all mitokondriaalse signaaljärjestusega liidetud kõiki kolme bakteriaalse endonukleaasi EcoBI subühiku geene (*HsdM*, *HsdS* ja *HsdR*). Antud tüüpi endonukleaas omab kolme seostumisjärjestust *D. melanogasteri* mt genoomis. EcoBI kui tüüp I endonukleaasi tööpõhimõte erineb laialt levinud tüüp II endonukleasidest – olles loonud kontakti seostumisjärjestust omava DNA-ga, millel puuduvad metüleeritud adeniinid, hakkab ta translokeerima DNA-d, säilitades samal ajal kontakti oma seostumisjärjestusega. Kaheaheelaline katke genereeritakse juhuslikult pärast translokatsiooni lõppu, see võib paikneda tuhandete nukleotiidide kaugusel EcoBI seostumisjärjestusest. Selleks, et eraldada DNA fragmentatsioonist või translokatsioonist põhjustatud efekt, oleme genereerinud punktmutsatsioonide viimisega ühte subühikusse kaks erinevat mtEcoBI isovormi lisaks metsik-tüüpi valgule: endonukleaas-defektne kuid translokatsiooniliselt aktiivne (endo-, muteeritud subühiku nimetus R2) ja ensümaatilisel täiesti inaktiivne vorm (endo/trans-, muteeritud subühiku nimetus R4). Mitokondriaalse EcoBI vormi (mtEcoBI) ekspressiooni poolt põhjustatud fenotüüp lihaskoes sõltus väga tugevalt ekspressiooni algusest: konstitutsionaalne ekspressioon tänu müosiini raske ahela geeni promootori

alla asetatud GAL4-le (*mhc-GAL4*), mis on aktiivne juba vastse faasis, põhjustas täiskasvanud kärbses märkimisväärsed mtDNA fragmentatsiooni (vt. Joonis 5). Samas indutseeritud ekspressiooni tulemusena kasutades lihaskoe-spetsiifilist GeneSwitch süsteemi koos müosiini raske ahele promootoriga (*mhcGS*) täiskasvanud kärbses fragmenteerus mtDNA vaid väga vähesel määral (vt. Joonis 5). Huvitaval kombel ei korreleerunud mtEcoBI-st põhjustatud eluea lühenemine mtDNA fragmentatsiooni tugevusega – indutseeritud ekspressioon põhjustas kiiret letaalsust kahe nädala jooksul samas kui konstitutsionaalne ekspressioon korral elasid kärbsed umbes kuu (vt. Joonis 6 ja 7).

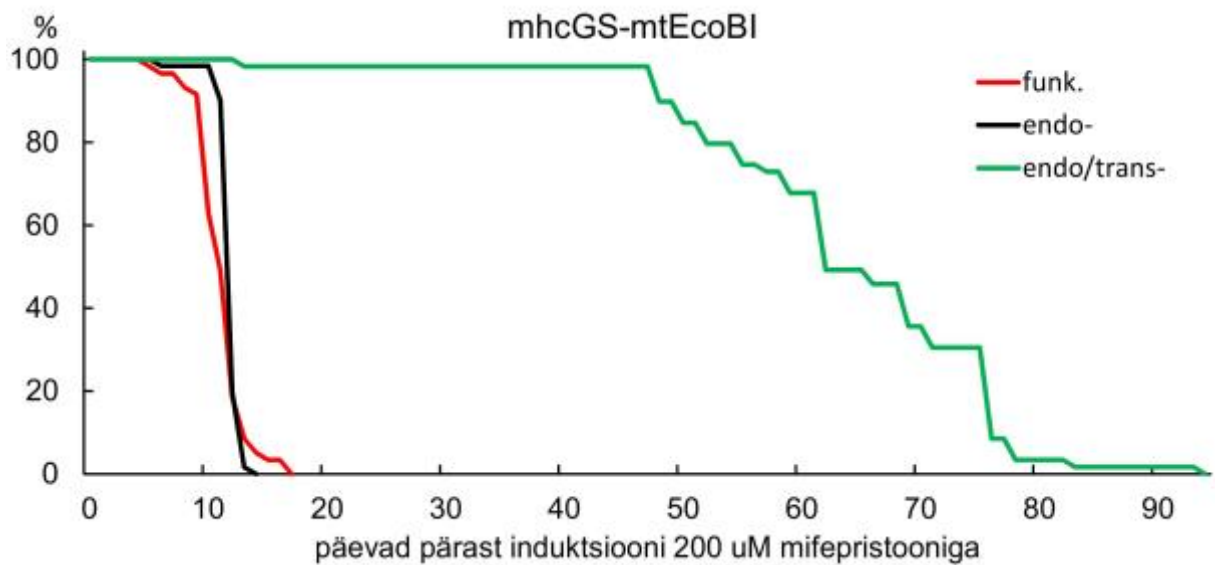
Kuna meie töögrupi varajasemad andmed on näidanud üldise, kõiki kudesid hõlmava mtEcoBI ekspressiooni korral rasvade eelistatud kasutamist võrreldes süsivesikutega, huvitas meid, kas sarnane fenomen toimub ka lihaskoe-spetsiifilise ekspressiooni korral. Samuti soovisime teada, kuidas utiliseeritakse erinevaid energiavarusi kahe erineva, konstitutsionaalse ja indutseeritava lihaskoe ekspressiooni mustri puhul.



**Joonis 5.** Lineariseeritud mtDNA topoloogia Southern analüüs. Kap: kiloaluspaarid, päevad on vastavalt kas alates koorumisest (*mhcGAL4-mtEcoBI*) või alates induktsioonist (*mhcGS-mtEcoBI*)



**Joonis 6.** mhcGAL4 – mtEcoBI tüvede elulemus.



**Joonis 7.** mhcGS – mtEcoBI tüvede elulemus pärast induktsiooni 200 uM MP-ga.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutab mtEcoBI ekspressiooni poolt indutseeritud mtDNA stress *D. melanogaster*-i lihaskoes peamiste energiavarude, lipiidide ja süsivesikute utiliseerimist, kasutades triglüsteriidide ja süsivesikute kontsentratsiooni mõõtmise meetodeid ning uurida võimalikke erinevusi lihaskoe fenotüübis.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Drosophila käitlemine, tehnikad ja tüved

*D. melanogasteri* suuremate või väiksemate kärbskoguste kasvatamiseks kasutati vastavalt vajadusele erineva suurusega plastikkonteinereid (pudeleid ja viaale).

Konteinerites oleva söötme koostis oli järgmine:

**Tabel 1.** Töös kasutatud söötmete koostis.

Koostis	Kogus
Agar	1%
Pärm	3,5%
Maisijahu	1,5%
Sojajahu	1%
Sahharoos	1,5%
Glükoos	3%
Suhkrusiirup	3%
Propioonhape	0,5%
Nipagiin	0,1%

Komponendid segati vees ja kuumutati keemiseni. Söödet keedeti 20 min, pärast mida lasti jahtuda temperatuurini 65°C. Pärast seda lisati antifungitsiidseid ja antibakteriaalseid aineid propioonhape ja nipagiin ja vajadusel mifepristooni lõppkontsentratsioonis 200 uM, millega indutseeriti GeneSwitch süsteemi kaudu mtEcoBI ekspressioon. Pärast paariminutilist segamist jaotati vedel sööde konteineritesse ning lasti tarduda. Liigse niiskuse tekke vältimiseks kuivatati

tardunud söödet enne korkimist paar tundi toatemperatuuril. Söödet hoiti max. 3 nädalat 4°C juures.

Drosophila anesteseerimisel kasutati CO<sub>2</sub> gaasi. CO<sub>2</sub> anesteesia võimaldab hoida kärbeid liikumatuna ning seda saab kasutada vähemalt pool tundi enne, kui see hakkab mõjuma negatiivselt kärbeste elulemisele. CO<sub>2</sub> manustati läbi klaaskiust aluse (Genesee, vt. Joonis 8 ja 9).



**Joonis 8.** Töös kasutatud mikroskoop.



**Joonis 9.** CO<sub>2</sub> gaasi plaat ja püstol.

Neitsite korjamisel hoiti äädikakärbeid pärast nukkudest koorumise algust 18°C juures eesmärgiga pikendada perioodi, mille jooksul koorunud emased ei kopuleeru. Neitsid eraldati kaks korda päevas – hommikul enne kella 9.00 ja õhtul kella 17.00 ajal. Kuna 18°C juures on neitsiperiood 16 tundi, tagati sellega kõikide emaste neitsiks olemine. Koorunud äädikakärbeste hulgast eraldati emased uutesse viaalidesse ning isased elimineeriti. Emased on tunduvalt suuremad võrreldes isastega ning nende tagakeha värv on heledam. Lisaks emastel puuduvad käppadel mustjad harjaseid. Visuaalselt kontrolliti söötme pinda, et vältida ajutiselt söötmele kinni jäänud emaste jäämine pudelitesse ja nende korjamine järgmisel kellaajal neitsitena. Kui õppetöö graafik ei võimaldanud antud kellaegadest kinnipidamist, eraldati neitsitena vaid need emased, keda oli teistest emastest võimalik eristada mittetäieliku pigmentatsiooni abil (vt. Joonis 10). Värskest koorunud kärbsed ei pigmenteeru täielikult paari esimese elutunni jooksul, seega on kõik vähe pigmenteerunud emased neitsid.



**Joonis 10.** Äsja koorunud mittetäielikult pigmenteerunud *D. melanogasteri* neitsi (vasakul) ja normaalse pigmentatsiooniga emane (paremal).

Käesolevas töös kasutatud *Drosophila* tüved on kirjeldatud Tabelis 2.

**Tabel 2.** Töös kasutatud *Drosophila* tüvede nimetused, kirjeldused ja genotüübid.

Tüve nimi	Tüve kirjeldus	Genotüüp	Allikas
<b>funk. mtEcoBI</b>	Funktsionaalne mtEcoBI UAS-süsteemi kontrolli all.	$y^1 w^*$ ; <i>HsdM HsdS</i> ; <i>HsdR</i>	Meie töögrupp
<b>endo - mtEcoBI</b>	Endonukleas-defektne mtEcoBI UAS süsteemi kontrolli all.	$y^1 w^*$ ; <i>HsdM HsdS</i> ; <i>HsdR2</i>	Meie töögrupp
<b>endo/trans-mtEcoBI</b>	Mittefunktsionaalne mtEcoBI UAS-süsteemi kontrolli all.	$y^1 w^*$ ; <i>HsdM HsdS</i> ; <i>HsdR4</i>	Meie töögrupp
<b>mhcGAL4</b>	Lihaskoe-spetsiifiline GAL4 „driver“.	$y^1 w^*$ ; mhcGAL4	S. Bernsteini töögrupp
<b>mhcGS</b>	Lihaskoe-spetsiifiline GAL4-progesterooni retseptori fusioonvalgul põhinev „driver“.	$y^1 w^*$ ; $wg^{Sp-1}/CyO$ ; P{Mhc-Switch.O}GSG314- 2	Bloomington Stock Center #43641

Neitsid säilitati värskel söötmel kuni oli korjatud piisav hulk ristamisteks. Enne ristamist kontrolliti veel kord kogutud neitsite sugu ja vaadeldi, kas on märgata arenevaid larve söötmel, kus hoiti neitseid. Larvide või isaste tuvastamisel elimineeriti kõik antud viaalis olnud emased. Omavahel ristati järgmiseid liine:

*HsdM HsdS/ HsdM HsdS; HsdR/ HsdR x mhcGAL4/mhcGAL4: HsdM HsdS/+; HsdR/mhcGAL4*  
*HsdM HsdS/ HsdM HsdS; HsdR2/ HsdR2 x mhcGAL4/mhcGAL4: HsdM HsdS/+;*  
*HsdR2/mhcGAL4*

*HsdM HsdS/ HsdM HsdS; HsdR4/ HsdR4 x mhcGAL4/mhcGAL4: HsdM HsdS/+;*  
*HsdR4/mhcGAL4*

*HsdM HsdS/ HsdM HsdS; HsdR/ HsdR x mhcGS/mhcGS: HsdM HsdS/+; HsdR/mhcGS*

*HsdM HsdS/ HsdM HsdS; HsdR2/ HsdR2 x mhcGS/mhcGS: HsdM HsdS/+; HsdR2/mhcGS*

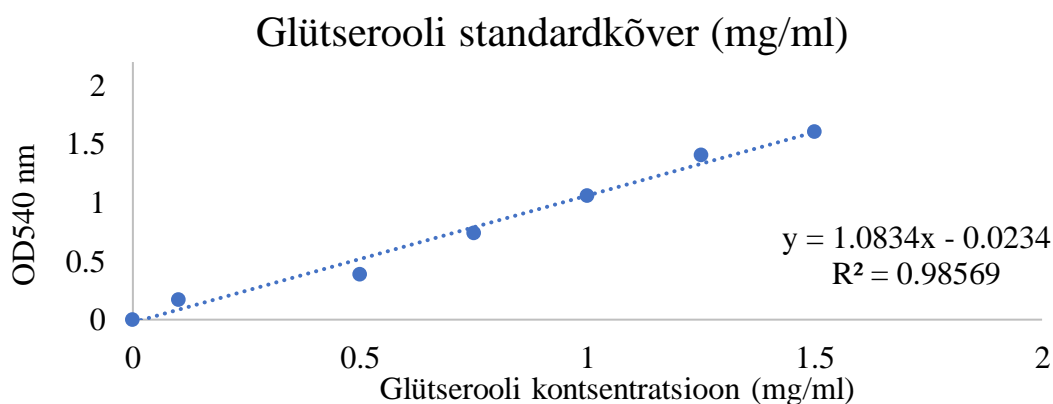
*HsdM HsdS/ HsdM HsdS; HsdR4/ HsdR4 x mhcGS/mhcGS: HsdM HsdS/+; HsdR4/mhcGS*

Ristamised viidi läbi suhtes 2:1 (emased:isased), absoluutarvudes 60:30 ühe pudeli kohta. Pudeleid hoiti 3 päeva 25°C juures, pärast mida vanemad kanti vajadusel üle uutesse pudelitesse või elimineeriti. Larvistaadiumis järglaskonnaga pudeleid inkubeeriti 25°C juures, täiskasvanud isendid koguti järgnevateks eksperimentideks mitte rohkem kui 3 päeva jooksul alates nukust koorumisest. Koorunud kärbestest selekteeriti isased 1-2 ööpäeva jooksul pärast koorumist ja kanti kas tavalisele söötmele (mhc-mtEcoBI) või söötmele, mis sisaldas 200 uM MP-d (mhcGS-mtEcoBI). Kärbesed kanti värsele söötmele iga 48 tunni tagant ja ajapunktid korjati päevadel 1, 3, 6, ja 9 mhcGS-mtEcoBI tüvede puhul ning 1, 10, 20 ja 30 mhc-mtEcoBI tüvede puhul.

### **2.2.2 Triatsüülgütseriidide mõõtmine**

Triatsüülgütseriidide mõõtmiseks jälgiti vaba glütserooli teket pärast rasvade lipolüüsi kasutades selleks Sigma reagente Triglyceride Reagent (Sigma, T2449) ja Free Glycerol Reagent (Sigma, F6428). Triglyceride Reagent sisaldab lipaasi, mille toimel proovis olevad triatsüüöglütseriidid hüdrolüüsitakse glütserooliks ja vabadeks rasvhapeteks. Free Glycerol Reagent võimaldab mõõta glütserooli läbi järjestikuste reaktsioonide, mille lõpptulemusena tekib värvaine, mida on võimalik detekteerida spektrofotomeetril. Glütserool fosforüleeritakse adenosiin-5'-fosfaati (ATP) abil glütserool-1'-fosfaadiks (G-1-P) ja adenosiin-5'-difosfaadiks (ADP) reaktsioonis, mis katalüüsitakse glütserooli kinaasi poolt (GK). G-1-P oksüdeeritakse glütserooli fosfaatoksüdaasi (GPO) abil dihüdrosüatsetoon fosfaatiks (DAP) ja hüdrogeeniperoksiidiks (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Peroksüdaas

(POD) katalüüsib H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4-aminoantipüriini (4-AAP) ja naatrium N-etiül-N-(3-sulfopropüül) m-anisidiiniga (ESPA) muutumise värvaineks kvinoneimiini mille neelduvusmaksimum on 540 nm juures. Kvinoneimiini kontsentratsioon lahuses on proportsionaalne algse triatsüüüglütseriidide kontsentratsiooniga. 20 isast kärbest homogeniseeriti uhmrinuiaga 800 µl PBS-Tweenis (0,1%) jääl. Järgnevalt inkubeeriti lüsaati 5 min 70° C juures selleks, et inaktiveerida endogeenseid lipaase. 20 µl kuumtöödeldud homogenaati eraldati uude katsutisse ja lisati 20 µl Triglyceride Reagenti. Teise uude katsutisse pandi samuti 20 µl kuumtöödeldud homogenaati, millele lisati 20 µl PBS-i. Mõlemat inkubeeriti 30 min 37° C juures. Homogenaate tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 10.000 x g 15 sekundi jooksul. Edasi triatsüüüglütserooli mõõtmiseks kanti 96-mikroitiiterplaadile 100 µl Free Glycerol Reagenti ja 30 µl homogenaati, inkubeeriti 5 min 37° C juures ja mõõdeti neeldumine spektrofotomeetril 540 nm juures. PBS-ga töödeldud homogenaadi tulemus ehk vaba glütserooli väärtus lahutati Triglyceride Reagentiga töödeldud homogenaadi väärtusest, mille tulemusena saadi triatsüüüglütseriidide koostises olnud glütserooli kogus. Iga tüve igast ajapunktidest analüüsiti 4 erinevat proovi, tulemused esitatakse kui selle analüüsi keskmised koos standardhälvetega. Kahesuunalise Student t-testi p-väärtused arvutati Microsoft Excel-iga, kus koostati ka kaliibergraafik (vt. Joonis 11) ning arvutati OD väärtuste järgi glütserooli kontsentratsioon lahuses. Glütserooli lõppkontsentratsioonid varieerusid 0,130 mg/ml ja 0,980 mg/ml vahel.



**Joonis 11.** Glütserooli kontsentratsiooni *HsdM HsdS/+; HsdR4/mhcGAL4* tüve 1.päeva kaliibergraafik.

### 2.2.3 Süsivesikute mõõtmine

*Drosophila* energiavarudena kasutusel olevaid süsivesikuid glükoosi, trehhaloosi ja glükogeeni mõõdeti kasutades Glucose Assay Reagent (Sigma, G3293) pärast trehhaloosi ja glükogeeni lagundamist glükoosiks kasutades selleks vastavalt trehhalaasi (Sigma, T8778) ja

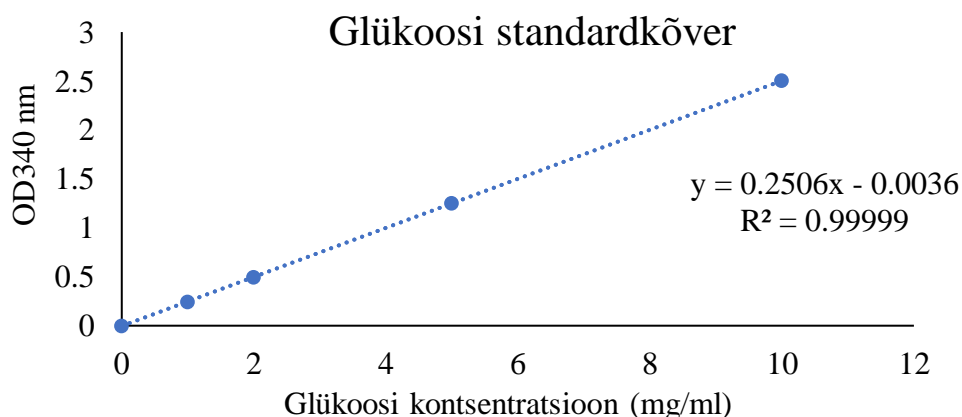
amüloglükosidaasi (Sigma, A1602). Antud reagenti abil kulgevates reaktsioonides fosforüleeritakse kõigepealt glükoos glükoos-6-fosfaadiks (G6P) ATP abil reaktsioonis, mis on katalüüsitud heksokinaasi poolt. G6P oksüdeeritakse 6-fosfo-glükonaadiks oksüdeeritud NAD juuresolekul glükoos-6-fosfaat dehüdrogenaasi (G6PDH) poolt katalüüsitud reaktsioonis. Selle tulemusena redutseeritakse NAD<sup>+</sup> NADH-ks, mille neeldumismaksimum on 340 nm ja mida detekteeritakse spektrofotomeetril. Glükoosi mõõtmiseks homogeniseeriti 10 isast kärbest uhmrinuiaga 400 µl PBS-s jää. Edasi inkubeeriti 70°C juures 5 min inaktiveerimaks endogeenseid ensüüme, mis võiksid lagundada glükoosi ja jaotati 40 µl kuumtöödeldud homogenaati kolme uude katsutisse, kuhu lisati vastavalt 6,7 µl amüloglükosidaasi (1 U, Sigma, A1602) 6,7 µl PBS ja 1 µl trehhalaasi (1 U, Sigma, T8778). Inkubeeriti 2 tundi 37°C. Pärast inkubeerimist, tsentrifuugiti 10.000 x g rpm 15 sek jooksul ja kanti 100 µl Glucose Assay Reagenti 96-kohalisse mikrotiiterplaati. Glükoosi kaliiberkõvera saamiseks kasutati glükoosi lahuseid kontsentratsiooniga 0 mg/ml kuni 20 mg/ml ja pipeteeriti iga reaktsioonituubi 30 µl homogenaati. Tausta määramiseks kanti 30 ul lüsaati 100 ul-sse PBS-i. Edasi inkubeeriti 30 min 37°C juures ja mõõdeti OD340. Erinevate süsivesikute kontsentratsioonid saadi järgnevate tehete tulemusena:

PBS-ga töödeldud proov – lüsaat PBS-s = vaba glükoos

Trehhalaasiga töödeldud proov – PBS-ga töödeldud proov = trehhaloos

Amüloglükosidaasiga töödeldud proov – PBS-ga töödeldud proov = glükogeen

Kahesuunalise Student t-testi p-väärtused arvutati Microsoft Excel programmis, kus koostati ka kaliibergraafik (vt. Joonis 12). Antud juhul glükoosi lõppkontsentratsioonid varieeruvad 1,180 mg/ml ja 2,480 mg/ml vahel.



**Joonis 12.** Glükoosi kontsentratsiooni MS/+; R4/mhcGAL4 tüve 10.päeva kaliibergraafik.

## 2.2.4 Valgu kontsentratsiooni määramise meetodid

**Bradford'i meetod** – meetod põhineb kompleksi detekteerimisel värvaine Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) ja valkude vahel. Meetodi abil on võimalik määrata valgu kontsentratsiooni vahemikus 100-1,500 µg/ml. CBBG reageerib arginiini ja hüdrofoobsete aminohappejääkidega, moodustades kompleksi valguga, mis värvub siniseks. Kuna CBBG kontsentratsioon on tunduvalt suurem valgu kontsentratsioonist, siis suureneb lahuse absorptsiooni 590 nm piirkonnas võrdeliselt valgu kontsentratsiooniga. Nii triatsüülglütseriidide kui ka süsivesikute mõõtmisel kanti 4 ul kuumtöödeldud homogenaati 96-kohalisele mikrotiiterplaadile koos 200 µl Bradford'i Reagentiga. Kaliiberkõvera jaoks kasutati veise seerumi albumiini (BSA) lahuseid kontsentratsioonidega alates 0 mg/ml kuni 2 mg/ml. Proove inkubeeriti 5 min 37°C juures, mõõdeti absorptsiooni 595 nm juures ning koostati kaliibrimiskõver valgustandardi lahjendusrea absorptsiooni tulemuste põhjal.

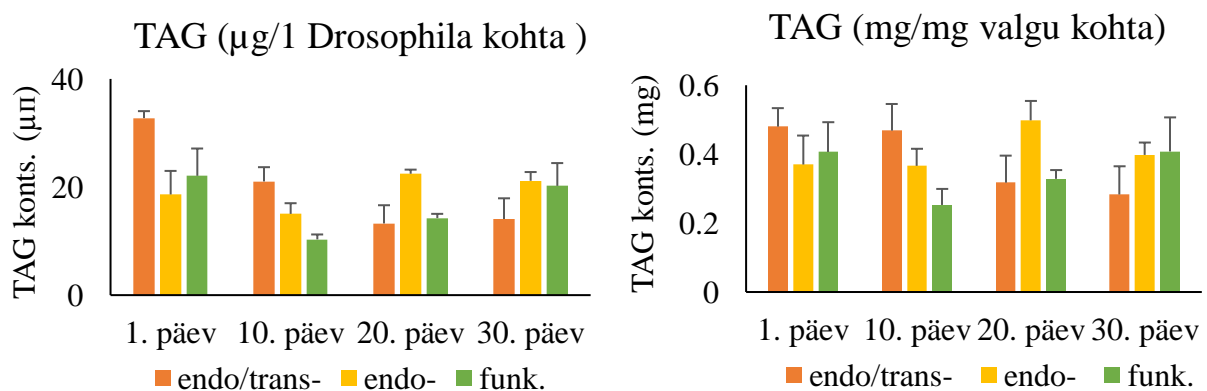
**Lowry meetod** - kolorimeetiline valgu määramine lahuses. Leeliselises keskkonnas  $\text{Cu}^{2+}$  ioonid moodustavad kompleksi peptiidsidega, moodustades  $\text{Cu}^+$  iooni. Vase ühevalentsed ioonid ja aromaatsed aminohappe jäägid reageerivad Folin-Ciocalteu reaktiiviga moodustades molübdeensinise värvaine. Kompleksi värvuse intensiivsus on proportsionaalne valgu kontsentratsiooniga uuritavas proovis ning mõõdetakse spektrofotomeetri abil. Valmistati vajalikku töölahust, kus segati Folin-Ciocalteu Reagent (Sigma, F9252) veega 1:1 suhtes ning segati kuni sademe lahustumiseni. Edasi 10 isast kärbest homogeniseeriti uhmrinuiaga 400 ul PBS-s jää. 96-kohalisse mikrotiiterplaati pipeteeriti 200 µl Lowry Reagenti ja 10 µl BSA standardid kontsentratsiooniga alates 0 mg/ml kuni 2 mg/ml. Teiste reaktsioonituubi lisati homogenaati. ja inkubeeriti 10 min jooksul toatemperatuuril. Pärast inkubeerimist lisati 20 µl Folin-Ciocalteu Reagenti iga reaktsioonituubi ja segati koheselt. Järgnes inkubatsioon toatemperatuuril 30 min jooksul, pärast mida mõõdeti optiline neeldumine 750 nm juures.

**BCA** – meetodi printsiip on analoogne Lowry meetodiga: leeliselises keskkonnas redutseerivad valgu peptiidsidega  $\text{Cu}^{2+}$ -ioonid  $\text{Cu}^+$ -ioonideks, mis reageerivad bikinkoniinhappega, moodustades sinakasvioletse värvusega kompleksi. Kompleksi värvuse annab  $\text{Cu}^{2+}$  ionide seostumine nelja polüpeptiidi koostisse kuuluva aminohappe lämmastiku aatomiga ning värvuse intensiivsus sõltub valgu kontsentratsioonist ja  $\text{Cu}^+$  ionide hulgast. Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks valmistati vajalikku BCA Reagent: segati kokku BCA Reagent B ja BCA Reagent A

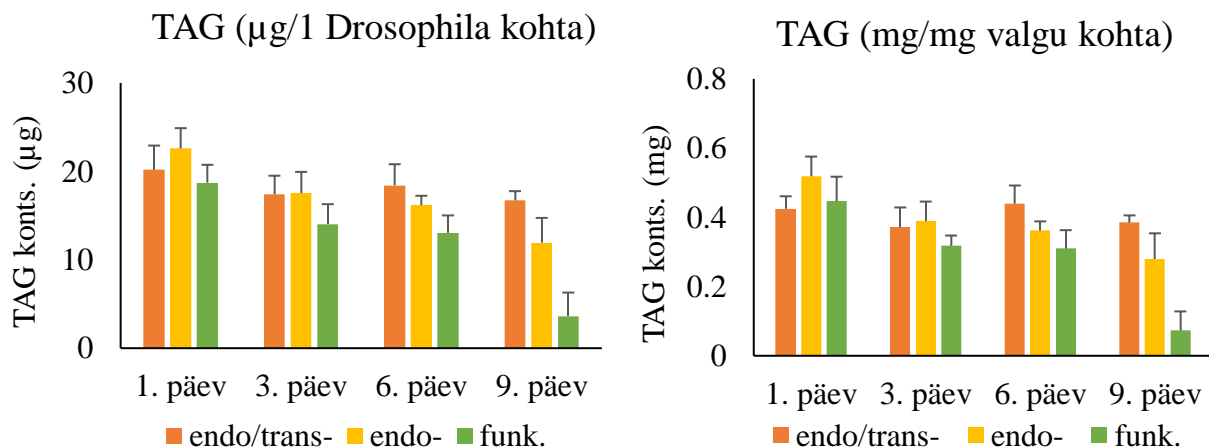
(Sigma, BCA1) suhtes 1:50-le ning segati kuni sademe lahustumiseni. Järgnevalt homogeniseeriti 10 isast kärbest uhmrinuiaga 400 µl PBS jääs. 96-kohalise mikrotiiterplaadile kanti 200 µl BCA Reagenti ning 10 µl BSA standardit (konts. alates 0 mg/ml kuni 2 mg/ml). Teise reaktsioonituubi pipeteeriti 200 µl BCA Reagenti ja 5 µl homogenaati. Mikrotiiterplaati inkubeeriti 30 min 37°C juures ning optiline neeldumine mõõdeti 562 nm juures.

### 2.3. Tulemused

Triatsüülglütseriidide mõõtmise eesmärgiks oli uurida ja võrrelda indutseeritud ja konstitutiivse lihaskoe-spetsiifilise mtEcoBI ekspressiooni TAG-de tasemeid. TAG-i kvantifitseerimine on sageli esimeseks sammuks metaboolses uuringus koos süsivesikute mõõtmisega. Mõlema ekspressioonimustri puhul analüüsiti nelja ajapunkti, mis olid omavahel analoogsed populatsiooni elulemuse suhtes: 1, 3, 6 ja 9 päeva mhcGS ja 1, 10, 20 ja 30 päeva mhc puhul (vt. Joonis 13 ja 14). TAG-de tase on esitatud nii ühe kärbe kohta kui ka mg valgu kohta (mõõdetud Bradfordi meetodiga). Tulemustest on näha, et TAG-i varude muutused on märkimisväärselt erinevad konstitutiivse ja indutseeritud mtEcoBI ekspressiooni korral. Kuigi mhc-mtEcoBI tüvedes kõigub TAG-de tase märkimisväärselt vaadeldud perioodi jooksul, on vahetel enne populatsiooni kiire suremise algust funk. ja endo- mtEcoBI ekspresseerivates tüvedes TAG-e rohkem kui endo/trans- kandvas kontrolltüves (vt. Joonis 13). P-väärtused olid 30. päeva ajapunktis järgmised: endo/trans- vs. funk. 0,363325795 ja endo/trans- vs. endo- 0,014387161. Samas langeb täiskasvanud kärbestes indutseeritud mtEcoBI tulemusena TAG-de kogus väga märkimisväärselt funk. ja endo- tüves võrreldes kontrolliga, demonstreerides lipiidide tagavarade järsku vähenemist enne surma. P-väärtused olid 9. päeva ajapunktis järgmised: endo/trans- vs. funk.  $4,17309 \cdot 10^{-5}$  ja endo/trans- vs. endo- 0,018628918.



**Joonis 13.** mhcGAL4-mtEcoBI tüvede TAG tase Drosophila ja mg valgu kohta

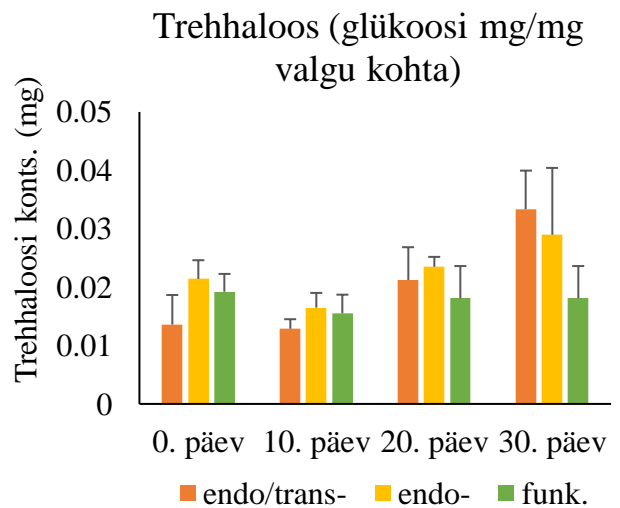
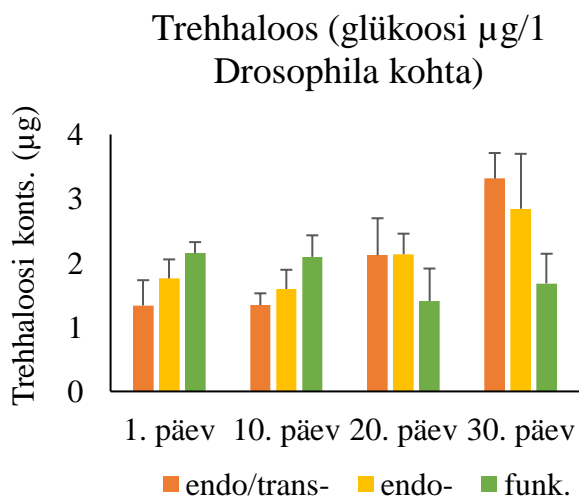
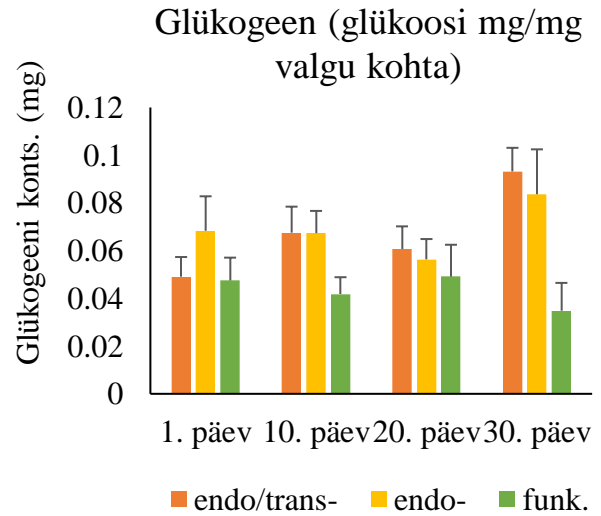
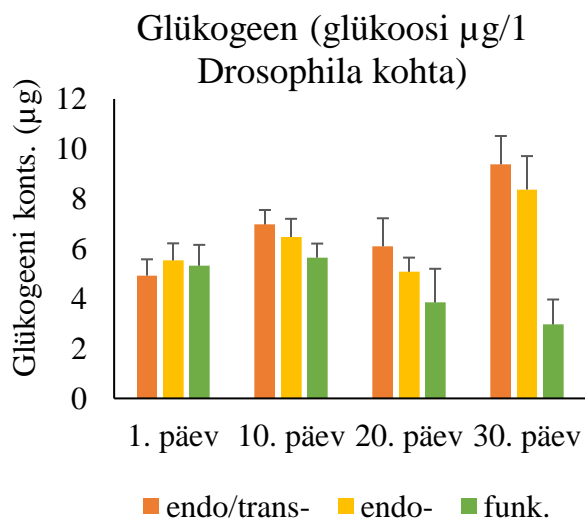
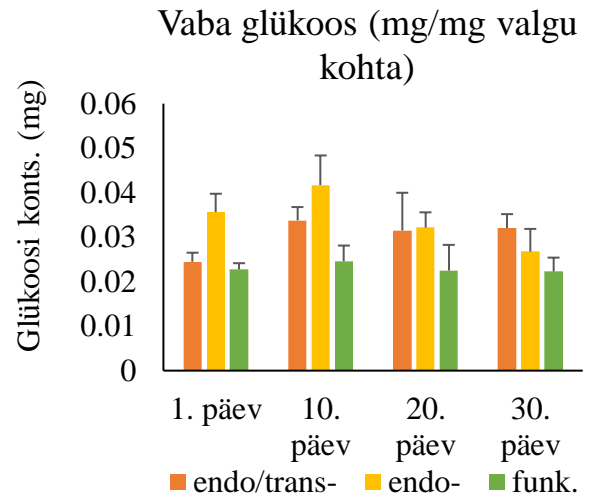
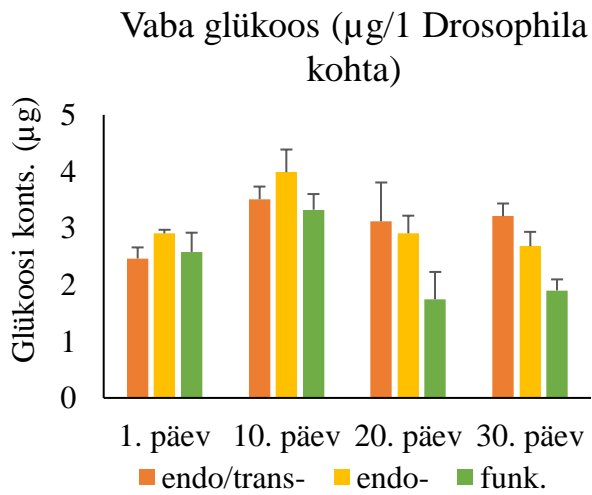


**Joonis 14.** mhcGS-mtEcoBI tüvede TAG tase ühe *Drosophila* ja mg valgu kohta.

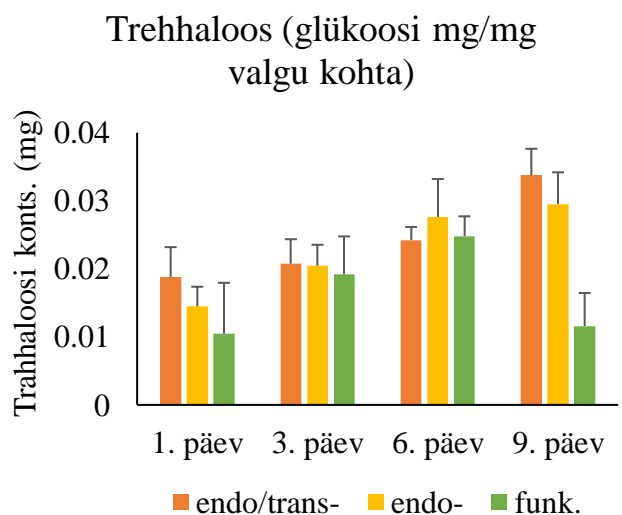
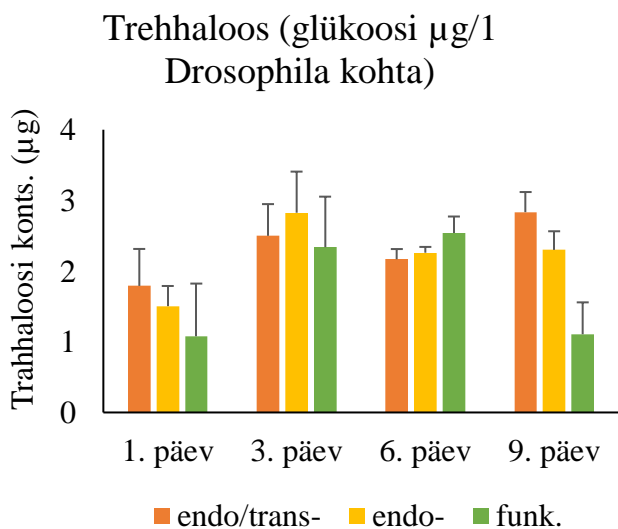
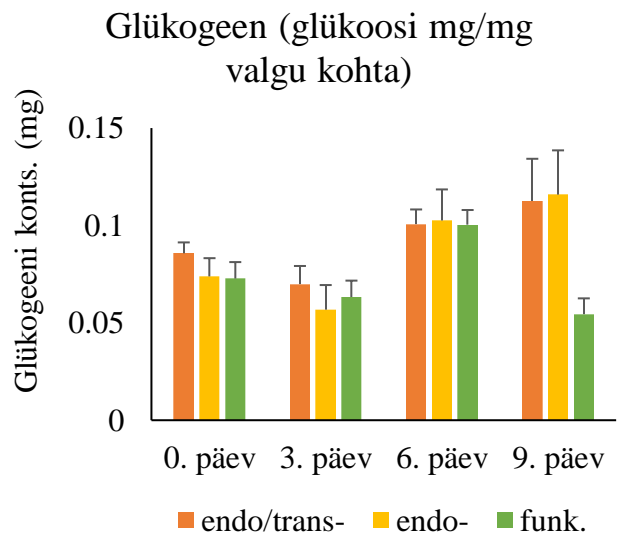
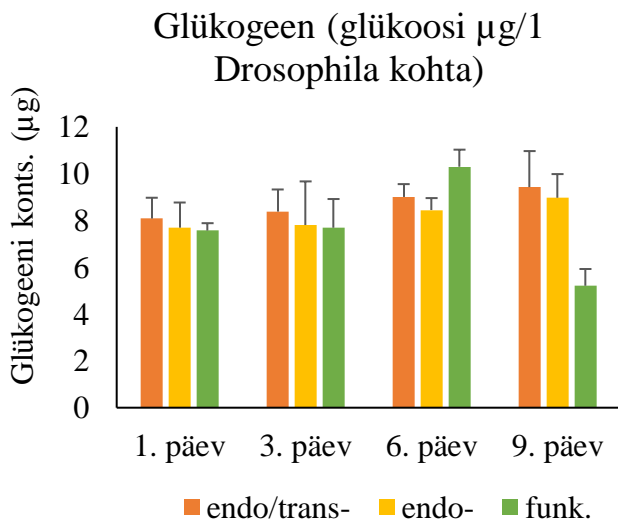
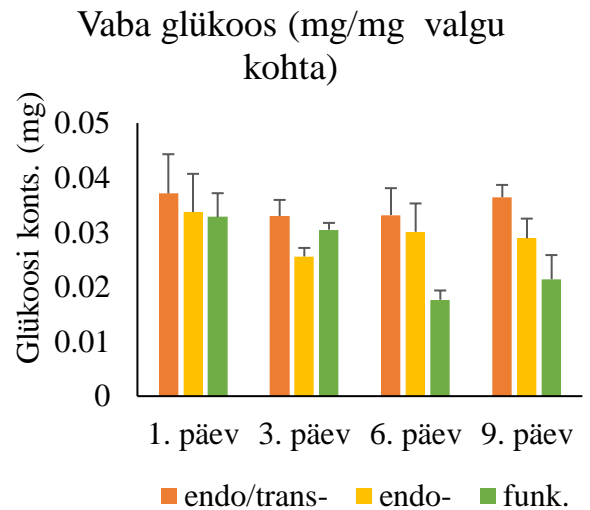
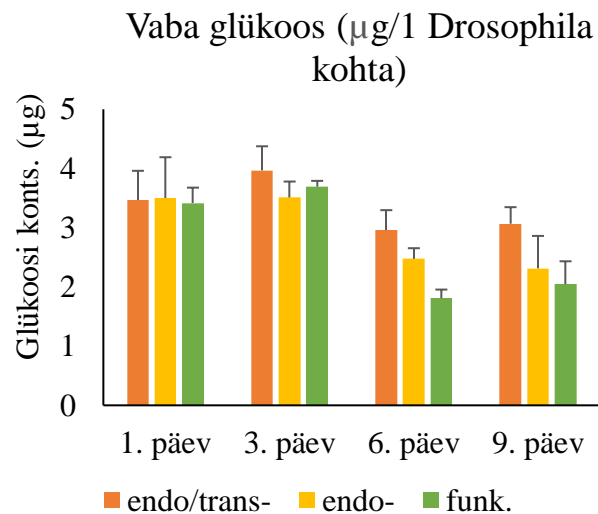
Selleks, et kindlaks teha, kas lipiidide varu vähenemisega kaasneb ka süsivesikute tagavarade vähenemine, määrasin vaba glükoosi, trehhaloosi ja glükogeeni kogused samades ajapunktides mõlema ekspressioonimustri korral. Nagu ka TAG-de puhul, on andmed esitatud normaliseerituna nii ühe kärbsse kohta kui ka valgukoguse kohta. Konstitutsionaalse lihaskoe ekspressiooni korral väheneb glükogeen funk. tüves päevaks 30 umbes 50%-ni kontrolltüve tasemest (vt. Joonis 14). Analoogne süsivesikute vormide vähenemine toimus ka trehhaloosi ja glükogeeni korral. Ka indutseeritud, mhcGS-mtEcoBI ekspressiooni korral oli märgatav süsivesikute tagavarade vähenemine enne surma mõlemas, endo- ja funk. tüves võrreldes kontrolltüvega, kuid see polnud kaugeltki mitte nii drastiline kui triatsüülgütseriidide puhul. Seega ei korreleerunud süsivesikute vähenemine lipiidide tagavara vähenemisega lihaskoe ekspressioonil. P-väärtused 30. päeva (mhcGAL4) ja 9. päeva (mhcGS) mõõtmistulemuste vahel on toodud Tabelis 3.

**Tabel 3.** mhcGAL4-mtEcoBI tüvede 30. päeva ja mhcGS-mtEcoBI tüvede 9. päeva süsivesikute p-väärtused.

	endo/trans- vs. funk	endo/trans- vs. endo-
<b>Vaba glükoos mhcGAL4</b>	9,15879*10 <sup>-6</sup>	0,007826263
<b>Glükogeen mhcGAL4</b>	1,26075*10 <sup>-5</sup>	0,234355416
<b>Trehhaloos mhcGAL4</b>	0,000322513	0,296171203
<b>Vaba glükoos mhcGS</b>	0,001386087	0,025451885
<b>Glükogeen mhcGS</b>	0,000542354	0,595508349
<b>Trehhaloos mhcGS</b>	8,93059*10 <sup>-5</sup>	0,015203273

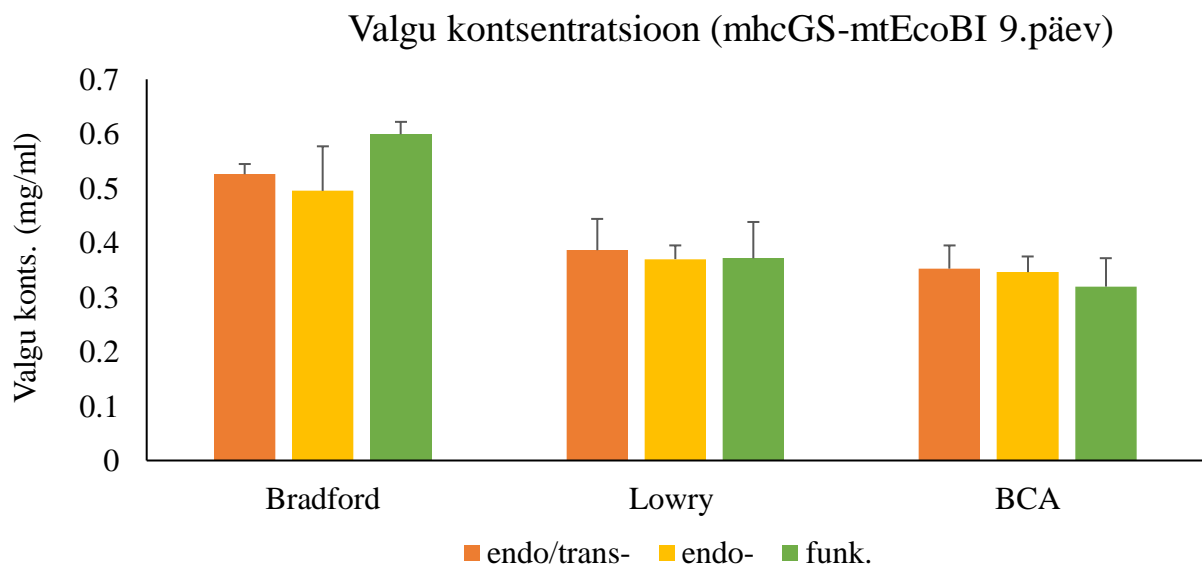


Joonis 15. mhcGAL4-mtEcoBI tüvede süsivesikute tase Drosophila ja mg valgu kohta.



**Joonis 16.** mhcGS-mtEcoBI tüvede süsivesikute tase Drosophila ja mg valgu kohta.

Nii süsivesikute kui ka lipiidide koguste mõõtmisel on tavaline, et tulemused normaliseeritakse üldise valgukoguse kohta, mis funktsioneerib sisemise kontrollina. Sellistel juhtudel on enamlevinud Bradfordi meetod valkude määramiseks. Süsivesikute ja lipiidide mõõtmisel täheldasin, et indutseeritud ekspressiooni korral oli funk. mtEcoBI tüve puhul hilisel ajapunktil (päev 9) valgu kontsentratsioon kärbse kohta alati tõusnud (vt. Joonis 17). See võib viidata mtDNA stressi poolt põhjustatud muutustele rakulisel translatsioonil ja/või valkude degradatsioonil, mis võib viia valkude kuhjumisele. Kuid samuti võis olla selle tulemuse põhjuseks metaboolse homöostaasi muutustest tingitud kontsentratsioonide muutused ühendite puhul, mis mõjutavad Bradfordi reaktsiooni. Seetõttu mõõtsin mhcGS-mtEcoBI tüvede 9.päeva ajapunktide kärbestes valgukontsentratsioonid ka kasutades kahte teist meetodit – Lowry ja BCA meetod. Tulemused näitasid, et nende kahe meetodi puhul ei olnud täheldada valgu taseme tõusu funk. mtEcoBI tüves võrreldes endo/trans- ja endo- tüvedega (vt Joonis 17). Seetõttu võib täheldatud tugevamat Bradfordi reaktsiooni antud tüve 9. päeva ajapunktis pidada valepositiivseks tulemuseks, mis on tõenäoliselt tingitud metaboolsete muutuste poolt *Drosophilas*.



**Joonis 17.** mhcGS-mtEcoBI tüvede 9.päeva valgu kontsentratsioon, mis mõõdetud Bradfordi, Lowry ja BCA meetoditega.

## 2.4 Arutelu

Tulemuste põhjal on selge, et triatsüülglütseriidide tase väheneb järsult täiskasvanud *Drosophila* indutseeritud mtEcoBI ekspressiooni korral eluea lõpuosas, langedes funk. mtEcoBI tüves 9. päevaks umbes 20%-ni kontrolltüve tasemest. Efekt endo- isovormi kandvas tüves oli nõrgem, kuid järgis üldiselt sama mustrit. Vastupidiselt selle fenomenile ei toimunud märkimisväärset lipiidide tagavara vähenemist konstitutiivse ekspressiooni korral, mille puhul mtEcoBI süntees oli aktiveeritud juba vastsestaadiumi lihaskoes. Teise põhilise energiareservuaari, süsivesikute puhul oli samuti märgata teatud taseme langust nii indutseeritud kui ka konstitutiivse ekspressiooni puhul. Siiski oli selline vähenemine märgatavalt väiksem kui lipiidide puhul, mistõttu ei saa tegemist olla toitainete omastamise defektist tingitud sekundaarse nähtusega, kuna näljatingimustest vähenevad glükogeeni tagavarad esimestena ja palju kiiremini kui lipiidid (Barrio jt., 2014). See viitab indutseeritud mtEcoBI ekspressiooni korral lipiidide eelistamisele katabolismi allikana ja seeläbi metaboolse paindlikkuse kadumisele. Samuti tuleb meeles pidada, et analüüsi terveid *Drosophilaid*, samas kui ekspressioon oli limiteeritud vaid lihaskoega. Energeetiliselt aktiivse koena on lihased küll väga rikkad mitokondrite poolest ja tarbivad märkimisväärse koguse süsivesikutest ja lipiididest, kuid ülejäänud kudedes ei toimu metaboolse paindumatuse teket ning toimub edasi süsivesikute tarbimine. See tõstatab samas küsimuse, milleks süsivesikute tase üldse väheneb indutseeritud ekspressiooni korral? Juhul kui lihased lähevad üle eelistatult lipiidide katabolismile, peaks jääma enam kui küllaldaselt süsivesikuid teiste kudede jaoks. Lihaskoe nõrkus võib teoreetiliselt küll häirida *Drosophila* mootorikat ja seeläbi takistada normaalselt toitumiskäitumist, kuid nagu eelpool mainitud, oleks sellisel juhul glükogeeni vähenemine tunduvalt drastilisem lipiidide kadumisest. Alternatiivne seletus võib olla seotud süsteemse signaali fenomeniga, mis vallandub mitokondri häirete korral lihaskoest ja mõjutab signaalimolekulide kaudu teisi kudesi, nagu on täheldatud imetajates FGF21 puhul (Tyynismaa jt., 2010; Hill ja Remmen, 2014). Seega eksisteerib teoreetiline võimalus, et mtDNA stress lihastes võib mõjutada näit. seedekulglat, takistades süsivesikute imendumist ja langetades seeläbi üldist süsivesikute taset.

Minu poole kirjeldatud fenomenil, mille puhul mtDNA stress lihaskoes viib tõenäoliselt metaboolse paindumatuse tekkeni ja kallutas energiavarude tarbimist tugevalt lipiidide suunas, on otsene seos diabeediga. Antud haigus inimeses on tingitud glükoosi ebapiisavast transpordist

vereringest lihasrakkudesse, mille tulemusena ei saa lihaskude enam piisavalt süsivesikuid ja glükoosi kogus vereringes hakkab suurenema. Seetõttu peab rakk suurendama AcCoA produktsiooni lipiidide arvelt, et tagada piisav ATP varu. Seega sarnaneb mtEcoBI poolt indutseeritud fenomen vägagi metaboolsete muutustega, mis toimuvad diabeedi väljaarenemise käigus. Enamgi veel, märkimisväärselt oli metaboolse jääkuse teke seotud just nimelt indutseeritud ekspressiooniga täiskasvanud *Drosophila*s, samas kui varajane ekspressioon vastsestaadiumist alates ei põhjustanud mingit triatsüülglütseriidide vähenemist. Umbes 90% diabeedi juhtumitest moodustab diabeet tüüp II, mis on põhjustatud elu jooksul välja kujunenud insuliini resistentsusest lihaskoes ehk lihasrakud ei ole võimelised internaliseerima glükoosi hoolimata seda protsessi indutseeriva faktori insuliini olemasolust. Seega sarnaneb indutseeritud mtEcoBI poolt põhjustatud fenomen tugevalt just diabeet II-le. On ebaselge, miks varajase mtEcoBI ekspressiooni puhul on *Drosophila* fenotüüp niivõrd erinev: mtDNA-d fragmenteeritakse rohkem, kuid eluiga on pikem ja ei teki metaboolset painedumust. Üheks võimalikuks seletuseks on mitokondriaalne hormees ehk fenomen, mille puhul mõõdukas mitokondriaalne stress programmeerib ümber nii geenide transkriptsiooni kui ka metabolismi ning mille tulemusena paraneb organismi vastupanuvõime stressile (Hill ja Remmen, 2014). Kui vastsestaadiumis algava mtEcoBI ekspressiooni puhul vaigistatakse metaboolset jääkust esile kutsuv signaal täiskasvanu faasis, võib *Drosophila* püsida kauem elus, hoolimata tugevamast mtDNA fragmentatsioonist. Sellisel juhul on lühenenud eluea põhjus teine, mitte lipiidide tagavarade ammendumine, vaid mt genoomi kodeeriva potentsiaali häiretest tingitud üldine oksüdatiivse fosforüleerimise defekt ja ATP sünteesi kollaps. See võib ka seletada süsivesikute vähenemist mhcGAL-mtEcoBI funktsionaalses tüves, mis oleks põhjustatud mitokondri ebapiisava funktsiooni poolt tingitud vajadusest kallutada ATP produktsioon suuremal määral glükolüüsi suunas.

## KOKKUVÕTE

*D.melanogaster*-i geenidest on umbes 50% homoloogsed inimese geenidega ning olemas ka kõikide inimeste kudedele analoogsed organid. Samuti hoitakse energiavarusi *Drosophilas* sarnaselt inimestega triatsüülglütseriidide ja glükogeenina. *Drosophilate* areng on kiire, nad on viljakad ning lühikese aja jooksul on võimalik üles kasvada kümneid põlvkondi, mis võimaldab lühikese ajaperioodi jooksul jälgida geneetilisi muutustes tingitud elutulemuse muutusi. Tänu sellele on võimalik uurida inimeste haigusi kasutades *Drosophila* mudelorganismina, nt. Parkinsoni tõbe, diabeeti, pahaloomuliseid kasvajaid, vananemist jne. Metaboolseks paindlikuseks nimetatakse võimet kasutada kas süsivesikute või triatsüülglütseriidide energiavaruna. Defektid ümberlülitumisega nende kahe allika vahel tihti on seotud diabeeti või rasvumisega, kuigi hetkel ei ole kausaalne seos nende vahel lõpuni selge.

Käesolevas töö eesmärgiks oli uurida transgeense tüüp I nukleaasi poolt indutseeritud mtDNA stressi mõju *D. melanogasteri* lihaskoes energiavarude utiliseerimist. Eelneva uurimistöö käigus meie töögrupp on avastanud uudse seose mtDNA stabiilsuse ja metaboolse paindumatuse tekke vahel. Triatsüülglütseriidide ja süsivesikute mõõtmise käigus selgus, et indutseeritud mtEcoBI ekspressiooni korral toimus triatsüülglütseriidide taseme järsk langus, mis viitab metaboolse paindlikuse kadumisele ja lipiidide katabolismi eelistamisele. Kuna enamlevinud diabeedi vormi tüüp II üks peamisi tunnuseid on insuliini resistentsusest tingitud süsivesikute pärssitud kasutamisele lihaskoes, sarnaneb mtEcoBI poolt tingitud mtDNA stress täiskasvanud kärbses just sellele patoloogiale. Huvitaval kombel ei tekkinud sellist metaboolset paindumatust kui mtEcoBI oli aktiivne juba vastsestaadiumi lihaskoe mitokondrites. Minu tulemused kirjeldavad esmakordselt uutset seost mtDNA stressi ja metaboolse paindumatuse tekke vahel lihaskoes. Tänu sarnasusele diabeet II-le avab see uue, väga potentsiaalse uurimissuuna, mis võib heita valgust siiani selgusetuks jäänud metaboolse paindlikuse ja diabeedi tekkepõhjustele. Samuti kirjeldavad minu tulemused mtDNA nukleoidi kui raku metaboolset seisundit reguleerivat signaalikeskust. Minu edasiste katsete eesmärgiks saab olema kirjeldatud mehhanismil osalevate faktorite välja selgitamine ja nende interaktsioonide kirjeldamine.

## SUMMARY

Changes in metabolic flexibility in muscle tissue of *Drosophila melanogaster* caused by mtDNA stress signal

Diana Bahhir

*Drosophila melanogaster* genes are approximately 50% homologous to human and they have main analogues of human organs. Like in humans, *Drosophila* uses triglycerides and glycogen as main energy sources. *Drosophila* has a short lifespan and high fecundity, which enables easy breeding and phenotype identification. Due to this versatility *Drosophila* has been extensively in biomedical research to study human diseases such as Parkinson's disease, diabetes, cancer as well as mechanism of aging. Number of metabolic diseases in humans have been linked to loss of metabolic flexibility, which is the ability to use either carbohydrates or triglyceride as an energy source. Most prominent of pathologies associated with this phenomenon are diabetes or obesity, However, the causal connection between those disorders and metabolic flexibility is not fully clear at the moment.

In this thesis my main goal was to investigate how transgenic expression of mitochondrially-targeted exogenous Type I DNA nuclease (mtEcoBI) causing mtDNA stress in *D.melanogaster* muscle tissue influenced the utilization of energy sources. It both degrades and translocates its template, meaning that it is capable of cleaving mtDNA and interfering with architecture of mtDNA-protein complex termed nucleoid. During previous work our research group has discovered a new link between mtDNA stability and formation of metabolic flexibility – ubiquitous adult tissue expression of mtEcoBI led to exhaustion of triglyceride reserves without significant effect on carbohydrates. I set out to build on these results, exploring whether mtEcoBI is capable of inducing similar metabolic inflexibility in muscle tissue, which is central to development of diabetes. The levels of main energy storage molecules triglycerides and carbohydrates in whole bodies were measured after induction of mtDNA stress in muscle. In response to induced expression in adults TAG levels decreased significantly, much more so than carbohydrates, demonstrating a pivot towards lipid oxidation in catabolism. Such decreased utilization of carbohydrates by muscle tissue is a sign of metabolic inflexibility. Therefore, our findings demonstrate a novel link between mtDNA stress and diabetes. It is interesting that metabolic inflexibility did not evolve when mtEcoBI was active at the larval stage in muscle tissue

mitochondria of muscle tissue. In that case adult flies did not display such decrease in TAG content, by which we infer that they have become insensitive to this link between mtDNA stress and metabolic inflexibility. This underlines the dynamic nature of mtDNA nucleoid and how it is linked to regulation of general cellular metabolism. Due to the similarity of my findings to the etiology of type II diabetes, it opens up a new, highly prospective research direction, which can explain causes of metabolic flexibility and diabetes development. In my future work I seek to outline the mechanism responsible for these phenomena described in my thesis.

## TÄNUSÕNAD

Sooviksin siiralt tänada enda juhendajat Priit Jõersi tema meisterliku õpetamise, kogemuse jagamise ja suure abivalmiduse eest. Lisaks tahan ka tänada kogu Molekulaarbioloogia ja Biokeemia labori kollektiivi sõbraliku keskkonna eest.

## **KASUTATUD KIRJANDUS**

Sang, J.H. 2001. *Drosophila melanogaster*: The Fruit Fly, p. 155-157. In Eric C. R. Reeve. Encyclopedia of genetics. USA: Fitzroy Dearborn Publishers, I.

Pierce, B.A. 2004. Genetics: A Conceptual Approach 2<sup>nd</sup> ed., p 86-161. New York: W.H. Freeman.

Demerec, M., Kaufmann, B.P. 1972. *Drosophila* Guide: Introduction to the Genetics and Cytology of *Drosophila Melanogaster* Paperback, p. 3-30. Carnegie Institution of Washington.

Ashburner, M., Carson, H. L., Thompson, J. N. 1983. The Genetics and Biology of *Drosophila*, p. Academic Press Inc.

Markow, T.A., Beall, S., Matzkin, L.M. (2009). Egg size, embryonic development time and ovoviviparity in *Drosophila* species. *J. Evol. Bio.* 2: 430-434.

Tyler, M.S. 2000. Developmental Biology, A Guide for Experimental Study, 2<sup>nd</sup> ed., p. 85-101. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, MA.

Letsou, A., Bohmann, D. (2005). Small Flies—Big Discoveries: Nearly a Century of *Drosophila* Genetics and Development. *Dev. Dyn.* 232: 526–528.

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., ... Venter, J.C. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 287(5461): 2185–95.

Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 12596–12601.

Scialo, F., Sriram, A., Stefanatos, R., Sanz, A. (2016). Practical Recommendations for the Use of the GeneSwitch Gal4 System to Knock-Down Genes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS. One.* 11(8): e0161817.

Hales, K.G., Korey, C.A., Larracuenta, A.M., Roberts, D.M. (2015). Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*. 201(3): 815-842.

Ou, H.L. (2013). Gene knockout by inducing P-element transposition in *Drosophila*. *Genet. Mol. Res.* 12(3): 2852-2857.

Kühlbrandt W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC. Biol.* 13: 89.

McInnes, J. (2013). Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutr. Metab.* 10(1): 63.

Hall, A.R., Burke, N., Dongworth, R.K., Hausenloy, D.J. (2014). Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. *Br. J. Pharmacol.* 171(8): 1890–1906.

Navdeep, S.C. (2014). Mitochondria as signaling organelles. *Cell. Metabolism.* 22: 204-206.

Youle, R.J., Blik, A.M. (2016). Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science.* 337(6098): 1062-1065.

Vásquez-Trincado, C., García-Carvajal, I., Pennanen, C., Parra, V., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Lavandero, S. (2016) Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J. Physiol.* 594(3): 509–525.

Chen, X.J., Butow, R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* 6(11): 815-825.

Kang D., Kim S.H., Hamasaki N. (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion.* 7(1-2): 39-44.

Kukat, C., Larsson N. (2013). mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. *Trends. Cell. Biol.* 23(9): 457-463.

Malka, F., Lombès, A., Rojo, M. (2006). Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: Focus on vertebrate nucleoids. *Mol. Cell. Res.* 1763(5-6): 463-472.

Rajala, N., Hensen, F., Wessels, H. J. C. T., Ives, D., Gloerich, J., Spelbrink, J.N. (2015). Whole Cell Formaldehyde Cross-Linking Simplifies Purification of Mitochondrial Nucleoids and Associated Proteins Involved in Mitochondrial Gene Expression. *PLOS ONE* 10(2): e0116726.

Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I. (2014). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays. Biochem.* 47: 10.

Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N. and Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic. Acids. Res.* 31(6): 1640–1645.

Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., Quintanilla, B. (2013). The Mitochondrial Nucleoid: Integrating Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 5: 1-7.

Botella, J.A., Baines, I.A., Williams, D.D., Goberdhan, D.C.I., Proud, C.G., Wilson, C. (2001). The *Drosophila* cell shape regulator c-Jun N-terminal kinase also functions as a stress-activated protein kinase. *Insect. Biochem. Molec.* 31(9): 839-847.

Muoio, D.M., Noland, R.C., Kovalik, J.P., ... Mynatt, R.L. (2012). Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell. Metab.* 15(5): 764-77.

Tataranni, P.A., Harper, I.T., Snitker, S., Del Parigi, A., Vozarova, B., Bunt, J., Bogardus, C., Ravussin, E. (2003). Body weight gain in free-living Pima Indians: effect of energy intake vs expenditure. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27(12): 1578-1583.

Goodpaster, B.H., Sparks, L.M. (2017). Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell. Metab.* 25(5): 1027-1036.

Galgani, J.E., Moro, C., Ravussin, E. (2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295(5): 1009-1017

Arrese, E.L., Soulages, J.L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 207-225.

Reyes-DelaTorre, A., Peña-Rangel, M.T., Riesgo-Escovar, J.R. 2012. Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the Disaccharide Trehalose, p 317-338. *Carbohydrates-comprehensive studies on glycobiology and glycotecchnology*. Wincheste In Tech, Wincheste.

Zhang, Y., Xi, Y. (2014). Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. *J. Tissue. Sci. Eng.* 6: 141.

Barrio, L., Dekanty, A., Milan, M. (2014). MicroRNA-Mediated Regulation of Dp53 in the *Drosophila* Fat Body Contributes to Metabolic Adaptation to Nutrient Deprivation. *Cell. Rep.* 8: 528–541.

Tynismaa, H., Carroll, C.J., Raimundo, N., ... Suomalainen, A. (2010). Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Hum. Mol. Genet.* 19(20): 3948-3958.

Hill, S., Remmen, H.V. (2014). Mitochondrial stress signaling in longevity: A new role for mitochondrial function in aging. *Red. Bio.* 2: 936-944.

## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Diana Bahhir

(sünnikuupäev 26.11.1994),

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

mtDNA stressist tingitud metaboolse paindlikkuse muutused äädikakärbse *Drosophila melanogasteri* lihaskoes,

mille juhendaja on Priit Jõers,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2017