

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

MtDNA stressivastus limiteerib katabolismi süsinikuallikate kasutamist

***Drosophila melanogaster*'is**

Magistritöö

30 EAP

Liina Ots

Juhendaja: dotsent Priit Jõers

Tartu, 2018

MtDNA stressivastus limiteerib katabolismi süsinikuallikate kasutamist

***Drosophila melanogaster*'is**

Mitokondritel on oluline roll organismi funktsiooni reguleerimises. Mitokondriaalsetest defektidest tulenevate haiguste tekke peamiseks põhjuseks on siiani peetud ROS-ide (reaktiivsed hapnikuühendid) produktsiooni tõusu ning ATP sünteesi efektiivsuse langust. Arvatasti ei pruugi aga vead mitokondriaalses DNA-s (mtDNA) põhjustada ainult neid defekte, vaid ka muid metaboolseid muutusi organismis. Käesoleva magistritöö teema baseerub juba ennem meie töörühmas näidatud seose põhjal, kus mitokondriaalne DNA stress viib metaboolsete muutusteni *Drosophila melanogaster* mudelsüsteemis, kuid ei põhjusta ROS-ide üleproduktsiooni. Oluline osa tööst moodustab valgu sarah rolli kirjeldamisel mtDNA stressi kontekstis. Tulemustest selgub, et metaboolne ümberprogrammeerumine on vähemalt osaliselt seotud suhkrute transpordiga lihaskoe rakkudesse ning valk sarah kontrollib rasvhapete utiliseerimise võimekust antud mtDNA stress kontekstis.

Märksõnad: *Drosophila*, mitokondrid, mitokondriaalne stress, metaboolne paindlikkus, süsivesikud, rasvhapped, ATP, glükoosi transport, metformiin, Sirt2, sarah, BCAA

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

MtDNA stress response limits the use of carbon sources of catabolism in

Drosophila melanogaster

Mitochondria plays a crucial role in regulating organisms functions. Metabolic diseases driven from mitochondrial defects are often thought to be caused by the increase in ROS (reactive oxygen species) production and the reduction in synthesis efficiency of ATP. Presumably the errors in mitochondrial DNA (mtDNA) do not produce only those kinds of defects, but can also lead to other metabolic changes in an organism. The topic of this master's thesis is based on the previous finding of our workgroup, where the mitochondrial DNA stress leads to metabolic changes in *Drosophila melanogaster* modelsystem, but does not lead to ROS production. Work is largely based on protein called sarah and to determine its role in regulating mtDNA stress. It was found that metabolic reprogramming is at least in part related to sugar transport into muscle cells and protein called sarah is involved in regulation of fatty acid utilization capability in the context of mtDNA stress.

Keywords: *Drosophila*, mitochondria, mitochondrial stress, metabolic flexibility, carbohydrates, fatty acid, ATP, glucose transporter, metformine, Sirt2, sarah, BCAA

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

SISUKORD

LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Mitokondri struktuur, funktsioonid ja dünaamika.....	8
1.2 mtDNA ja nukleoidid	11
1.3 Mitokondri ja tuumavaheline suhtlus	12
1.4 Metaboolne paindumatus ja sellega seonduvad haigused	14
1.5 Vastuolulisus mitokondriaalsete haiguste tekkepõhjuste vahel	16
1.6 Drosophila mudelsüsteemina.....	17
1.6.1 GAL4-UAS ekspressioonisüsteem Drosophila's	19
1.7 Töögrupi eelnev töö mtDNA stressi indutseerimisel	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1 Töö eesmärgid:	21
2.2 Materjal ja meetodika.....	21
2.2.1 Drosophila'te käitlemine, ristamine ja tüved.....	21
2.2.2 Süsivesikute mõõtmine.....	24
2.2.3 Triatsüülglütseriidide mõõtmine	24
2.2.4 Toitumise aktiivsuse mõõtmine.....	25
2.2.5 ATP mõõtmine	25
2.2.6 Elulemuse katsed	26
2.2.7 SDH mõõtmine.....	26
2.2.8 Western proovide ettevalmistamine ja blotting.....	26
2.2.9 Bradford.....	27
2.2.10 Drosophila mtDNA eraldamine.....	27
2.2.11 Gelelektroforees ja Southern blot	28
2.2.12 Andmete statistiline analüüs	28
2.2.13 Metaboloomika ja RNA sekveneerimine	28

2.3 Tulemused ja arutelu	29
2.3.1 ATP väheneb nii lihaskoe kui ka üldise ekspressiooni korral, kuid ei korreleeru toitumisaktiivsusega.	29
2.3.2 Metformiin pikendab tubGS>mtEcoBI tüvede eluiga, kuid Glut1 üleekspressioon süsivesikute tarbimise ei paranda.	31
2.3.3 Sarah geeni knock-down ei mõjuta mtDNA topoloogiat ega ATP langust, kuid sureb keskmiselt 2 päeva varem.	33
2.3.4 sarah KD blokeerib TAG-de tarbimise mtEcoBI kontekstis.	36
2.3.5 TAG-ide tarbimise inhibitsiooniga kaasneb hargnenud ahelaga aminohapete (BCAA-de) katabolismi defekt.....	38
2.3.6 SIRT3/Sirt2 üleekspressioon ei päästa elulemust.....	40
KOKKUVÕTE	43
SUMMARY	45
TÄNUAVALDUSED.....	47
KASUTATUD KIRJANDUS	48
LISAD	54
Ristamisskeemid.....	54

LÜHENDID

4-AAP – 4-aminoantipüriin

4E-BP – ingl *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein*

AcCoA -atsetüül koensüüm A molekul (ingl *acetyl coenzyme A*)

Akt - seriin/treoniin valgukinaas (ingl *serine/threonine protein kinase*)

AMPK – 5' AMP-aktiveeritud valgukinaas (ingl *5' AMP-activated protein kinase*)

BCAA – hargnenud ahelaga aminohapped (ingl *branch chain amino acids*)

Bcl-2 – B-rakuline lümfoom (ingl *B-cell lymphoma*)

CoA – koensüüm A (ingl *coenzyme A*)

DAP – dihidroksüatsetoon fosfaat (ingl *Dihydroxy Acetone Phosphate*)

DSCR1 – ingl *Down syndrome critical region 1*

DTT – ditiotreitool (ingl *dithiothreitol*)

ECHS1 – enoüül koensüüm A hüdrataas (ingl *Enoyl-CoA hydratase*)

ECL – võimendatud kemoluminestsents (ingl *enhanced chemiluminescence*)

EDTA – etüleendiamiintetraetaanhape (ingl *ethylenediaminetetraacetic acid*)

eIF2 α – eukarüoodi initsiatsioonifaktor 2 α (ingl *eukaryotic initiation factor 2 α*)

ESPA - naatrium N-etüül-N-(3-sulfopropüül) anisidiin (ingl *N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m-anisidine sodium salt*)

G1P – glütserool-1-fosfaat (ingl *glycerol 1 phosphate*)

G6P – glükoos-6-fosfaat (ingl *glucose 6 phosphate*)

G6P DH – glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas (ingl *glucose 6 phosphate dehydrogenase*)

GK – glütserooli kinaas (ingl *glycerol kinase*)

Glut – glükoosi transporter (ingl *glucose transporter*)

GPO – glütserooli fosfaat oksüdaas (ingl *glycerol-3-phosphate oxidase*)

H₂O₂ – vesinikperoksiid (ingl *Hydrogen peroxide*)

HMG-box - ingl *high mobility-group box*

IRS – insuliini retseptori substraat (ingl *insulin receptor substrate*)

ISR – integreeritud stressi vastus (ingl *integrated stress response*)

L1, L2, L3 – vastse staadiumid

MCU – mitokondri kaltsiumi uniporter (ingl *mitochondrial calcium uniporter*)

MP - RU486 ehk mifepristoon (ingl *mifepristone*)

mtDNA – mitokondriaalne DNA (ingl *mitochondrial DNA*)

mTERF5 - mitokondriaalne transkriptsiooni terminatsioonifaktor (ingl *mitochondrial transcription termination factor*)

mtISR – mitokondriaalne integreeritud stressivastus (ingl *mitochondrial integrated stress response*)

mTORC1 ja 2 - ingl *mammalian target of rapamycin complex 1 and 2*

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

mTTF – mitokondriaalne transkriptsiooni terminatsioonifaktor (ingl *mitochondrial transcription termination factor*)

mtUPR – ingl *Mitochondrial unfolded protein response*

NAFLD – mittealkohoolne rasvamaksa haigus (ingl *non-alcoholic fatty liver disease*)

NRF1 ja 2α – tuuma transkriptsioonifaktor 1 ja 2α (ingl *nuclear respiratory factor 1 and 2α*)

OXPHOS – oksüdatiivne fosforüleerimine (ingl *oxidative phosphorylation*)

PGC-1α – ingl *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1*

PI3K – fosfoinositiid-3-kinaas (ingl *Phosphoinositide 3-kinase*)

PKC - proteiin kinaas C (ingl *protein kinase C*)

POD – peroksüdaas (ingl peroxidase)

Pol γ – polümeraas γ (ingl *polymerase γ*)

PTP- ingl *permeability transition pore*

ROS-id – reaktiivse hapniku osakesed (ingl *reactive oxygen species*)

SDH – suktsinaadi dehüdrogenaasid (ingl *succinate dehydrogenase*)

S6K – ribosomaalse valgu S6 kinaas (ingl *ribosomal protein S6 kinase*)

SIRT – sirtuiin (ingl *sirtuin*)

SSC - naatriumkloriid naatriumtsitraat (ingl *saline-sodium citrate*)

TAG – triatsüülglütseriidid (ingl *triacylglyceride*)

TCA – tsitraaditsükkel (ingl *citric acid cycle*)

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

UAS – ingl *Upstream activating sequence*

VDAC – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal (ingl *voltage-dependent anion channel*)

SISSEJUHATUS

Mitokonder on raku organell, millel on keskne roll organismi aine -ja energiavahetuses. Peamiselt peetakse tema ülesandeks ATP tootmist oksüdatiivse fosforüleerimise teel. Lisaks sellele on mitokondril veel palju muid olulisi funktsioone, nagu näiteks osalemine kaltsiumi homoöostaasis ja apoptoosi reguleerimine.

Mitokondriaalsete haiguste tekkepõhjuseks peetakse geenidefekte, mille tõttu tekivad häired mitokondriaalsetes valkudes, mis osalevad hingamisahela komplekside sünteesis ja kokkupanekuks. See omakorda võib põhjustada häireid mitokondri hingamisahela komplekside funktsioonis ning viia ROS-ide üleproduktsooni ning ATP sünteesi languseni (Suomalainen ja Battersby, 2017). Pikka aega on just neid kahte aspekti peetud mitokondriaalsetest defektidest tingitud haiguste põhjuseks, kuid pidevalt kasvab avastatud mitokondri häiretest põhjustatud patoloogiate arv, mille puhul on hingamisahel normaalne ning puuduvad tõendid oksüdatiivsest stressist.

Paljusid metaboolseid haigusi, sh II tüüpi diabeeti, seostatakse nn metaboolse paindlikkuse kadumisega. Sel juhul on organismis sõltuvalt energiavajadustest ja keskkonnatingimustest häiritud kataboolse süsiniku allika valik. Siiani ei ole veel aga päris täpselt selge, mis selliste fenotüübi muutusteni organismis viib, kas on tegemist põhjuse või tagajärjega haiguste väljaarenemisel ning milline on selles mitokondri täpne roll.

Käesolevas magistritöös on uuritud seoseid mitokondriaalse DNA stabiilsuse ja laiema organismi metabolismi vahel. Mudelorganismina kasutatava *Drosophila* mitokondriaalset homöostaasi on *in vivo* häiritud bakteriaalse endonukleasiga, kuid millega ei kaasne mitokondri hingamisahela defekti. Selle tulemusena on toimunud metaboolse paindlikkuse kadu, mis seisneb rasvade eelistamisele suhkrutele. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli välja selgitada põhjuseid, mis võivad viia *Drosophila*'s mitokondriaalse DNA stressist tingitud metabolismi ümberprogrammeerumisele. Antud tulemused ei anna küll täielikku selgitust selle mehhanismi kohta, kuid on siiski heaks alustalaks mõistmaks seda laiaulatuslikku teemat.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mitokondri struktuur, funktsioonid ja dünaamika.

Mitokondr on eukarüootse raku kaksikmembraanne organell, millel on keskne roll organismi aine- ja energiavahetuses ning mille enim tuntud ülesandeks on ATP tootmine oksüdatiivse fosforüleerimise (OXPHOS) teel. Arvatakse, et mitokondr pärineb eukarüootse eellasega endosümbiontses suhtes olnud α -proteobakteri eellasest (Thrash *et al.*, 2011). Seda, et mitokondr oli kunagi iseseisev elusorganism, toetab ka fakt, et ainukese organellina loomses rakus sisaldab mitokondr tuuma genoomist eraldiseisvat DNA-d (mtDNA). Mitokondreid ümbritseb peamiselt fosfolipiididest ja valkudest koosnev kaksikmembraan. Välismembraanis paiknevad poorid ja transporterid on enamasti läbitavavad ioonidele ning väiksematele valkudele. Sisemembraani läbilaskvus on aga oluliselt tugevamini reguleeritud. Sisemembraan on omapärase, voldilise struktuuriga, moodustades kristadeks nimetatavaid sissesopistusi. Sellise nähtuse eesmärk on suurendada OXPHOS-i jaoks vajalikku sisemembraani pindala ning koos sellega hingamisahela komplekside arvu, suurendades seega ATP sünteesi potentsiaali (McBride *et al.*, 2006; Renard *et al.*, 2012).

Universaalse energikandja ATP sünteesiks vajalik energia saadakse peamiselt kahe meie toidus leiduva molekuliderühma, süsivesikute ja rasvhapete oksüdeerimisest. Rasvhapete ning suhkrute katabolismi käigus tekib mitokondris atsetüülkoensüüm A (AcCoA) molekul. Glükolüüsil tekkiv püruvaat oksüdeeritakse AcCoA-ks mitokondri maatriksis asuva püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi abil. Rasvhapete β -oksüdatsioon toimub samuti mitokondri maatriksis, kuid sellele eelneb nende aktiveerimine koensüüm A-ga (CoA) ning transportimine mitokondri maatriksisse. Selle jaoks vajalikud ensüümkompleksid asuvad mitokondri välis- ja sisemembraanis. Rasvhapped aktiveeritakse mitokondri välismembraanis asuva atsetüülkoensüüm A süntetaasiga. Rasvhappe ning CoA molekuli vahele moodustatakse tioesterside, tekib atsetüülkoensüüm A, mis on võimeline läbi teiste valgulistest komplekside sisenema mitokondri maatriksisse, kus toimub β -oksüdatsiooni ning mille kaudu tekib AcCoA (Tymoczko *et al.*, 2011).

AcCoA on koos oksaalatsetaadiga substraadiks tsitraadi süntaasile, mille poolt katalüüsitud tsitraadi sünteesireaktsiooni loetakse tsitraaditsükli (TCA) esimeseks reaktsiooniks. TCA käigus kantakse nelja redoksreaktsiooni tulemusena elektronid kolmele nikotiinamiid adeniin dinukleotiidile (NAD⁺) ning ühele flaviin adeniin dinukleotiididele (FAD) molekulile. Need molekulid on oma redutseeritud kujul elektronide kandjateks, loovutades need hingamisahela

kompleksidele oksüdatiivse fosforüleerimise protsessis (OXPHOS). Redutseeritud vormid NADH ja FADH₂ oksüdeeritakse vastavalt hingamisahela I ja II kompleksile, milleks on NADH ja suksinaadi dehüdrogenaas (SDH). Oksüdeerumise käigus vabanenud elektronid liiguvad elektronkandjate ubikinooni ning tsütokroom C abiga edasi III ning IV kompleksile, kus viimane kannab need nelja kaupa molekulaarsele hapnikule, mille tulemusena tekib H₂O. Elektronide transportimisel läbi I, III ja IV komplekside vabanev energia rakendatakse prootonite pumpamiseks membraanidevahelisse ruumi. Sellega tekitatakse üle sisemembraani prootongradient, mida hingamisahela V kompleks, ATP süntaas kasutab ADP fosforüleerimiseks, et toota ATP-d. Iga CO₂-ks ja H₂O-ks lõpuni oksüdeerunud AcCoA molekuli kohta moodustub 10 ATP molekuli, millest 1 tekib TCA käigus (Tymoczko *et al.*, 2011).

Kui elektronide voog toitainete oksüdeerimise käigus ületab OXPHOS-i võimekuse neid hapnikule kanda, võivad elektronid kalduda kõrvale oma ettenähtud „rajast“ piki hingamisahelat. Alternatiivselt võib sama nähtus toimuda ka tänu defektidele hingamisahela komplekside struktuurides. Olenemata põhjusest toimub sellisel juhul enamasti elektronide n-ö „enneaegne“, ensümaatilist mittekontrollitud liitumine hapniku kui kõrgeima redokspotentsiaaliga elektronide aktseptoriga. See aga viib superoksiidi ($\cdot\text{O}_2^-$) formeerumisele, mida koos vesinikperoksiidi (H₂O₂) ning selle osalisel redutseerumisel tekkiva hüdroksüülradikaaliga ($\cdot\text{OH}$) nimetatakse vabadeks hapniku radikaalideks (ROS) (Tymoczko *et al.*, 2011). Laenguta H₂O₂ suudab edukalt läbi plasmamembraanide difundeeruda ning seega põhjustada kahjustusi ka väljaspool mitokondrit, seda eriti redutseerumisel hüdroksüülradikaaliks. Enamasti toimub selline elektronide „lekkimine“ peamiselt I ja III kompleksi kaudu (Tymoczko *et al.*, 2011), kuid võib toimuda ka läbi II kompleksi (Quinlan *et al.*, 2012). Kui ROS-ide produktsioon ületab raku antioksidatiivsete mehhanismide võimekuse, viib see organismis oksüdatiivse stressi tekkimiseni. ROS-id kui väga reaktiivsed ühendid on võimelised reageerima kõigi peamiste biokeemiliste molekulide rühmadega ja põhjustama seeläbi nende pöördumatuid modifikatsioone. Näitena võib tuua nukleiinhapete ahelate katked, mutatsioone põhjustavaid lämmastikaluste modifikatsioonid, membraanlipiidide peroksüdatsiooni jne (Apel ja Hirt, 2004). ROS-idest tingitud DNA mutatsioonide teket seostatakse enneaegse vananemise ja paljude muude mitokondriaalset komponenti omavate haiguste, nagu näiteks diabeedi, neurodegeneratiivsete- ja aju-veresoonkonnahaigustega (Brieger *et al.*, 2012). Teatud hulgal on ROS-ide tekkimine organismis normaalne ja isegi vajalik, kuna on näidatud nende osalemist erinevates signaaliülekande radades (Suzukawa *et al.*, 2000) ning ka rakkude diferentseerumisel (Zhou *et al.*, 2016). Siiski võib liigne ekso- või endogeensete antioksidantide aktiivsus viia organismi seisukohalt hoopis negatiivsetele tagajärgedele.

Mitokonder omab tähtsust ka kaltsiumi reservuaarina. Seda funktsiooni jagab ta rakus endoplasmaatilisele retiikulumiga (Mammucari *et al.*, 2015). Kaltsium on oluline organismi homoöostaasi säilitamisel, osaledes paljudes biokeemilistes protsessides, nagu näiteks ensüümreaktsioonides, signalisatsiooni radadel (Rizzuto *et al.*, 2012) ja lihaskontraktsioonide tekitamises (Rudolf *et al.*, 2004). Kaltsiumi jõudmist mitokondrisse reguleerib läbi välismembraani põhiliselt pingest sõltuv anioonselektiivne kanal (VDAC) ning läbi sisemembraani transpordib seda põhiliselt mitokondri kaltsiumi uniporter (MCU) (Gincel *et al.*, 2001; Baughman *et al.*, 2011). VDAC reguleerib lisaks kaltsiumile ka teiste metaboliitide ja ATP sisse-väljavoolu mitokondrisse (Hodge ja Colombini, 1997). Kaltsiumi akumulereerumist mõjutab ka membraanipotentsiaal, mida mitokondris prootonigradiendiga tekitatakse (Rizzuto *et al.*, 2012). Mitokondris on kaltsium näiteks koaktivaatoriks püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi defosforüleerimisel (Pan *et al.*, 2013) ning TCA tomimiseks vajalike α -ketoglutaradi ja isotsitraadi dehüdrogenaasi ensüümidele (Rizzuto *et al.*, 2012). Liigne Ca^{2+} ionide akumulereerumine mitokondrisse võib aga eelpool nimetatud ensüümide aktiivsuse suurendamise kaudu tõsta koormust TCA-le ning seega ka OXPHOS-ile, mis võib suurendada ROS-ide produktsiooni (Santulli *et al.*, 2015) ning läbi konformatsiooniliste muutuste põhjustada ka PTP (ingl *mitochondrial permeability transition pore*) valgukompleksi avanemist, mis langetab mitokondri membraanipotentsiaali. See on ka üheks raku apoptoosi vallandavaks teguriks, mis on olulisel kohal organismi arengus ning vastuseks stressisignaalidele (Huang *et al.*, 2000). Mitokonder osaleb selles protsessis reguleerides peamiselt vastavate Bcl-2 perekonda kuuluvate valkude sünteesi, mis põhjustavad mitokondris tsütokroom C vabastamist ning sellega kaasnevat välismembraani permeabilisatsiooni. Protsessi tulemusena aktiveeritakse rakus proteaasid, mis hakkavad valke lõhustuma ning sellega on rakk võtnud suuna apoptoosini (Jiang *et al.*, 2014). Seega mõjutavad kaltsiumi konsentratsiooni kõikumised otseselt mitokondri funktsiooni ning seeläbi laiemalt rakulist metabolismi.

Lisaks eelpool kirjeldatule on mitokondritel veel palju teisi funktsioone. Mitokondrid on kohaks, kus ristuvad erinevate aminohapete metabolismirajad (Guda *et al.*, 2007), toimub uurea tsükkel (Tymoczko *et al.*, 2011), sünteesitakse steroidhormoone (Miller, 2013), heemi (Atamna, 2004), toodetakse soojust termogeneesi protsessis (Tymoczko *et al.*, 2011) ja reguleeritakse immuunvastust (Weinberg *et al.*, 2015). Seega on mitokondrid paljude metabolismi signalisatsiooniradade ristumiskohaks ning pidevalt kasvab meie arusaamine nende tähelepanuväärsete organellide osalusest mitmetes erinevates raku funktsioonides. Üheks näiteks, kuidas meie arusaamine mitokondrist on viimase paarikümne aasta jooksul muutunud on nende organellide dünaamika. Erinevalt varasemast ettekujututusest mitokondritest kui

staatilistest, oakujulistest struktuuridest, teame me nüüd, et mitokondrid on dünaamilised organellid, mis rakus mööda tsütoskeletti ringi liikudes teevad vastavalt keskkonnatingimustele ning raku energiavajadusele läbi pidevaid liitumis- ja lahknemisprotsesse (Jheng *et al.*, 2012). Liitumise protsess võimaldab heteroplasmia korral komplementeerida kahjustunud mtDNA-d, kuna täielikult ühinenud mitokondrites on võimalik metaboliite, ensüüme ja geneetilist materjali saada nõ „tervelt“ mitokondriaalselt võrgustiku osalt ning seeläbi parandada terve mitokondriaalse retiikulumi respiratiivset võimekust (Ono *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2015). Heteroplasmiaks nimetatakse olukorda, kus ühel või teisel põhjusel erineva järjestusega mtDNA molekulid eksisteerivad rakus paralleelselt (Gilkerson *et al.*, 2013). Mitokondrite jagunemine on vajalik rakkude jagunemisel nende jaotamiseks tütarrakkude vahel, kahjustunud mitokondriaalse võrgustiku osade degradeerimisel rakus ning raku apoptoosi suunamisel (Westermann, 2010). Kuigi hetkeseisuga on põhjus-tagajärg seos ebaselge, on seostatud häireid mitokondri dünaamikas mitmete metaboolsete ja neurodegeneratiivsete haigustega, nagu Alzheimeri ja Parkinsoni tõbi (Jheng *et al.*, 2012; Chen ja Chan, 2009).

1.2 mtDNA ja nukleoidid

Imetajate mtDNA koosneb umbes 16000 aluspaarist, mis kodeerib 13 valku, kahte tRNA-d ja 22 rRNA-d. Teistest loomarühmadest pärit laboratoorsete mudelorganismide (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) mitokondriaalne genoom on suuruselt sarnane ja kodeerimispotentsiaalilt peaaegu identne imetajate omaga. Kodeeritavad valgud on hingamisahela komplekside subühikud, RNA-sid aga on vaja mitokondri enda translatsiooni aparati toimimiseks (Gilkerson *et al.*, 2013), kuna mitokondris kodeeritud valgud ka transleeritaks organellis paiknevate ribosoomide (mitoribosoomide) abil (Sharma *et al.*, 2003).

mtDNA molekulid eksisteerivad *in vivo* DNA-valk kompleksides, mida nimetatakse mitokondriaalseteks nukleoidideks. Sellel struktuuril on piiratud analoogia tuuma DNA-ga, mis eksisteerib samuti tihedas kontaktis mitmete normaalset struktuuri ja funktsiooni tagavate valkudega (Kucej ja Butow 2007). Ühes nukleoidses kompleksis esineb tavaliselt rohkem kui üks mtDNA koopia, millede arv võib tugevalt varieeruda, nagu ka üldine mtDNA koopiaarv rakus sõltuvalt raku- ja koetüübist (Iborra *et al.*, 2004). Imetajatel on see kõrgem näiteks lihaskoes, südamerakkudes, maksas ja ajus, mis on kooskõlas ka vastavate kudede suurema energiaajalise vajadusega organismi normaalseks toimimiseks (D'Erchia *et al.*, 2015).

Kuna mitokondris toimub pidevalt mtDNA poolt kodeeritud valkude aktiivne süntees, on nukleoidi koosseisus olevad valgud analoogselt tuuma valkudega olulise tähtsusega mtDNA säilitamisel, replikatsioonil ja transkriptsioonil. Üheks paremini uuritud valguks nukleoidide koosseisu kontekstis võiks pidada mitokondri transkriptsiooni faktorit A (TFAM). Seda multifunktsionaalset valku peetakse peaaegu ainukeseks universaalselt esinevaks nukleoidi komponendiks muidu üsna varieeruva valgulise koostisega struktuuris. Lisaks osalemisele transkriptsioonil on sellel ka oluline roll mtDNA pakkumisel (Alam *et al.*, 2003). TFAM-i struktuuris esinevat kahte HMG-box-i (ingl *high mobility-group box*) sisaldavat domeeni peetakse peamiseks põhjuseks tänu millele toimub mtDNA nukleoidi pakkumine (Ngo *et al.*, 2011). Lisaks kontrollib TFAM mtDNA koopiarvu ning reguleerib replikatsiooni (Pohjoismäki *et al.*, 2006). Mehhanism, mille kaudu TFAM seda teeb, ei ole hetkel lõpuni selge, kuid seondumine mtDNA-ga paistab olevat eeltingimuseks. Nukleoidide koostises on kirjeldatud ka selliseid replikatsiooni tagavaid valke nagu mitokondriaalne üksikahelalise DNA-ga seostuv valk mtSSB, mtDNA replikatiivne helikaas Twinkle ja mitokondris olev ainus teadaolev DNA polümeraas Pol γ (Tyynismaa *et al.*, 2004; Bogenhagen *et al.*, 2008). Bogenhagen *et al.* on välja pakkunud mudeli mille kohaselt esinevad nukleoidis otseselt mtDNA-ga seotud nn tuumikvalgud, nagu eelpool nimetatud replikatsiooni ja transkriptsiooni läbi viivad valgud ning perifeersed valgud, mis ise ei ole mtDNA-ga otseses kontaktis. Kuid kuna nukleoidi struktuur on arvatavasti küllaltki varieeruv, siis selline hüpoteetiline mudel ei pruugi anda tegelikku pilti nukleoidsest struktuurist. Pigem räägitakse nendest perifeersetest valkudest kui valk-valk interaktsioonide kaudu nukleoidiega assotseerunud valkudest (mtNAP - *mitochondrial nucleoid associated proteins*). Erineva koostisega nukleoidid osalevad ilmselt erinevates mtDNA-ga seotud protsessides, kus osadel valkudel on defineeritud roll mtDNA replitseerumisel (Lewis *et al.*, 2016). Seega on mitokondrite nukleoidne struktuur äärmiselt dünaamiline ja oleks arvatavasti ekslik püüda defineerida universaalselt mudelit nende valgulise koosseisu kohta.

1.3 Mitokondri ja tuumavaheline suhtlus

Raku normaalse homöostaasi säilitamiseks on oluline mitokondri ja tuuma vaheline pidev kommunikatsioon. Mitokondri funktsioon on tugevalt tuuma genoomi kontrolli all, kuna enamus mitokondriaalsest proteoomist kodeeritakse tuuma poolt ja imporditakse mitokondrisse. Sellist tuuma ja mitokondri vahelist suhtlusviisi, kus tuum signaliseerib mitokondri funktsioneerimist nimetatakse anterograardseks rajaks (Quiros *et al.*, 2016).

Tuumas kodeeritavad mitokondriaalsed valgud on enamasti kontrollitud transkriptsioonifaktorite NRF1 ja NRF2 α (tuuma transkriptsiooni faktor 1 ja 2 α) kaudu. Need kontrollivad näiteks OXPHOS raja valgukompleksi subühikute transkriptsiooni tuumas ning mtDNA replikatsioonil, transkriptsioonil ja translatsioonil osalevate valkude sünteesi, moduleerides niiviisi mitokondri funktsiooni (Gleyzer *et al.*, 2005). Neid omakorda reguleerib mitokondri biogeneesi kontrolliv keskne faktor PGC-1 α , millel on oluline ja mitmetähenduslik roll metabolismi reguleerimises (Fernandez-Marcos ja Auwerk, 2011), kuna suur enamus mitokondri valkudest on kodeeritud tuumas, pole üllatav, et märkimisväärne osa mitokondriaalsete haiguste põhjustajad on mutatsioonid tuuma genoomis (Taylor *et al.*, 2014). Kuid ka mitokondrid on võimeline mõjutama tuumas toimuvaid protsesse ning sellist kommunikatsioonivormi, mille käigus mitokondrid mõjutab metaboolset ümberreguleerimist või stressivastuseid nimetatakse retrograadseteks signaalideks (Quiros *et al.*, 2016). Põhiliselt väljendub see vastusena toitainete stressile, Ca²⁺ homöostaasi muutustele või ROS-ide produktsioonile, aktiveerides erinevaid valke, mis indutseerivad mitokondri biogeneesi või spetsiifilise funktsiooniga valkude ekspressiooni (Quiros *et al.*, 2016). Enim tuntumateks regulatiivseteks valkkompleksiteks, mille kaudu toimub mitokondriaalses stressivastuses signalisatsioon, on mTOR (ingl *mammalian target of rapamycin*) kinaasi valguline kompleks ning AMPK (ingl *5' AMP-activated protein kinase*) (Inoki *et al.*, 2011).

Mitokondriaalne stress võib aktiveerida ka tervet rakku hõlmava, n-ö integreeritud stressivastuse (ISR) (ingl *integrated stress response*), et säilitada rakulist homöostaasi. Selle peamiseks tunnuseks on eukarüooti initsiatsioonifaktor 2 α (eIF2 α) subühiku fosforüleerumine, mis vähendab tsütosoolis toimuvat valkude sünteesi (Taniuchi *et al.*, 2016). Sellise mehhanismi võib käivitada näiteks aminohapete nälg (Sikalidis *et al.*, 2011), oksüdatiivne stress (Taniuchi *et al.*, 2016) või mtUPR (ingl *mitochondrial unfolded protein response*). Viimane on mehhanism, mis käivitub, kui mitokondri maatriksisse koguneb teatud hulk õigesti voltumata valke, mille korral aktiveeritakse erinevaid tšaperonid ja proteaase, mis osalevad kahjustunud valkude eemaldamisel mitokondris (Baker *et al.*, 2012). See võib näiteks juhtuda, kui mutatsioonid mtDNA-s põhjustavad OXPHOS raja subühikute assambleerumise defekte, mille tulemusena tuumas kodeeritud ja sealt mitokondrisse imporditud valgud ei saa seonduda mõne valgukompleksi koosseisuga, kuhu ta kuuluma peaks. Samuti võib selline mehhanism vallanduda ka vigadest mitokondriaalsete valkude kvaliteedi kontrollil (Suomalainen ja Battersby, 2018).

Mitokondri homöostaasi regulatsioonis on tsentraalse tähtsusega mTOR valguline kompleks. mTOR on seriin/treoniin valgukinaas, mis koosneb kahest kompleksist – mTORC1 ja mTORC2. mTORC1 peamiseks ülesandeks on raku kasvu reguleerimine läbi translatsiooni, transkriptsiooni ja ribosoomide biogeneesi reguleerimise. mTORC1 aktiivsust kontrollib näiteks rapamütsiin (inhibeerib) ning insuliin (aktiveerib). mTORC1 reguleerib raku kasvu peamiselt läbi valkude 4E-BP1 (eukarüoodi initsiatsiooni faktor E) ja kinaasi S6K fosforüleerimise. Toitainete ja aminohapete nälja korral on mTORC1 inhibeeritud, mis põhjustab S6K fosforülatsiooni langust (Acosta-Jaguez *et al.*, 2009). Aktiveeritakse see aga näiteks hingamisahela defektide korral, mis omakorda indutseerib mtISR-i (Khan *et al.*, 2017). Seega ei pruugi mitokondriaalsed stressitingimused otseselt hõlmata mitte ainult mitokondri biogeneesis ja energia metabolismi suunavate valkude sünteesi, vaid ka globaalselt kogu raku valkude sünteesi ning homöostaasi. Selline raku tasandil metabolismi muutus võib pikemas perspektiivis viia kogu organismi funktsioneerimise muutusteni.

1.4 Metaboolne paindumatus ja sellega seonduvad haigused

Organismi võimet kasutada katabolismi süsinikuallikana kas rasvhappeid või suhkruid vastavalt keskkonna tingimustele ning vajadustele nimetatakse metaboolseks paindlikuseks. Muutusi organismis, mille korral kasutatakse ATP tootmiseks eelistatult ühte energiaallikat seostatakse metaboolse paindumatuse tekkega ning seda omakorda paljude nn elustiili metaboolsete haiguste väljaarenemisega nagu südame-veresoonkonna haigused, mittealkohoolne rasvamaksa haigus (NAFLD), rasvumine ning insuliini resistentsus (Goodpaster ja Sparks 2017; Tilg *et al.*, 2017). See kas haigused ise põhjustavad metaboolset paindumatust või on metaboolse paindumatuse teke nende haiguste põhjustajaks, ei ole hetkel veel lõplikult selge. Metaboolne paindumatus on lai termin, mille mehhanismid võivad esineda mitmel erineval tasandil: erinevate süsinikuallikate internaliseerimisest kuni, defektideni nende ensümaatilise katabolismi erinevatel etappidel ning organismi kui ka raku tasandil. Tänu assotsiatsioonile diabeediga on nende protsesside hulgast erilist tähelepanu pälvinud glükoosi liikumine läbi plasmamembraani rakku ja seda eriti lihaskoes. Glükoosi suunamine rakku toimub vastavate GLUT perekonda kuuluvate transporterite abil, mille ekspressiooni tase sõltub raku -ning koetüübist. Inimesel on neid 14, millest enim uuritumad on Glut1-4. Glut 1-3 on insuliin sõltumatud, samas kui lihaskoes rohkelt esinev Glut4 funktsioon on kontrollitud insuliini poolt (Mueckler ja Thorens, 2013). Insuliin on selgroogsete pankrease β -rakkude toodetav peptiidne hormoon, mis kontrollib vere glükoosi sisaldust. Insuliini seondumisel oma

plasmamembraanis olevale retseptorile autofosforüleeritakse sellel türosiini järjestused, millega omakorda fosforüleeritakse insuliini retseptori substraat (IRS). Sellega aktiveeritakse PI3K (fosfoinositiid-3-kinaas) ja Akt (seriin/treoniin valgukinaas) mis viib lõpuks muidu vesiikulitena intratsellulaarses ruumis olevaid Glut4 transportvalke translokeerumisele plasmamembraani, et nende kaudu saaks toimuda glükoosi transport rakku (Bevan, 2001). Insuliiniraja valkude fosforülatsioon toimub G-valkude kaasabil, mida reguleeritakse α -subühiku küljes oleva GTP vahendusel (Sano *et al.*, 2003). Glut1 on uniporter valk, mis transpordib glükoosi rakku passiivse difusiooni teel (Mueckler ja Thorens, 2013). Enamus insuliin-stimuleeritud glükoosi transporti rakku toimub lihas ja rasvkoes ning kuna Glut4 ekspresseeritakse suures osas just kõrge energiavajadusega lihaskoes, on insuliini signaliseerimine selles koes erilise tähtsusega. Insuliini sensitiivsuse langus oma retseptori suhtes peetakse insuliini resistentsuse peamiseks põhjustajaks, mille tõttu ei saa toimuda efektiivne glükoosi transport rakku. See viib suurenenud veresuhkru sisalduseni, mis on II tüüpi diabeedi väljaarenemise peamine aspekt (Carvalho *et al.*, 2005).

Normaalselt funktsioneerivas organismis toimub toitumise ajal ja vahetult pärast seda rasvhapete oksüdatsioonilt eelistatult glükoosi oksüdatsioonile üleminek. Diabeedi ja kõrge rasvasisaldusega toitumise puhul on selline ümberlülitumine piiratud ja rasvhapete β -oksüdatsioon jääb kõrgeks (Goodpaster ja Sparks, 2017). Suurem koormus β -oksüdatsioonile viib aga mittetäielikule rasvhapete oksüdatsioonile, mille tõttu kuhjuvad rakus antud protsessi vaheühendid nagu diatsüülgütserool ja keramiidid (Koves *et al.*, 2008). On näidatud, et just need β -oksüdatsioonist tulenevad vaheühendid häirivad insuliini normaalset signalisatsiooni ja on seotud insuliini resistentsusest tingitud patoloogiate väljakujunemisega (Haus *et al.*, 2009; Szendroedi *et al.*, 2014). β -oksüdatsiooni vaheühenditel on näidatud roll erinevat tüüpi PKC (proteiin kinaas C) aktiveerimisel, mis fosforüleerivad IRS-i, mille tõttu on häiritud insuliinist sõltuva glükoosi suunamine rakku (Powell *et al.*, 2004; Szendroedi *et al.*, 2014). Lisaks lihaskoele võib insuliini resistentsus ka maksas tekkida, kuna sellel organil on keskne roll suhkrute ja rasvade ainevahetuses. Maksa insuliini resistentsust defineeritakse suurenenud glükoneogeneesi ja vähenenud glükogeeni sünteesiga (Krssak *et al.*, 2004). Sellest tulenevalt suuremat rasvade akumulatsiooni maksas seostatakse insuliiniresistentsuse tekkimisega läbi insuliini retseptori aktiivsuse vähenemise. See võib aga häirida glükogeeni sünteesi maksas (Samuel *et al.*, 2004). Maksa insuliini resistentsust seostatakse tugevalt mittealkohoolse rasvamaksa haiguse (NAFLD) tekkega ning suurenenud riskiga haigestuda II tüüpi diabeeti (Lallukka ja Yki-Järvinen, 2016).

Üheks oluliseks metabolismi reguleerivaks teguriks on selles osalevate ensüümide posttranslatsioonilised modifikatsioonid. Mehhanisme, mille kaudu need toimuvad on mitmeid, kuid üha rohkem koguneb andmeid lüsiinijääkide atsetülatsiooni kohta, mis on kesksel kohal metaboolsel regulatsioonil (Park *et al.*, 2013). Oma olemuselt on see sarnane enam tuntud fosforülatsiooniga - modifitseeritakse teatud kindlas positsioonis olevaid aminohappeid, mis seeläbi mõjutavad valkude stabiilsust ja/või ensümaatilist aktiivsust. Nagu ka fosforülatsiooni puhul, on atsetülatsioon kontrollitud kahe vastandliku protsessi, sünteesi ja elimineerimise poolt. Kui atsetülaase on võrdlemisi vähe uuritud, siis deatsetülaasid, eriti mittehistonsetelt valkudelt atsetüülühmi eemaldavad sirtuiinid on olnud suure tähelepanu all tänu nende rollile vananemisel ja sellega seotud metaboolsel regulatsioonil (Houtkooper *et al.*, 2012). Imetaja rakkudes olevatest sirtuiinidest esinevad mitokondris SIRT3, SIRT4 ja SIRT5, neist SIRT3-l on mitokondris peasjalikult roll just valkude deatsetüleerimisel (Lombard *et al.*, 2007). Püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi aktiivsusel osalev SIRT3 deatsetülaas aktiveerib selle toitainete külluses, lubades seega glükoosi oksüdatsiooni suurenemist. Toitainete puudusel PDH jällegi inaktiveeritakse SIRT3 ekspressiooni vähenemisega ja seega toimub ümberlülitumine glükoosi oksüdatsioonilt rasvhapete oksüdatsioonile (Jing *et al.*, 2013). Lisaks kontrollib SIRT3 ka rasvhapete metabolsimil osaleva ensüümi enoüül-CoA hüdrataas 1 (ECHS1) aktiivsust (Zhang *et al.*, 2017). Nagu siit järeldada võib, reguleerib SIRT3 suuresti rasvhapete ja glükoosi oksüdatsiooni, seega võivad defektid selle ensüümi töös mõjutada organismi metaboolset paindlikust. Lisaks deatsetülatsioonile tegelevad osad sirtuiinid ka teiste atsüülühmade (näiteks suksinüülühmade, malonüülühmade jne.) (Park *et al.*, 2013) eemaldamisega valkudelt. Nende poolt mõjutatavad protsesside arv on väga suur nagu ka seeläbi nende roll raku metaboolsel regulatsioonil, mistõttu ei ole selle töö kirjandusliku osa eesmärk anda ülevaade sellest teemast.

1.5 Vastuolulisus mitokondriaalsete haiguste tekkepõhjuste vahel

Häireid mtDNA homöostaasi säilitamisel, selle koopiaarvu või topoloogia muutustes ning nukleoidse kompleksi struktuuris on klassikaliselt peetud ROS-ide üleproduktiooni ning ATP sünteesi languse allikaks. Need defektid on sellisel juhul tingitud häiretest mitokondriaalsete valkude sünteesil ja/või aminohappelises järjestuses ning põhjustavad hingamisahela düsfunktsiooni. See põhjustab omakorda erinevaid patoloogiaid, mida klassikaliselt nimetatakse mitokondriaalseteks haigusteks. Kuid ainuüksi selline mehhanism on ebapiisav seletamaks kogu mitokondriaalsete haiguste laiaulatuslikku varieeruvust ja mustrit (Suomalainen ja Battersby, 2018). Nimelt on kirjeldatud mtDNA mutatsioonidest põhjustatud

patoloogiaid, millede puhul on elektronide transpordiahel intaktne ning ka ROS-de produktsioon pole tõusnud (Rodenburg, 2011). Samas on nende haigusseisundite korral normaalne metabolism tugevalt häiritud. Analoogete andmeid on saadud ka imetajate mudelsüsteemides, mis mimikeerivad mtDNA haigusseisundeid. Näiteks, mtDNA polümeraas γ katalüütilise subühiku defektiga hiirtel mtDNA replikatsioonil nn vigade parandust ei toimu ning selle tulemusena kuhjuvad mutatsioonid. Sellistel hiirtel tekkis mtDNA replitseerumisel umbes 5 korda rohkem vigu kui metsiktüüpi hiirtel ning vanuse kasvades suurenes ka vigade arv. Nende konkreetne fenotüüp väljendus eluea lühenemises, kuid puudus oksüdatiivne stress ning liigne ROS-ide produktsioon (Trifunovic *et al.*, 2005). Twinkle-defektsel hiirel arenes lihaskoes aastaga välja defektid hingamisahelas, kuid ei mõjutanud negatiivselt nende elulemust ning pole ka selge, kas ROS-de tase neis on tõusnud (Tyynismaa *et al.*, 2005). Sellest tulenevalt on välja pakutud, et kuna mitokondril on teadaolevalt palju rohkem funktsioone kui OXPHOS, võivad häired mtDNA topoloogias ja järjestuses põhjustada metabolismi muutusi, mis ei ole otseselt seotud ATP vähenemise või ROS-ide üleproduktsiooniga. Selle hüpoteesi kohaselt mõjutab mtDNA stabiilsus oluliselt laiemalt organismi metaboolset spektrit kui lihtsalt läbi defektse hingamisahela (Suomalainen ja Battersby, 2018).

1.6 *Drosophila* mudelsüsteemina

Drosophila melanogaster on molekulaarbioloogias ja geneetikas laialdaselt kasutatav mitmekülgne mudelorganism. Selle organismil on võrreldes teiste mudelorganismidega mitmeid eeliseid: tal on suhteliselt lühike arengutsüklil ning suur järglaste arv. *Drosophila*'te ülalpidamine on võrdlemisi odav ning oma keskkonna suhtes on nad vähenõudlikud. Lisaks, pea sajandi jooksul, mil *Drosophila*'t on mudelorganismina kasutatud, on tema uurimiseks välja töötatud väga suur hulk erinevaid geneetilisi tööriistu ja markereid. On leitud, et *Drosophila* genoom on 60% ulatuses homoloogne inimese omaga ning 75%-l geenidest, mis inimesel on seotud mingi haigusega, on ka *Drosophila*'s homoloog (Prokop, 2013)..

Drosophila areng munast valmikuni võtab optimaalsetes tingimustes (25°C, küllaldaselt toitaineid ja vett) aega 9-10 päeva. Embrüogenees kestab nende tingimuste juures 24h, millele järgneb kolm vastse staadiumit (L1, L2 ja L3), millest kaks esimest kestab ühe ning kolmas kaks päeva. Kui kahe esimese vastse staadiumi jooksul liiguvad vastsed söötmes ringi, siis L3 staadiumi vastsed ronivad söötimest välja ning alustavad nukkumist, mille käigus moodustub kitiinkest ning hakkab toimuma metamorfoos. Nukustaadium kestab 4-5 päeva, kus metamorfoosi käigus lõhutakse vastse koed ning hakkavad moodustuma täiskasvanud isendi

kehaosad nagu silmad, tiivad ja jalad. Peale nukkust koorumist saavutavad emased 25°C juures suguküpsuse umbes 6-8 tunniga. Korra viljastunud emased on munemisvõimelised ka nädalaid hiljem, ilma et peaksid isastega kokku puutuma, kuna suudavad oma kehas säilitada isaste spermat. Munemisaktiivsust suudavad emased *Drosophila*'d reguleerida vastavalt toidu olemasolule (Ashburner *et al.*, 2005; Prokop, 2013).

Drosophila suudab elada ka temperatuuri optimumist (25°C) madalamatel temperatuuridel, kuid sellisel juhul on nende areng aeglasem. Näiteks 18°C juures võtab arengutsüklil aega umbes 19 päeva ning viljastumisvõime saavutavad emased alles kuskil 16 tunniga. Selline kasvukeskkonna temperatuuridega manipuleerimine võimaldab laboratoorsetes tingimustes vastavalt vajadusele kärbest koorumisaega edasi lükata. Seda nähtust saab samuti rakendada äsjakoorunud emaste kärbest neitsiperioodi pikendamiseks, võimaldades vältida nende ristumist sama tüve isastega 16 tunni jooksul. Hoides emaste eraldamisintervalli alla 16 tunni, saab neid tänu sellele hoida neitsitena kuni ristamiseni soovitud tüve isastega (Ashburner *et al.*, 2005).

Drosophila'l on mudelorganismina hulk konkreetse fenotüübiga markergeene, mis lihtsustavad geneetilist ristamist. Üks tuntumaid selleks on *Drosophila* silmavärvi määrava geeni esinemine kromosoomis. Näiteks, tavaliselt alustatakse uue tüve loomisel valgete silmadega *Drosophila*'st (retsessiivne mutatsioon *white* geenis - w^1/w^1). Huvipakkuv geen eksisteerib tavaliselt aga koos punast silmavärvi määrava markergeeniga (w^+). Kui selline geenikasett on insertseerunud kromosoomi, on võimalik huvipakkuva geeni olemasolu järgmistes põlvkondades jälgida punaste silmadega *Drosophila*'te olemasolul populatsioonis (Prokop, 2013).

Drosophila'te geneetilisel ristamisel on suureks probleemiks homoloogilise rekombinatsiooni esinemine, mis võib lahku viia huvipakkuva ning markergeeni. Seda saab ära hoida näiteks nn tasakaalustaja kromosoomide abil (ingl *balancer chromosomes*). See tähendab, et ühel homoloogilistest kromosoomidest on laiaulatuslikud geenijärjestuste inversioonid, mille tõttu homoloogiline rekombinatsioon toimuda ei saa. Selline kromosoom sisaldab fenotüübiliselt nähtavat dominantset markergeeni ning retsessiivset letaalselt geeni. Niikaua, kui integreeritud transgeeni kandev kromosoom eksisteerib koos sama kromosoomi tasakaalustaja kromosoomiga, ei ole karta geneetilise rekombinatsiooni poolt põhjustatud markergeeni ja transgeeni eraldumist (Prokop, 2013).

1.6.1 GAL4-UAS ekspressioonisüsteem *Drosophila*'s

Transgeensete valkude ekspresseerimiseks on *Drosophila*'s laialdaselt kasutusel GAL4-UAS süsteem, mida kirjeldasid Brand ja Perrimon oma 1993. aasta artiklis. See on kaheosaline ekspressioonisüsteem, mis koosneb pärmi transkriptsiooni aktivaatorvalgust GAL4-st ning selle märklaudjärjestusest ehk UAS-st (ingl *upstream activating sequence*). GAL4 kodeeriva geeni ette on võimalik paigutada erinevaid koespetsiifilisi promootoreid, võimaldades huvipakkuvat geeni ekspresseerida kas üle kogu organismi või ainult teatud kindlas koes. UAS järjestuse järele pannakse huvipakkuv geen. Need kaks komponenti on üksteisest eraldatud paiknedes eraldi kärbeste tüvedes, kelle omavahelisel ristumisel satuvad eelpool nimetatud komponendid kokku ühte organismi ning GAL4 saab seonduda vastavale UAS-järjestusele, mille järel ekspresseeritakse huvipakkuv geen. Selline süsteem võimaldab küll koespetsiifilist geeniekspressiooni, kuid on limiteeritud endogeense promooteri ekspressioonimustriga. Selleks, et geeniekspressiooniga oleks võimalik ka ajaliselt manipuleerida, on loodud edasiarendus GAL4-UAS süsteemist – nn *GeneSwitch* (Osterwalder *et al.*, 2001). *GeneSwitch* kujutab endast GAL4 transkriptsioonifaktorist ja progesterooni retseptorist koosnevat kimäärset valku, mis lisaks DNA-ga seonduvale ning aktivatsiooni domeenile sisaldab ka progesterooni retseptori ligandi siduvat domeeni. Ligandiks antud süsteemis on sünteetiline steroid RU486 (mifepristoon, MP), mille olemasolul söötmes aktiveeritakse huvipakkuva geeni ekspressioon (Osterwalder *et al.*, 2001; Scialo *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2017), ning mille ekspressiooni taset on võimalik kalibreerida MP kontsentratsiooniga söötmes (Osterwalder *et al.*, 2001). Süsteemi kitsaskohana on näidatud, et osaline geeniekspressioon võib osades kudedes toimuda ka ilma MP juuresolekuta. Süsteemi nõ „lekkimine“ sõltub näiteks ekspresseeritavast geenist, kasutatavast *GeneSwitch*'ga liinist ning uuritava *Drosophila* tüve geneetilisest taustast. Enamus juhtudel aga ei ole see statistiliselt piisavalt relevantne, et võiks katsetulemusi mõjutada (Scialo *et al.*, 2016), mistõttu ei takista see enamasti selle süsteemi kasutamist teaduses. Siiski tuleb iga uudse eksperimentaalse süsteemi korral selle võimalusega arvestada ning vajadusel kontrollida seda efekti.

1.7 Töögrupi eelnev töö mtDNA stressi indutseerimisel

Enne minu magistrip projekti algust Priit Jõersi töörühmas oli antud töörühm välja töötanud uude viisi indutseerida mtDNA stressi. See saavutati läbi transgeense *Drosophila melanogaster*'i tüve konstrueerimise. See kannab endas GAL4-UAS süsteemiga kontrollitavat heterotrimeerse bakteriaalse endonukleaasi I valgu kõiki kolme subühikut (HsdM, HsdS ja HsdR). Antud subühikutega on liidetud ka mitokondriaalne signaaljärjestus tsitraadi süntaasi geenist (mtEcoBI). Tüüp I endonukleaaside tööpõhimõte seisneb selles, et pärast seondumist kaheaheelalise DNA-ga läbi oma spetsiifilise seostumisjärjestuse, translokeerib see DNA ning tekitab kaheaheelalise katke juhuslikku kohta, mis võib olla tuhandete nukleotiidide kaugusel nukleaasi algsest seostumiskohast. Seeläbi on antud nukleaas võimeline nii translokeerima kui ka juhuslikult degradeerima oma substraadiks olevat DNA ahelat. Kuigi DNA fragmentatsioon on juhuslik, lõikavad tüüp I endonukleaasid suurema tõenäosusega siis, kui translokatsioon peatub, näiteks tänu DNA sekundaarstruktuuri või mõne muu valk-DNA interaktsiooni mõjul. Selleks, et välistada ainuüksi valgu ekspressioonist tulenevaid sekundaarseid efekte, mis ei ole seotud antud nukleaasi/translokaasi ensümaatilise funktsiooniga, loodi lisaks täiesti funktsionaalsele tüvele (RMS, funk.) ka kaks punktmutatsioonidega isovormi. Nendeks on kontrolltüvena kasutatav nii translokatsiooni- kui ka endonukleaas-defektne tüvi (R4MS, endo/trans-; aminohappeline asendus: K477R) ning endonukleaasse defektiga tüvi (R2MS, endo-; aminohappeline asendus: D298E). Selliselt indutseeritud mtDNA stress põhjustas funktsionaalset mtEcoBI ekspresseerivas täiskasvanud kärbses selget rasvade katabolismi allikana eelistamist suhkrutele ja kiiret suremist, jättes samas hingamisahela intaktseks ja ROS-de produktsiooni normaalseks. Samuti puudus igasugune negatiivne fenotüüp endo/trans-mutatsiooni kandval transgeensel tüvel, mis kinnitas mtDNA stressi spetsiifilist mõju metabolismile. Küll aga oli endo- tüve fenotüüp paljuski sarnane ja kohati identne funk. mtEcoBI tüvele, mis demonstreeris, et mitte ainult kaksikahelalised katked vaid ka muutused mtDNA *in vivo* konformatsioonis on piisavad selliseks metabolismi ümberprogrammeerimiseks. Lisaks indutseeris mtEcoBI aromaatsete aminohapete türosiini ja fenüülalaniini kadu, mis omakorda põhjustas käitumislikke ja füsioloogilisi muutusi tänu nendest aminohapetest sünteesitavate neurotransmitterite vähenenud kogusele (Yalgin *et al.*, parandamisel).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid:

Kuna tööühmas varem avastatud fenomeni, mille kohaselt mtDNA stress viib metaboolse paindumatuse tekkeni, põhjus on jäänud ebaselgeks, oli selle magistritöö laiemaks eesmärgiks antud mehhanismi uurimine.

Käesoleva töö täpsemateks eesmärkideks oli uurida:

- 1) kas varasemalt näidatud fenotüübi, mille kohaselt suhkrute rakku jõudmine on piiratud, tekkimine on seotud suhkrute transpordiga membraantranspordi tasandil.
- 2) võimaliku regulaatorvalgu sarah efekti mtEcoBI poolt põhjustatud stressivastusele.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 *Drosophila*'te käitlemine, ristamine ja tüved

Drosophila'te kasvatamiseks ja hoiustamiseks söötmel kasutati viaale või suuremaid plastikkonteinereid ning hoiti neid 18°C või 25°C kapis. *Drosophila*'tega töötamisel kasutati nende uimastamiseks CO₂, kuid mitte kauem kui pool tundi, kuna liigsal CO₂ doosil on elulemusele negatiivne mõju.

Drosophila'te sööde sisaldas järgmisi komponente: agar (1%), pärm (3,5%), maisijahu (1,5%), sojajahu (1%), sahharoos (1,5%), glükoos (3%), suhkrusiirup (3%), propioonhape (0,5%), nipagiin (0,1%). Agar, pärm, maisijahu ja sojajahu segati vees ning lasti seista umbes 15 minutit. Segu kuumutati keemiseni ning lisati sahharoos, glükoos ja suhkrusiirup. Söödet keedeti veel 20 minutit ning siis jahutati magnetsegajal vähemalt 65°C-ni, pärast mida lisati söötmele antibakteriaalsed ja antifungsiitsed ained – propioonhape ja nipagiin. *GeneSwitch*'i indutseerimiseks lisati vajadusel söötmesse ka steroidhormoon mifepristooni lõppkontsentratsiooniga 200 µM. Söötmel jaotati vastavalt vajadusele 35 ml, 4 ml ning 7.5 ml kaupa konteineritesse ning lasti lahtiselt kuivada umbes 2 tundi, pärast mida söötmed korgiti ning hoiustati 4°C juures, kus värskeid söötmeid hoiti maksimaalselt 3 nädalat.

Drosophila 'te ristamiseks ettevalmistamine ja ristamine:

Drosophila neitside (viljastamata emased) korjamisel selekteeritakse välja mitteviljastunud emased järgnevas ristamiseks. Pudelit kooruvate kärbestega hoiti 18°C kapis, kuna sellel temperatuuril saavutavad nad viljastumisvõime umbes 16 tunniga. Neitsid korjati hommikul ja õhtul selliselt, et korjamiste vahepeal oleks maksimaalselt 15 tundi. Kui intervall oli pikem, selekteeriti välja ainult ebatäielikult pigmenteerunud emased. Peale nukust koorumist ei ole äädikakärbsed 4-5 tunni jooksul täielikult pigmenteerunud ja seega võib kindel olla, et sellised emased ei ole veel viljastumisvõimelised. Sellisel juhul saab emastel ja isastel vahet teha esikäppade järgi, kus emastel kärbestel puuduvad isastele iseloomulikud karvatutid. Neitsid korjati senikaua, kuni neid oli ristamiseks piisav arv. Vahetult enne ristamist kontrolliti veelkord nende sugu ning ka seda kas söötme peal on märgata vastsete liikumist. Isaste kärbeste või vastsete tuvastamisel viaalist elimineeriti seal olevad emased ning neid ristamisel ei kasutatud.

Kärbeste ristamisel võeti isaseid ja emaseid suhtes 1:2, vastavalt 30 ja 60 pudeli kohta. Ristuvaid kärbsed hoiti tavalisel söötmel kolm päeva 25°C juures, peale mida kanti need uutesse pudelitesse või elimineeriti. Koorunud kärbestest selekteeriti maksimaalselt 3 päeva jooksul välja isased ning kanti MP söötmele, mida ülepäeviti vahetati CO₂ kasutamata värskema söötme vastu. Vähemalt 24 tundi enne ajapunkti korjamist jagati kärbsed 25-30 kaupa MP viaalidesse.

Töös kasutatud *Drosophila* 'te tüved on toodud tabelis 1 ning ristamised LISA-s.

Tabel 1. Töös kasutatud *Drosophila* tüvede nimetused, kirjeldused ja genotüübid.

Tüve nimi	Tüve kirjeldus	Genotüüp	Allikas	Modif. kromosoom
funk. mtEcoBI	UAS süsteemi kontrolli all.	y^1w^* ; $\frac{UAS/HsdM, UAS/HsdS}{UAS/HsdM, UAS/HsdS}; \frac{UAS/HsdR}{UAS/HsdR}$	meie töörühm	II kromosoom
endo- mtEcoBI	UAS süsteemi kontrolli all.	y^1w^* ; $\frac{UAS/HsdM, UAS/HsdS}{UAS/HsdM, UAS/HsdS};$ $\frac{UAS/HsdR(D298E)}{UAS/HsdR(D298E)}$	meie töörühm	II kromosoom
endo/trans- mtEcoBI	UAS süsteemi kontrolli all.	y^1w^* ; $\frac{UAS/HsdM, UAS/HsdS}{UAS/HsdM, UAS/HsdS};$ $\frac{UAS/HsdR(K477R)}{UAS/HsdR(K477R)}$	meie töörühm	III kromosoom
tubGS	indutseeritav tubuliin promootor	$\frac{tubGS}{tubGS}$	Scott Pletcheri töörühm	III kromosoom
mhcGS	indutseeritav lihaskoe-spetsiifiline GAL4 promootor.	y^1w^* ; wgSp-1/CyO; P{MhcSwitch.O} GSG314-	Bloomington Stock Center #43641	III kromosoom
sraKD	kommertsiaalne RNAi tüvi <i>sra</i> vastu	$\frac{UAS - sarah RNAi}{UAS - sarah RNAi}$	VDRC Stock Centre, VDRC ID: 107573	II kromosoom
UAS-Glut1	Glut1 üleekspressioon	$\frac{UAS - Glut1}{UAS - Glut1}$	Linda Partridge töörühm	II kromosoom
UAS-Sirt2	Sirt2 üleekspressioon	$\frac{UAS - Sirt3}{UAS - Sirt3}$	Usha Acharya töörühm	III kromosoom

2.2.2 Süsivesikute mõõtmine

Süsivesikute - glükoosi, glükogeeni ning trehhaloosi mõõtmiseks kasutati glükoosi reagenti (*Glucose Assay Reagent*, Sigma G3293), amüloglükosidaasi (Sigma A1602) ning trehhalaasi (Sigma T8778). Ensüümid amüloglükosidaas ning trehhalaas lagundavad vastavalt glükogeeni ning trehhaloosi glükoosiks, mis fosforüleeritakse ATP ning ensüümi heksokinaas abil glükoos-6-fosfaadiks (G6P), mis omakorda glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaasi (G6P DH) abil 6-fosfoglükonaadiks oksüdeeritakse. Reaktsiooni käigus redutseeritakse NAD^+ NADH-ks, mida spektrofotomeetriga mõõdetakse 340 nm juures ning mille kogus on proportsionaalne lahuses oleva glükoosiga.

Süsivesikute mõõtmiseks homogeniseeriti jääl 400 µl PBS-s (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4) 10 isast kärbest. Endogeensete ensüümide inaktiveerimiseks inkubeeriti lüsaate 5 minutit 70°C juures. Iga proovi kohta võeti 4 uut katsutit ning lisati neisse 40 µl lüsaati. Kahte katsutisse lisati juurde 6,7 µl PBS, kolmandasse 6,7 µl amüloglükosidaasi (1U/ml) ning neljandasse 1 µl trehhalaasi (1U/mg). Proove inkubeeriti 2 tundi 37°C juures. Peale seda tsentrifuugiti homogenisaate 15 sekundit 10.000 x g juures. 96-mikroitiiterplaadile kanti 100 µl glükoosi reagenti ning sadet kaasa võtmata lisati sinna 30 µl lüsaati. Tausta mõõtmiseks lisati 100 µl PBS-le 30 µl homogenisaati, mida oldi eelnevalt PBS-ga töödeldud. Kõrvale tehti ka standardkõver, et kontrollida mõõtmistulemuste paiknemist skaala lineaarses piirkonnas. Plaati proovidega inkubeeriti 30 minutit 37°C juures, millele järgnevalt mõõdeti OD 340 nm juures. Vaba glükoos, glükogeen ja trehhhaloos arvutamiseks lahutati mõõdetud tulemustest maha tausta tulemus.

2.2.3 Triatsüülgütseriidide mõõtmine

Triatsüülgütseriidide (TAG-ide) mõõtmiseks kasutati triglütseriidide reagenti (*Triglyceride Reagent*, Sigma, T2449) ja vaba glütserooli reagenti (*Free Glycerol Reagent*, Sigma, F6428). Triglütseriidide reagent sisaldab lipaasi, mis hüdrolyüsib TAG-e vabadeks rasvhapeteks ning glütserooliks. Vaba glütserooli reagent muudab lahuses oleva glütserooli värvaineks, mille neelduvust on võimalik spektrofotomeetriga mõõta ning selle intensiivsus on võrdne algse TAG-ide kontsentratsiooniga lahuses. Reaktsioonis vaba glütserooli reagentiga fosforüleeritakse glütserool ATP toimel glütserool-1-fosfaadiks (G1P) glütserooli kinaasi (GK) poolt katalüüsitavas reaktsioonis. G1P oksüdeeritakse reaktsioonis glütserool fosfaatoksüdaasiga (GPO) dihüdroksüatsetoon fosfaadiks (DAP) ning vesinikperoksiidiks (H_2O_2). Viimane reageerib peroksüdaasi (POD) toimel vaba glütserooli reagenti lahuses oleva 4-aminoantipüriini (4-AAP) ja naatrium N-etüül-N-(3-sulfopropüül) anisidiiniga (ESPA), mille tagajärjel tekib vesi ning värvaine kvinoneimiini, mille neeldumismaksimum on 540 nm juures.

TAG-ide mõõtmiseks homogeniseeriti 20 isasest kärbses 800 µl PBS-Tween'is (0,1%) ning endogeensete lipaaside inaktiveerimiseks inkubeeriti lüsaate 5 minutit 70°C juures. Peale seda võeti iga proovi kohta kolm uut katsutit, milledesse pandi 20 µl kuumtöödeldud lüsaati. Kahte nendest lisati juurde 20 µl PBS-i ning kolmandasse 20 µl triglütseriidide reagenti (250 U/ml). Saadud proove inkubeeriti 30 minutit 37°C juures. Homogenaate tsentrifugiti 15 sekundi jooksul 10.000 x g juures. TAG-ide mõõtmiseks kanti 96-mikrotiiterplaadile 100 µl vaba glütserooli reagenti, millele lisati 30 µl homogenaati, sadet kaasa võtmata. Kõrvale tehti ka standardkõver, et kontrollida mõõtmistulemuste paiknemist skaala lineaarses piirkonnas. Proove inkubeeriti 5 minutit 37°C juures, peale mida mõõdeti OD 540 nm juures. TAG-ide taseme arvutamiseks lahutati vaba glütserooli tase totaalsest glütserooli kogusest.

2.2.4 Toitumise aktiivsuse mõõtmine

Toitumisaktiivsuse mõõtmiseks pandi isased kärbsed CO₂ kasutamata 1,5 tunniks 1% brilliant sinist (*Blue FCF*) sisaldavale söötlele. Peale mida korjati isased kärbsed 25 kaupa katsutitesse. Kärbsed homogeniseeriti jääl 800 µl PBS-s. Koetükid sadestati tsentrifugimisega 10 minutit 4°C ja 10.000 x g juures. Katsutitest võeti välja 700 µl proovi ning tsentrifugiti nagu eelnevalt. 96-mikrotiiterplaadile kanti 200 µl proovi, vältides lipiides kihi ülekandumist, kuna see häirib neeldumise mõõtmist. Standardkõver tehti *Blue FCF*-ga, lahjendustega konsentratsioonis 0,5 µg/ml – 50 µg/ml. Spektrofotomeetriga mõõdeti värvaine neelduvust 650 nm juures.

2.2.5 ATP mõõtmine

ATP mõõtmiseks kasutati Invitrogen ATP determinatsiooni komplekti (A22066). See põhineb jaanimardikast (*Lampyrus noctiluca*) pärit rekombinantse lutsiferaasi võimel läbi viia ATP ning D-lutsiferiini vahelist reaktsiooni. Lutsiferaas katalüüsib ATP, hapniku ning oma substraadi D-lutsiferiini vahelist reaktsiooni Mg²⁺ ionide juuresolekul, mille tulemusena tekib oksülutsiferiin, AMP, pürofosfaat, CO₂ ning valgus, mille intensiivsust luminomeetriga dektekteeritakse.

ATP mõõtmiseks homogeniseeriti 300 µl ATP ekstraktsiooni puhvri (6M guanidiin-HCl; 100mM Tris·HCl pH=7.8; 4mM EDTA pH=8) lisamisega 10 isast kärbest, mis seejärel vedelas lämmastikus korraks läbi külmutati. ATP-aaside inaktiveerimiseks pandi katsutid 5 minutiks 100°C juurde keema. Seejärel pandi proovid 10 minutiks 4°C ja 10.000 x g juurde tsentrifugima. Katsutitest võeti välja 200 µl lüsaati ning tsentrifugiti uuesti nii nagu eelnevalt. ATP ekstraktsiooni puhvriga tehti lüsaatidest 12,5x lahjendused. 5 µl lahjendatud lüsaati kanti

lābipaistmatule (Greiner Bio-One™, 655207) mikrotiiterplaadile, millele oli eelnevalt lisatud 100 µl ATP reaktsiooni segu (MQ H₂O, 20x reaktsiooni puhver, 0,1M DTT (ditiotreitol), 10 mM lutsiferiin, lutsiferaas 2,5 µl/10ml). ATP standardkõvera saamiseks kasutati ATP konsentratsioone vahemikus 0-1000nM, millest igaühete lisati samuti 5 µl. ATP mõõdeti luminomeetriga 28°C juures 30 minutit, üks mõõtmine iga kahe minuti tagant.

2.2.6 Elulemuse katsed

Drosophila elulemuse katsete jaoks korjati iga tüve kohta kolme erinevasse viaali 20 kärbest, mitte rohkem kui 72 tundi peale koorumist. Esimesed kaks nädalat pandi kärbsed ülepäeviti CO₂ kasutamata uutesse värske söötmega viaalidesse, edaspidi esmaspäeval-kolmapäeval-reedel. Iga päev vaadeldi söödet ning loeti kokku surnud kärbsed. Söötmehetamise päeval loeti surnuks kõik, kes vana söötmehet külge kinni olid jäänud, ka siis kui oli märgata nende liikumist. Katse kestis, kuni viimane kärbes oli surnuks tunnistatud.

2.2.7 SDH mõõtmine

Suktsinaadi dehüdrogenaasi mõõtmiseks kasutati *APExBIO* kolorimeetrilisel meetodil põhinevat katsesüsteemi (Kataloogi N° K2210). Suktsinaadi dehüdrogenaas on hingamisahela II kompleks, ensüüm, mis oksüdeerib suktsinaati fumaraadiks ja kannab elektronid ubikvinoonile. Katses kantakse elektronid kunstlikule elektronaktseptorile (SDH Probe), mis redutseerimine muudab sinise värvaine värvituks.

SDH mõõtmiseks homogeniseeriti jääl 10 isast kärbest 100 µl katse puhvris ning lasti jääl 10 minutit inkubeeruda. Proove tsentrifuugiti 5 minutit 10.000 x g juures ning saadud supernatant pandi uude katsutisse. SDH mõõtmiseks kanti 96-mikrotiiterplaadile kõigepealt 40 µl katse puhvris, millele lisati 10 µl lüsaati ning lõpuks ka 50 µl reaktsiooni puhvrit, mis koheselt ka sama pipetiotsikuga ära segati. SDH aktiivsust mõõdeti spektrofotomeetriga 600 nm ja 25°C juures tunni aja jooksul. Ensüümi kineetika hindamiseks kasutati lineaarse faasi tulemusi 5-6 minuti jooksul.

2.2.8 Western proovide ettevalmistamine ja blotting

Westerni proovide ettevalmistamiseks koguti 30 isast kärbest katsutisse ning homogeniseeriti 300 µl homogenisatsiooni puhvri lisamisega (1,5% Triton X-100; Complete Mini EDTA-vaba proteaasi inhibiitor – 1 tbl/10 ml; PhoSTOP fosfataasi inhibiitor – 1 tbl/10ml; PBS). Lüsaate

inkubeeriti 15 minutit jääl, tsentrifuugiti 13.000 x g ja 4°C juures 15 minuti. Lüsaat pandi uude katsutisse ning mõõdeti valgukogus Bradfordi meetodil. Lüsaate hoiustati -80°C juures, kuniks nende analüüsimiseni. Enne Westerni tegema hakkamist segati lüsaadid läbi 2xSDS laadimispuhvriga (50mM Tris·HCl pH=6.8; 0,01% värvaine *Serva Blue G*; 4% SDS; 12% glütserool, 0,1M DTT) ning pandi 5 minutiks 95°C juurde inkubeerima.

Westerni tegemiseks kasutati Bio-Rad AnyKD (Criterion™ TXG™ Precast Gels) eelvalatud gradientgeeli. Geelilt kanti valgud nitrotselluloosmembraanile (GE Healthcare Amersham™ Protran™ 0,45 µm) (wet transfer). Membraanid blokeeriti 5% BSA lahusega ning pesti 1xTBS-Tween (0,1%) (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 25mM Tris + 0,1% Tween) lahusega. Valgud visualiseeriti ECL (kemoluminestsents) signaaliga (Bio-Rad Clarity™ Western ECL Substrate) ning pilt tehti Bio-Rad (Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+) masinaga. Westerni signaal kvantifitseeriti üldise valgukoguse vastu. Selleks värviti membraani 15 minutit Ponceau S värvilahusega (0,1% Ponceau S värv, 5% etaanhape) ning pildistati sama masinaga nagu ennemgi. Kvantifitseerimist teostati Image Lab programmiga.

2.2.9 Bradford

Drosophila'te metaboliitide, ensüümiaktiivsuse ja ATP mõõtmisel normaliseeriti tulemused üldise valgukoguse vastu. Selleks kasutati lihtsat ja kiiret Bradfordi meetodit. Meetod põhineb värvaine *Coomassie Brilliant Blue G-250* seondumisel aromaatsete ja aluseliste aminohappe jääkidega, moodustades sinise värvuse. Selleks lisati 200 µl Bradfordi reagentidele sõltuvalt katsest kas 1, 2 või 3 µl lüsaati. Kaliiberkõvera jaoks kasutati veise seerumi albumiini (BSA) lahuseid kontsentratsioonides 0 mg/ml kuni 2 mg/ml, mida Bradfordi reagentidele lisati 2 µl. Neelduvust mõõdeti 595 nm juures.

2.2.10 *Drosophila* mtDNA eraldamine

Drosophila mitokondriaalse DNA eraldamiseks homogeniseeriti jääl *Dounce* homogenisaatoris isased kärbsed, kasutades homogenisatsiooni puhvrit (225 mM mannitool, 75mM sahharoos, 10mM Tris·HCl pH=7,6; 1mM EDTA; 0,1% BSA). Homogenaati fuugiti 3 korda 1000 x g ja 4°C juures 1 minut, et saada lahti laibatükkidest. Mitokondrite kätte saamiseks fuugiti supernatanti 9000 x g ja 4°C juures 10 minutit. Sadet pesti 20 ml homogenisatsiooni puhvriga ning fuugiti uuesti nagu eelmine kord. Mitokondritega sade resuspendeeriti 1 ml DNA ekstraktsiooni puhvriga (25 mM EDTA pH=8.0; 75 mM NaCl), lisati juurde 0,2V 10% SDS ja 200 µg proteinaas K ning inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund. mtDNA ekstraheeriti 2V fenool-kloroform-isoamüülalkoholi (25:24:1) kasutades. mtDNA sadesdati 0,2V 10M ammoonium

atsetaadi ja 2V etanooliga üleöö -20°C juures. mtDNA fuugiti põhja 16 000 x g ja 4°C juures 20 minutit, pesti seejärel 70% etanooliga. mtDNA võeti üles 150 µl TE puhvrts (100mM Tris-Cl pH=7,4; 10 mM EDTA pH=8.0).

2.2.11 Gelelektroforees ja Southern blot

Southern bloti läbiviimiseks kanti 0,5%-lisele TBE-ga (89 mM Tris-boraat, 2 mM EDTA) agarosgeelile 1 µg lineariseerimata DNA-d ning NdeI (4U/µg) ja BsrGI-ga (1 µl/µg) lineariseeritud proovid. Geeli jooksutati 20 tundi (1,7V/cm). Geeli inkubeeriti 20 minutit TBE puhvrts etiidiumbromiidiga (1 µg/µl) ning pesti siis veel 20 minutit TBE puhvrts. Edasi pesti geeli 4x20 minutit, vastavalt depurinisatsiooni (0,25 M HCl), 2x denaturatsiooni (0,5M NaOH; 1,5M NaCl) ja neutralisatsiooni puhvrts (2M NaCl; 1M Tris; pH=7,4). Southern blottimisel kanti DNA geelilt nailonmembraanile üleöö. Membraan pandi 6x SSC (3M NaCl; 0,3M trinaatriumtsitraat) puhvrtsse ning DNA ristseostati UV-ga membraani külge, pärast mida pandi membraan 6x SSC puhvrtsse tagasi, kuni hübridiseerimiseni. Membraan eel-hübridiseeriti hübridisatsiooni puhvrts (1 mM EDTA; 7% SDS; 250 mM naatriumfosfaat puhver) 1h 55°C, ning siis hübridiseeriti sama puhvrtsiga 55°C juures üleöö radioaktiivselt märgistatud mtDNA-spetsiifilise prooviga. Radioaktiivne proov genereeriti PCR-ga, kasutades oligoneukleotiide Dm12075F ja Dm12584R ning P32 isotoobiga märgistatud dCTP nukelotiide. Pärast hübridisatsiooni pesti membraani 20 minutit 5x SSC, 0,1% SDS puhvri ja 20 minutit 1x SSC, 0,1% SDS puhvrtsiga. Tulemused visualiseeriti Phosphorimageri ekraanil Amersham Typhoon instrumendiga.

2.2.12 Andmete statistiline analüüs

Esitatud andmed on vähemalt kolme erineva bioloogilise korduskatse keskmised. Kahesuunalise Student'i t-testi p-väärtused arvutati programmiga GraphPad, Welchi korrektsiooni kasutati juhul kui f-testi p-väärtus oli alla 0,05.

2.2.13 Metaboloomika ja RNA sekveneerimine

Mõlemad laiaulatuslikud analüüsid viidi läbi teenusena selleks tööks spetsialiseerunud laborite poolt. Meie töögrupi poolt saadatud materjal analüüsiti Helsingi ülikooli sekveneerimise ja transkriptoomika tuumiklaborisse, kus teostati ka andmete esmane andmeanalüüs. Metaboloomika (nii proovide töötlemine, andmete kogumine ja esmane analüüs) teostati Human Metabolome Technologies, Inc. Poolt.

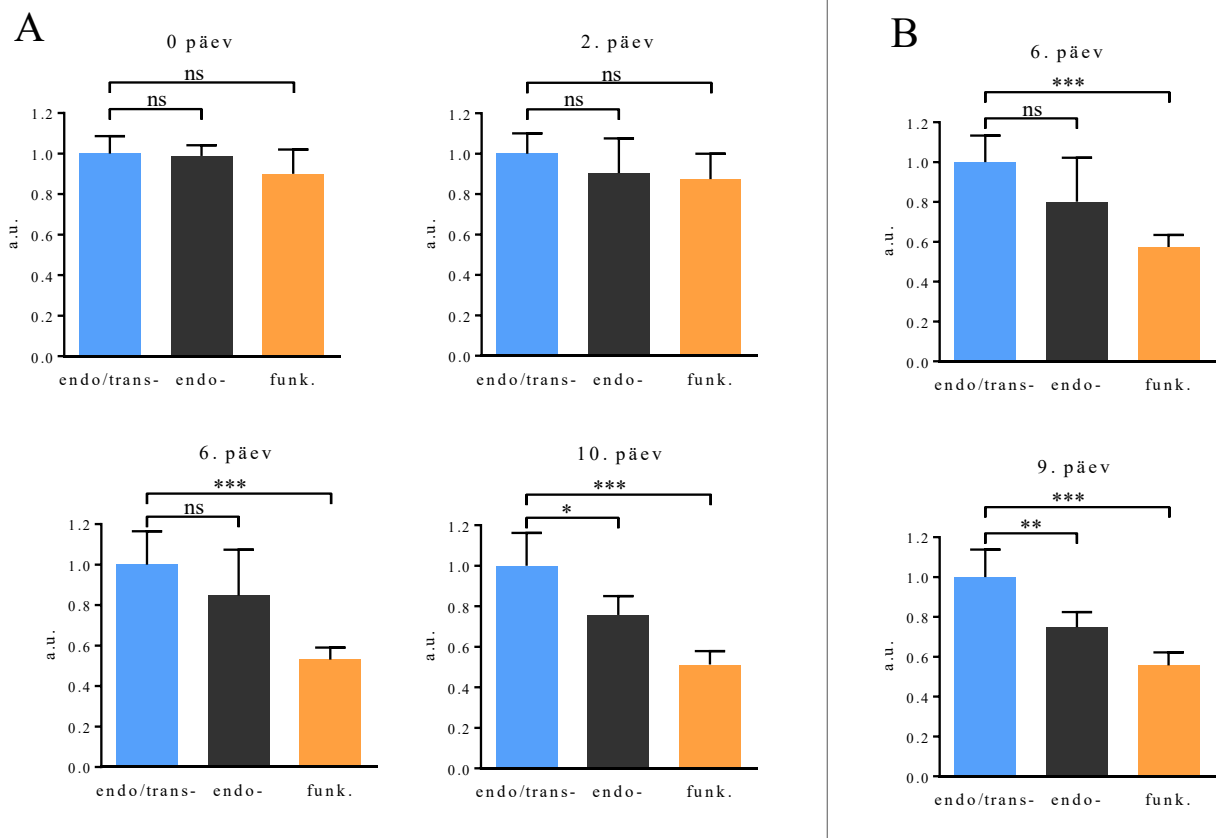
2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 ATP väheneb nii lihaskoe kui ka üldise ekspressiooni korral, kuid ei korreleeru toitumisaktiivsusega.

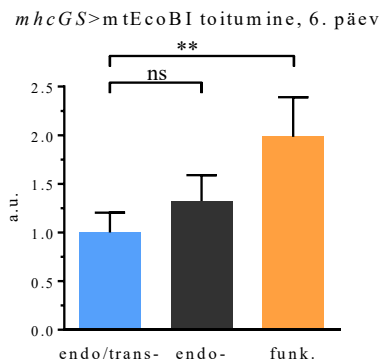
Selleks, et teha kindlaks, kas metaboolse jäikuse teke on seotud toitainete omastamise defektiga lihaskoes või ei, mõõtsin nii lihaskoe spetsiifilise promotoori (*mhcGS*) kui ka kõiki kudesid hõlmava promotoori (*tubGS*) kontrolli all olevate mtEcoBI isovorme kandvates tüvedes ATP-d. Seda mõõtsin *tubGS*>mtEcoBI puhul 0 päeval, kus *Drosophila*'id ei indutseeritud, teisel, kuuendal ning kümnendal päeval (joonis 1A). *mhcGS*>mtEcoBI ATP tasemed mõõtsin nii 6-ndal kui ka 9-ndal päeval (joonis 1B), millest viimane ajapunkt oli eluea suhtes analoogne *tubGS*>mtEcoBI tüvede 10 päevaga. Tulemustest on näha ATP taseme langust mõlema ekspressioonisüsteemi puhul vähemalt alates 6-ndast päevast, mis püsib sisuliselt muutumatuna kuni letaalsuse tekkeni. Mõnevõrra väiksem langus endo- tüves peegeldab ka vähem tugevat metaboolse jäikuse teket antud tüves (Yalgin *et al.*, parandamisel). Siin tuleb rõhutada, et kuigi ekspressioon oli *mhcGS* puhul piiratud lihaskoega, kasutati analüüsiks terveid kärbsed, mistõttu vähemalt *mhcGS*>mtEcoBI tüvedes oli ATP vähenemine lihaskoes kindlasti suurem kui kogu keha homogeneaadis. Ilma induktsioonita (päev 0) ning varajases ajapunktis (päev 2) (joonis 1A) mõõtsin ATP-d *tubGS*>mtEcoBI *Drosophila*'tel, näitamaks, et meie töörühmas välja töötatud mtEcoBI süsteemi puhul ei toimu osalist geeniekspressiooni ilma MP juuresolekuta, mida GAL4-UAS puhul on selle süsteemi kitsaskohana varasemalt ka näidatud (Scialo *et al.*, 2016). Samuti mõõtsin ATP-d *tubGS*>mtEcoBI-s ka teisel päeval (joonis 1A), mille puhul ei olnud ATP taseme langust endo/trans- ja funk. tüve puhul märgata, mis tähendab, et mtEcoBI geeniekspressioon hakkab oma mõju avaldama hiljem kui kahe päeva pärast.

Varem on meie töörühmas näidatud, et funktsionaalses tüves on *tubGS*>mtEcoBI *Drosophila*'tel toitumisaktiivsus langenud võrreldes kontrolltüvega (Yalgin *et al.*, parandamisel). See efekt on tingitud aminohappe türosiin vähenemisest, mis on prekursoriks neurotransmitter dopamiinile, millest sünteesitakse L-DOPA-t ning mis kontrollib *Drosophila*'te toitumiskäitumist. Vastupidiselt *tubGS*>mtEcoBI oli toitumisaktiivsus lihaskoe spetsiifilise promotoori kontrolli all hoopis tõusnud (joonis 2), mis viitab lipiidide vähenemise tulemusena signaliseeritud näljastressile. See tulemus näitab seda, et täheldatud toitainete omastamise defekt lihaskoe-spetsiifilise ekspressiooni korral ei saa olla tingitud häiretest *Drosophila* lihasmotoorikas. Nimelt on *Drosophila* toitumiskäitumine otseses seoses lihaskoe aktiivsusega, kuna toidu omastamiseks on vajalik huule väljasirutumine. Häirete korral lihaste töös põhjustaks see koheselt takistust toitumises ning vastavalt ka omastatava toidu hulga

vähennemist. Seetõttu võib väita, et katabolismi allika valiku põhjus ei ole seotud üldise toidu omastamise defektist tingitud näljaseisundiga ja on pigem põhjustatud defektitest katabolismi tasemel. Lisaks sellele näitab toitumisaktiivsuse kasv ka seda, et dopamiiniga seostatud efektid on spetsiifilised närvisüsteemile, kus toimub ka enamiku neurotransmitterite süntees. ATP langust on tihti seostatud häiretega OXPHOS protsessiga, mille tõttu suureneb ROS-ide produktsioon. Meie töörühmas välja töötatud süsteemi puhul on aga OXPHOS protsessiga kõik korras ja ROS-ide üleproduktsiooni ei toimu (Yalgin *et al.*, parandamisel). Seetõttu on meie eelistatud seletus ainsa kasutatava süsinikuallika ehk lipiidide tagavara järk-järguline vähenemine, mille tulemusena elektronide voog piki hingamisahelat ja sellest sõltuva ATP süntees pidurdub. See kas ATP langus on otsene põhjus varajaseks suremiseks või on pigem tingitud sekundaarse nähtusena metabolismi ümberprogrammeerumisest, on antud kontekstis veel vara öelda.



Joonis 1. *tubGS>mtEcoBI* (A) ja *mhcGS>mtEcoBI* (B) ATP tasemed. Joonisel on kujutatud ATP tasemed *tubGS>mtEcoBI* tüvedes päeval 0, 6-ndal ja 10-ndal päeval (A) ning *mhcGS>mtEcoBI* tüvedes 6-ndal ja 9-ndal päeval (B). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), ns – (not significant) – statistiliselt mitte oluline tulemus.



Joonis 2. *mhcGS>mtEcoBI* toitumisaktiivsus 6-ndal päeval. $p < 0,01$ (**), ns – (not significant) – statistiliselt mitte oluline tulemus.

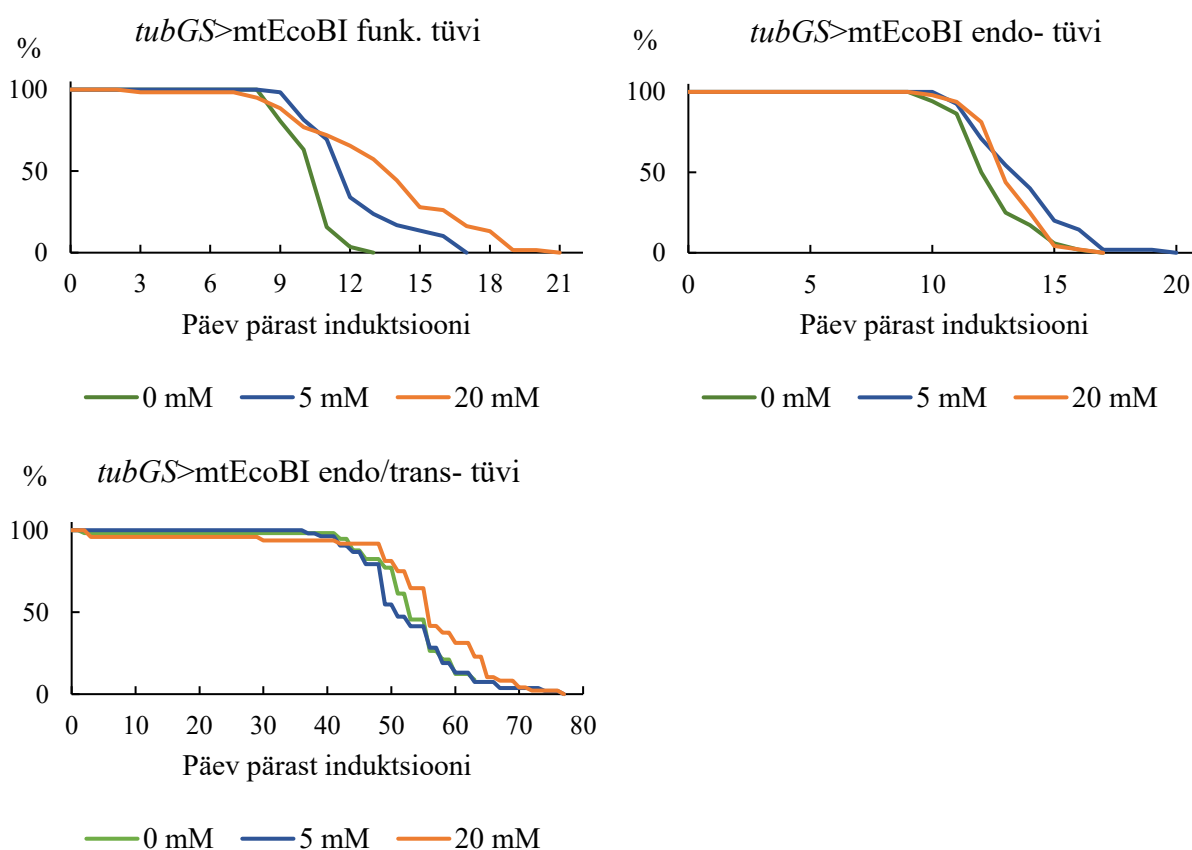
2.3.2 Metformiin pikendab *tubGS>mtEcoBI* tüvede eluiga, kuid *Glut1* üleekspressioon süsivesikute tarbimise ei paranda.

Metformiin on biguaanidne ühend, mida on edukalt kasutatud nii diabeedi ravimina kui ka erinevates uurimustes hiire ja *Drosophila* mudelite peal (Kita *et al.*, 2012; Niccoli *et al.*, 2016). Peamiselt peetakse metformiini efektiks glükoneogeneesi vähendamist ning AMPK aktivatsiooni kaudu kudede võimet glükoosi läbi GLUT4 aktivatsiooni paremini omastada (Zhou *et al.*, 2001) Metformiini mõju vaatlesin *tubGS>mtEcoBI* tüves MP söötmel kontsentratsioonidega 5 mM ja 20 mM ning kontrollina oli kõrval ka ilma metformiinita, tavalisel MP söötmel olev tüvi (joonis 3). Joonisel on näha, et kontsentratsioonil 5 mM pikeneb keskmine eluiga funk. tüvel neli päeva ning 20 mM juures umbes kaheksa päeva kui seda ilma metformiini lisamiseta. Siinkohal tuleb mainida, et tegu pole nende maksimaalse elueaga, vaid keskmisega, mida saab üldistada kõikide antud tüvede populatsioonide kohta.

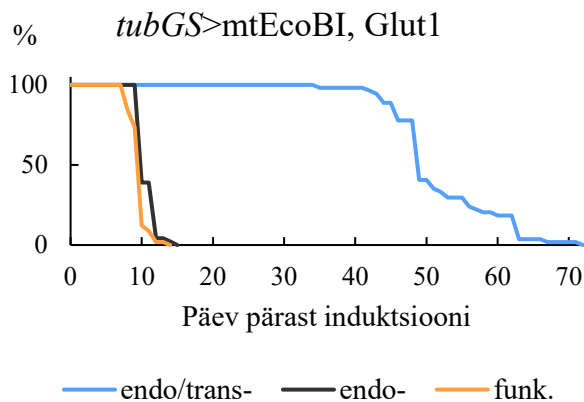
Selleks, et kontrollida suhkrute omastamisest tulenevat efekti membraantranspordi tasandil ristasin *tubGS>mtEcoBI* tüvedesse UAS kontrolli all olev *Glut1* üleekspressiooni kasseti (LISA-s). Glut1 on glükoosi transporter, mis sõltumata insuliini signaliseerimisest vastutab basaalse glükoosi transpordi eest rakku (Mueckler ja Thorens, 2013). Glut1 üleekspressiooni tüves vaatlesin elumust (joonis 4) ning samuti mõõtsin TAG-ide kasutamist (joonis 5). Tulemustest joonisel 4 on näha, et *Glut1* üleekspressiooni korral ei olnud paranenud eluiga endo- ja funktsionaalses tüves. Kuna *Glut1* üleekspressiooni korral võiks teoreetiliselt eeldada, et kui suhkrute transport rakku on paranenud, võiks see omada efekti *mtEcoBI* poolt tekitatud fenotüübile ja seega võiks rasvavarude vähenemine olla väiksem ja/või aeglasem. Püstitatud hüpotees aga paika ei pidanud, kuna nagu jooniselt 5 näha võib, on Glut1 üleekspressiooni tüves TAG-ide tase funktsionaalses tüves langenud pea 20%-ni, mis on analoogne meie töörühmas varem näidatud andmetele *tubGS>mtEcoBI* tüves (Yalgin *et al.*, 4A). Samas ei ole meil

lisakatsete puudumisel siiski kindlust kas *Glut1* üleekspressioon on piisav kompenseerimaks defektset suhkrute transporti. Seega eksisteerib võimalus, et erinevused metformiini ja *Glut1* üleekspressiooni katsete tulemuste vahel on tingitud vaid kompensatsiooni erinevatest doosidest.

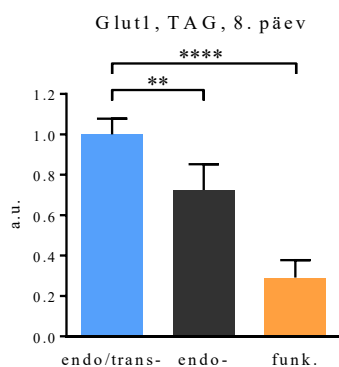
Näiteks võib põhjus, miks metformiin päästis elulemust, kuid *Glut1* üleekspressioon mitte, olla seotud sellega, et katabolismidefekt on ilmselgelt lihaskoespetsiifilisne. *mhcGS*-i poolt suunatud ekspressioon põhjustas selles aspektis identse fenotüübi *tubGS* ekspressioonimustriga. See viitab sellele, et ka *tubGS* kontekstis on peamine ATP vähenemise allikaks defekt lihaskoes. Kuna metformiin suurendab glükoosi transporti Glut4-sõltuvalt ja antud transporter on eriti oluline suhkrute transpordil lihaskoes (Mueckler ja Thorens, 2013), ei pruugi basaalse transpordi suurenemisest antud kontekstis Glut1 kaudu lihtsalt piisata. Igal juhul toetavad nii ATP kui ka metformiini andmed katabolismi defekti seotust just nimelt lihaskoega. Kuna glükoosi transpordi häired selles koes on peamine tüüp II diabeedi patoloogia tunnuseid (Carvalho *et al.*, 2005) näitavad minu katsed üheselt mtDNA stressi võimalikku keskset rolli antud patoloogia väljakujunemisel. Siiski ei saa see efekt olla ainus põhjus, mis seletaks kogu keerukat metabolismi ümberprogrammeerumist (Yalgin *et al.*, parandamisel).



Joonis 3. *tubGS>mtEcoBI* metformiiniga söötmel olnud isaste *Drosophila*'te suremus. Metformiiniga söötmel olnud isaste kärbeste suremus kontsentratsioonide 0 mM, 5mM ja 20mM juures. Joonisel on välja toodud iga tüve kohta eraldi graafik.



Joonis 4. *tubGS>mtEcoBI, Glut1* üleekspressiooni tüve suremus.



Joonis 5. *tubGS>mtEcoBI, Glut1* TAG-ide tase 8-ndal päeval. $p < 0,01(**)$, $p < 0,0001(****)$.

2.3.3 Sarah geeni *knock-down* ei mõjuta mtDNA topoloogiat ega ATP langust, kuid sureb keskmiselt 2 päeva varem.

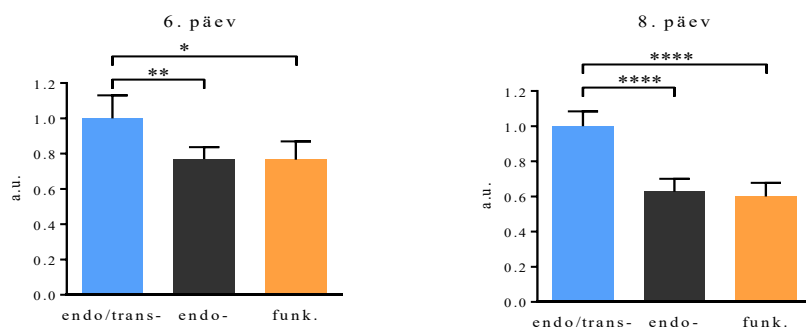
Transkriptoomika analüüs *tubGS>mtEcoBI* tüvedes näitas, et võrreldes kontrolltüvega on oluliselt tõusnud ühe kindla geeni ekspressioon (Tabel 2). Kõnealuseks kõrgelt ekspresseerunud geeniks on *sarah*, mille homoloog inimeses on DSCR1 (*Down syndrome critical region 1*). *Sarah*/DSCR1 üleekspressiooni on seostatud nii Downi sündroomiga, kus ta on oluliselt määral üleeksprimeeritud kui ka Alzheimer-i tõvega (Fuentes *et al.*, 2000; Ermak *et al.*, 2001). Oma funktsioonilt on *sarah* kaltsipressiin, mis inhibeerib Ca^{2+} ja kalmoduliin sõltuvat seriin/treoniin tüüpi valkude fosfataas kaltsineuriini. On näidatud *sarah* valgu lokaliseerumist lisaks tuumale ja tsütoplasmale ka mitokondrisse ning tema olulist rolli mitokondri funktsiooni ja mtDNA taseme säilitamisel (Chang ja Min, 2005). Selleks, et välja selgitada *sarah* roll metabolismis ristasin *sarah* RNAi ekspresseeriva kasseti kokku *tubGS>mtEcoBI* tüvedega (edaspidi *sraKD*). Sarnaselt *tubGS>mtEcoBI* tüvedele (Yalgin *et al.*, parandamisel) toimub ka funk. ja endo-

sraKD tüvede puhul ATP langus (joonis 6) ja kiire suremine (joonis 7). *sraKD* ei põhjusta aga veelgi suuremat ATP langust, kui seda *tubGS>mtEcoBI*-s, millest järeldub, et *sarah* osaleb muudes funktsioonides, kui seda on ATP taseme reguleerimine.

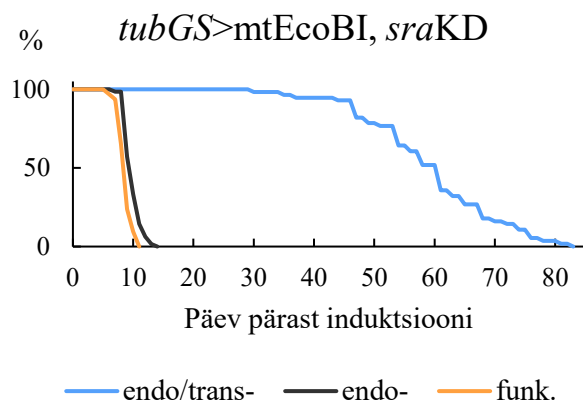
Kuna ATP vähenemine ei pruugi olla suremise põhjus, uurisime kas *sraKD* mõjutab näiteks mtDNA topoloogiat *mtEcoBI* kontekstis. Nagu tööühma andmetest näha võib, on *mtEcoBI* poolt põhjustatud mtDNA struktuuri degradatsioon piisavalt minimaalne, et mitte mõjutada hingamisahelat (Yalgin *et al.*, *parandamisel*). Kuna *sra* üleekspressioon on vastus *mtEcoBI* poolt indutseeritud mtDNA stressile, on võimalik *sarah* mtDNA-d kaitsev efekt, mis limiteerib *mtEcoBI* mõju mtDNA-le. Sellisel juhul oleks *sraKD* korral märgatav tugevam efekt mtDNA struktuurile ja topoloogiale. Selle kontrolliks vaatasin *sraKD* mõju mtDNA topoloogiale läbi Southern blot analüüsi (joonis 8). MtDNA analüüsimiseks kasutasin nii lõikamata mtDNA-d kui ka restriksiooniensüümide BsrGI ja NdeI-ga lõigatud mtDNA-d. MtDNA fragmenteeritus oli mõjutatud vaid funktsionaalses tüves, eriti mTTF/mTERF5-i seondumissaitidel, kuhu *mtEcoBI* suurema osa oma lõigetest teeb tänu eelpool mainitud suurenenud aktiivsusele kohates translokatsioonil valk-DNA interaktsioone. Joonisel on nooltega näidatud osad *mtEcoBI* poolt põhjustatud tugevamad lõikekohad, mis korreleeruvad mTTF/mTERF5 seostumiskohtadega. Samas on üldine mtDNA fragmenteeritus analoogselt *tubGS>mtEcoBI* tüvedega limiteeritud (Yalgin *et al.*, joonis 2B), mistõttu saab väita, et *sraKD* ei põhjusta mtDNA oluliselt suuremat fragmenteerumist *tubGS>mtEcoBI* kontekstis.

Tabel 2. Transkriptoomika andmed *sarah* geeni kohta.

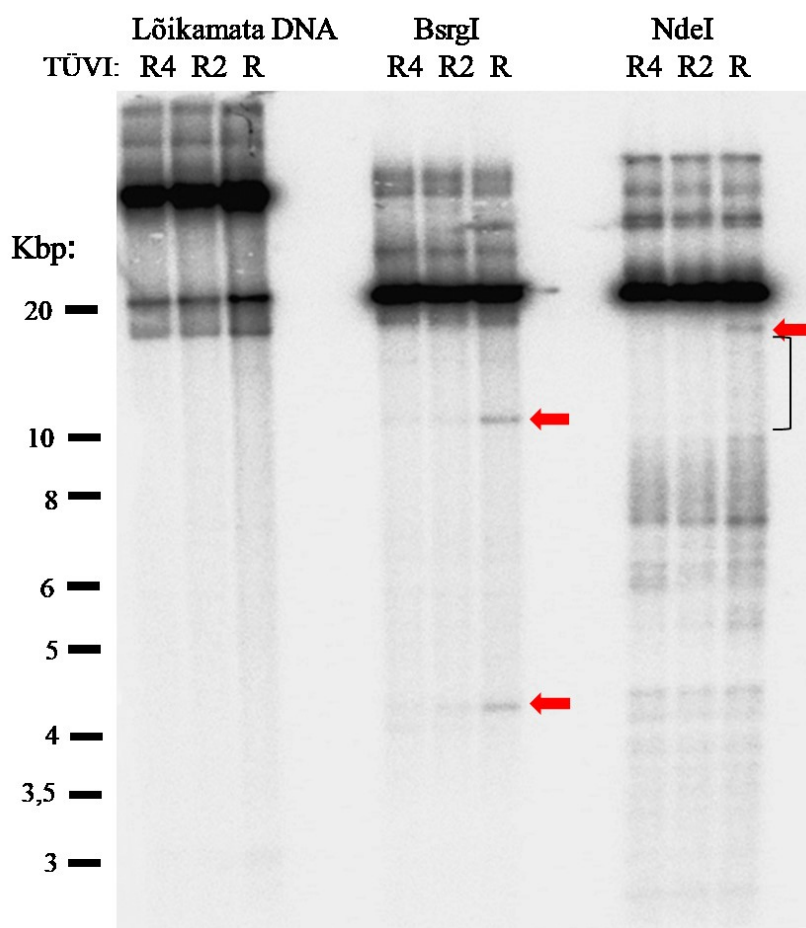
	Ekspressiooni erinevus kordades	Standardviga	Wald testi p-väärtus
R4 vs. R	20,25	0.28	$3.25 \cdot 10^{-54}$
R4 vs. R2	11	0.27	$6.63 \cdot 10^{-39}$



Joonis 6. *sraKD* ATP tasemed. Joonisel on kujutatud *sraKD* ATP tasemed 6-ndal ja 8-ndal päeval. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****).



Joonis 7. *sraKD* tüve suremus.



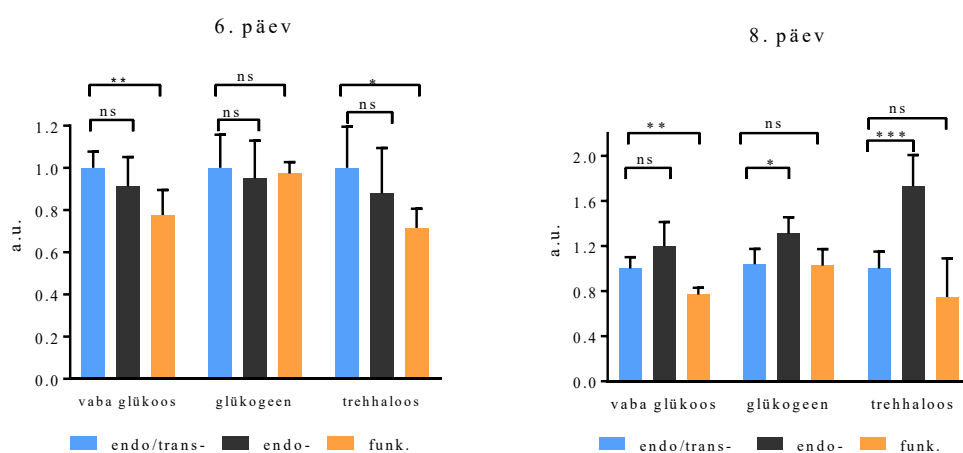
Joonis 8. mtDNA topoloogia mtEcoBI *sraKD* tüves. Joonisel on kujutatud Southern blottimisel saadud tulemust *sraKD* mtDNA kohta viiendal päeval. Välja on toodud lõikamata mtDNA ning BsrGI ja NdeI restriksiooniensüümidega lineariseeritud mtDNA. Punased nooled tähistavad lõikamist mTTF/mTERF5 seostumissaitidelt. Nurksulg hõlmab üht mtEcoBI poolt tekitatavat degradatsiooniproduktide grupeeringut. R4: endo/trans-, R2: endo-, R: funk.

2.3.4 *sarah* KD blokeerib TAG-de tarbimise mtEcoBI kontekstis.

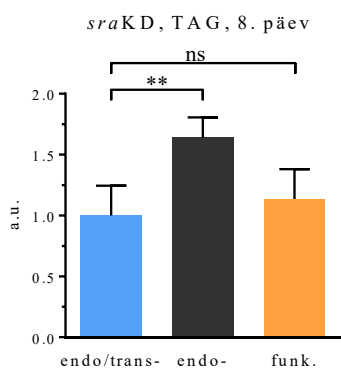
Selleks, et näha kuidas *sarah* üleekspressioon mõjutab rasvade tarbimist mõõdeti *knock-down* tüves süsivesikute ning TAG-ide kasutamist. Sarnaselt *tubGS*>mtEcoBI ei ole ka *sraKD* tüves märgata süsivesikute varude vähenemist (joonis 9). Kuna glükogeen on lisaks TAG-idele teine *Drosophila* rasvkehas hoitav varuaine (Arrese ja Soulages, 2010), on just selle mittekasutamine kinnitus süsivesikute kasutamise blokeerimisest. Glükoosi osaline vähenemine 6-ndal ja 8-ndal ning trehhaloosi vähenemine 8-ndal päeval võib viidata osalisele intratsellulaarsele süsivesikute varude kasutamisele, kuna tervete kärbest analüüsimisel segunevad nende homogeniseerimisel rakusisesed ja -välised suhkrud. Glükogeeni, mida rasvkehas hoitakse peaks aga enne selle kasutamist lagundama ja transportima glükoosi kasutatavate kudede rakkudesse. Selline tulemus, kus glükogeeni pole kasutatud, viitab sellele, et endiselt esineb probleem süsivesikute

kasutamisel, mis on tõenäoliselt seotud just rakku transportimisega, nagu oleme seda kirjeldanud *mtEcoBI* puhul ilma *sraKD*-ta. Kuid vastupidiselt *tubGS>mtEcoBI*-le, ei ole *sarah knock-down* tüves toimunud TAG-ide kasutamist (joonis 10).

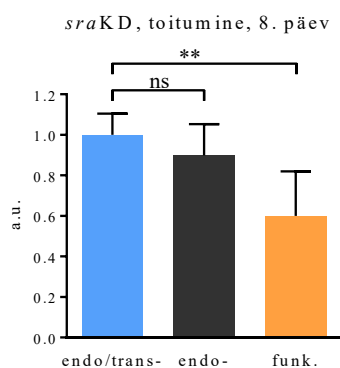
Nagu ka *tubGS>mtEcoBI* puhul, oli toitumisaktiivsus enne suremise algust vähenenud (joonis 11). Kuna toitumisaktiivsuse langus oli seotud aromaatsete aminohapetest toodetavate neurotransmitterite vähenemisega viitab see *sraKD* efekti spetsiifilisusele TAG-ide katabolismil. See aga rõhutab TAG-ide organismisisese tarbimise inhibitsiooni efektiivsust, kuna isegi langenud toitumise korral ei utiliseerita rasvavarusi isegi mitte piiratud ulatuses, nagu muidu näljatingimustes toimub.



Joonis 9. *sraKD* süsivesikute tasemed. Joonisel on kujutatud *sraKD* süsivesikute: vaba glükoosi, glükogeeni ning trehhaloos tasemeid, 6-ndal ja 8-ndal päeval. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), ns – (not significant) – statistiliselt mitte oluline tulemus.



Joonis 10. *sraKD* TAG-ide tase 8-ndal päeval. $p < 0,01$ (**), n.s. – (not significant) - statistiliselt mitte oluline tulemus.

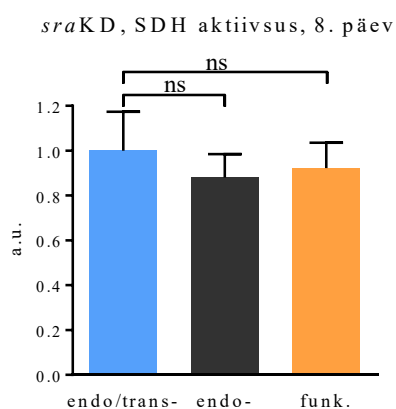


Joonis 11. *sraKD* toitumisaktiivsus. Joonisel on näidatud *sraKD* toitumisaktiivsust 6-ndal päeval 8-ndal päeval. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), ns – (*not significant*) – statistiliselt mitte oluline tulemus.

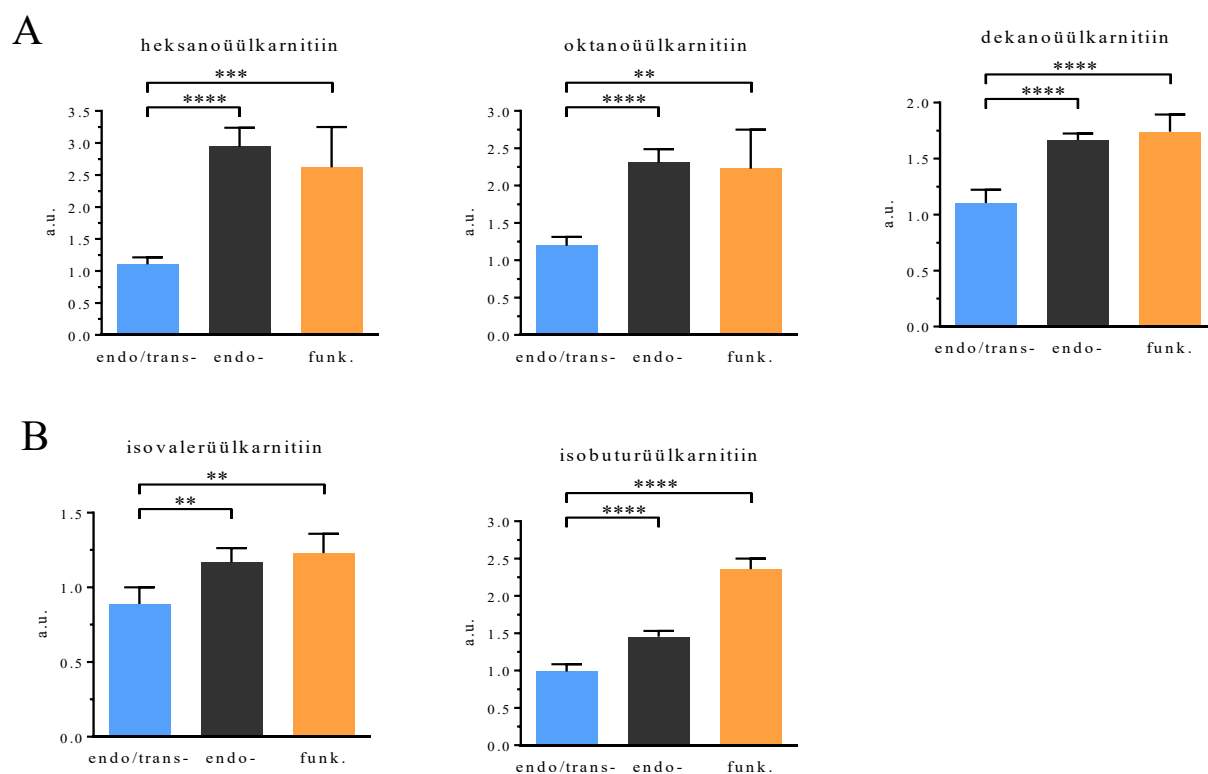
2.3.5 TAG-ide tarbimise inhibitsiooniga kaasneb hargnenud ahelaga aminohapete (BCAA-de) katabolismi defekt.

Kuna *sraKD* mõjutab TAG-ide tarbimist, tekkis küsimus, kas probleem võiks olla põhjustatud inhibeeritud elektronide sisenemisel hingamisahelasse läbi kompleks II ehk SDH-i. Antud kompleksi kaudu sisenevad hingamisahelasse elektronid $FADH_2$ -lt, mis on lipiidide katabolismil redutseeritav elektronide kandja. Selle kontrolliks mõõtsin SDH aktiivsust 8-ndal päeval (joonis 12). Kuna 8-ndaks päevaks ei olnud antud kompleksi aktiivsuses muutusi võin järeldada, et hingamisahela see osa töötab normaalselt.

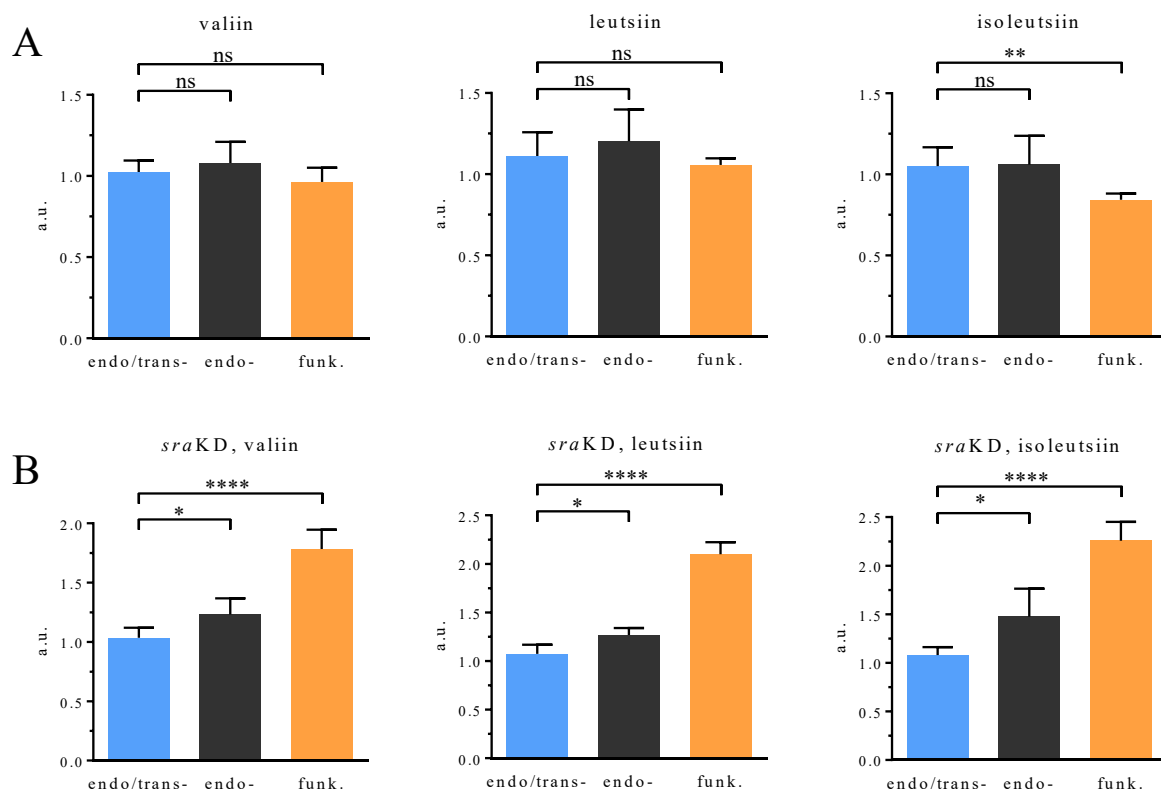
Ootuspäraselt näitasid metabooloomika andmed, et võrreldes *tubGS>mtEcoBI*-ga, on karnitiinid kuhjunud *sraKD* tüves (joonis 13). Need vaheühendid tekivad rasvhapete katabolismil ning nende kuhjumine viitab defektile nende oksüdatsioonil. Lisaks 6, 8 ja 10 süsinikuga karnitiinidele (joonis 13A) täheldasin ka isovalerüül- ja isobutürüülkarnitiinide taseme tõusu (joonis 13B). Need karnitiinid on vaheühendid hargnenud ahelaga aminohapete (BCAA, ingl *branch chain amino acids*) katabolismil, mistõttu on alust arvata BCAA-de lagundamise defekti. Selleks vaatlesin ka nende aminohapete (leutsiin, isoleutsiin, valiin) taset nii *tubGS>mtEcoBI* (joonis 14A) kui ka *sraKD* tüvedes (joonis 14B). Nagu antud jooniselt näha, on BCAA-de tase sisuliselt muutumatu ilma *sraKD*-ta, kuid tõusnud oluliselt *sraKD* puhul *mtEcoBI* kontekstis. See annab aluse oletada sarah valgu osalemist lisaks TAG-ide katabolismile ka BCAA-de katabolismis.



Joonis 12. *sraKD*, SDH aktiivsus 8-ndal päeval. ns – (*not significant*) – statistiliselt mitte oluline tulemus.



Joonis 13. *sraKD* tüve karnitiinide tasemed 6-ndal päeval. $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).



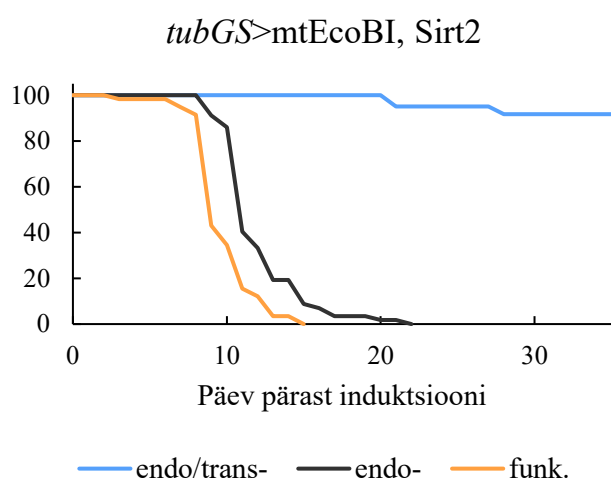
Joonis 14. Hargnenud ahelaga aminohapete tasemed *tubGS>mtEcoBI* tüves 6-ndal päeval (A) ning vastavad tasemed *sraKD* tüves 6-ndal päeval (B). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), ns – (not significant) – statistiliselt mitte oluline tulemus.

2.3.6 SIRT3/Sirt2 üleekspressioon ei päästa elulemust

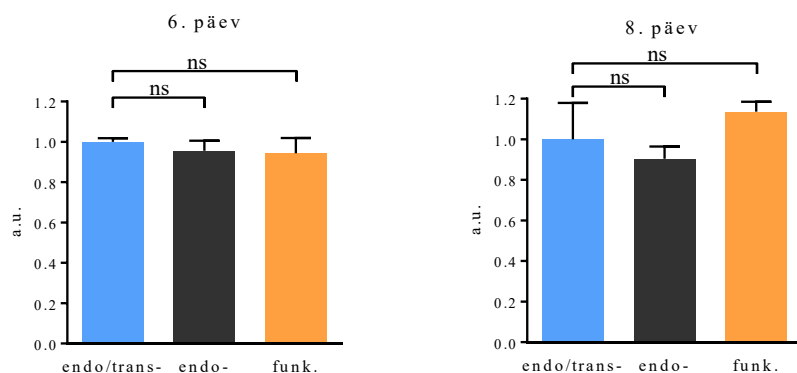
Rasvhapete ning BCAA-de katabolismi radades osaleb kaks ensüümi, mis on jagatud mõlema raja vahel: AcCoA dehüdrogenaas(id) ning enoüül-CoA hüdrataas (ECHS1). Kui AcCoA dehüdrogenaase on mitmeid erinevaid isovorme (näiteks erineva pikkusega rasvhapete katalüüsiks ja BCAA-de lagundamiseks), siis teise ja kolmanda süsiniku vahelise kaksiksideme hüdreerimise eest AcCoA-des vastutab vaid üks ensüüm, ECHS1. Seega on ECHS1 universaalne ensüüm, mis osaleb mõlemas katabolismi rajas ja on seega n-õ ristteeks rasvhapete ja BCAA-de lagundamisel (Zhang *et al.*, 2017). Kuna *sraKD* tüve puhul esineb efekt nii BCAA-de lagundamisel kui ka TAG-ide kasutamisel, siis tõenäoliselt võib olla tegemist defektiga just ensüümi ECHS1 aktiivsuses. Nagu väga paljude teiste metaboolsete ensüümide puhul, on ka selle ensüümi aktiivsus reguleeritud atsetülatsiooni poolt. Enamasti, kuid mitte alati, on atsetülatsiooni näol tegemist inhibitoorse modifikatsiooniga, s.t. atsetüleeritud valgud on kas inaktiivsed või suunatakse elimineerimisele. Analooogne mehhanism toimib ka ECHS1

aktiivsuse reguleerimises inimese rakkudes, kus selle valgu atsetülatsiooni reguleerib mitokondriaalne sirtuiin SIRT3 (Zhang, 2017), mille homoloog *Drosophila*s on Sirt2 (Rahman *et al.*, 2014). Kontroll käib kas otseselt valgu inaktiveerimise kaudu või mitokondrist välja suunamise ja ubikviniülatsiooni kaudu toimuva degradatsiooni vahendusel. Seega põhjustab SIRT3 aktiivsuse langus inimestes nii rasvhapete kui ka BCAA-de katabolismi defekti, kuna liigselt atsetüleeritud ECHS1 elimineeritakse mitokondrist (Zhang *et al.*, 2017). Lisaks sellele võib SIRT3-e aktiivsuse langus seletada ka glükoosi tarbimise defekti. Nimelt on teada, et glükolüüsi esimest etappi katalüüsiv heksokinaasi aktiivsus on reguleeritud assotsiatsiooni kaudu mitokondriga. Selle ensüümi ülesandeks on fosforüleerida glükoos glükoos-6-fosfaadiks, mis ei ole substraat Glut transporteritele. Seeläbi tagatakse glükoosi kontsentratsiooni pidev „vähendamine“ raku sees, mis vastasel juhul hakkaks pärssima vahendatud difusiooni mehhanismi alusel toimuvat glükoosi transporti. Heksokinaas vajab oma aktiivsuseks ATP-d ning arvatakse, et kontakt mitokondri välismembraaniga läbi VDAC-i tagab talle pideva ja küllaldase mitokondri poolt sünteesitava ATP varu. Hiires on näidatud, et seda kontakti reguleerib mitokondriaalne sirtuiin SIRT3, mis deatsetüleerib VDAC-i ja võimaldab seeläbi heksokinaasi seostumist mitokondriga. SIRT3 *knock-out* hiires see assotsiatsioon kaob ning tekkiv glükoosi transpordi/omastamise defekt on ülimalt sarnane diabeedi patofüsioloogiaga (Lantier, 2015). Seepärast kaalusin võimalust, et mtEcoBI poolt tekitatav mtDNA stress võib olla seotud mitokondriaalse sirtuiini defektiga, mille puhul *sra* üleekspressioon päästab rasvhapete katabolismi. Hüpoteesi kontrollimiseks ristasin SIRT3 *Drosophila* homoloogi Sirt2 üleekspressiooni kasseti *tubGS>mtEcoBI* tüvedesse. Siiski ei põhjustanud selline geneetiline manipulatsioon eluea märkimisväärtset pikenemist (joonis 15). Samuti tuleb mainida, et ei olnud näha imetajate rakkudes ECHS1 inaktiivsusega kaasnevat mTORC1 aktivatsiooni, kui jälgisime tema substraadi S6K fosforülatsiooni taset (joonis 16). Siin peab muidugi rõhutama, et fosforüleeritud valgu koguse kvantifitseerimise aluseks oli pan-S6K antikehade puudumisel Ponceau S-ga värvitud totaalne valk, mis ei peegelda võimalikke spetsiifilisi S6K valgukoguse muutusi ja võib seetõttu anda ebaadekvaatseid tulemusi. Kuna *sraKD* tüvedes oli juba neli transgeeni, ei saanud me tänu ristamisskeemi komplitseeritusele otseselt kontrollida Sirt2 üleekspressiooni efekti BCAA-de ja rasvhapete katabolismile *sraKD* tüvedes. Igal juhul ei päästa Sirt2 üleekspressioon mtEcoBI poolt põhjustatud metaboolset defekti ega ka mitte letaalsust, kuigi ta võib mängida rolli spetsiifiliselt rasvade tarbimise ja BCAA-de katabolismi blokeerimisel läbi ECHS1. Hetkel pole ka lõpuni selge, milline sirtuiin on kindlalt mitokondriaalne sirtuiin *Drosophila*s. Sirt2 atsetüloomis on hulgaliselt mitokondri maatriksi valke, tal on suurim homoloogia SIRT3-ga, kuid pole suudetud näidata tema lokaliseerimist mitokondrisse (Rahman *et al.*, 2014). Hiljutised andmed näitavad kindlat Sirt4

lokalisatsiooni mitokondrisse ja tema KD tüve fenotüüp on väga sarnane mtEcoBI poolt põhjustatud muutustega, kuid samas ei ole tuvastatud atsetülatsiooni mustri muutusi vastusena Sirt4 üle- ja alaekspressioonile (Wood *et al.*, 2018). Seega jääb hetkel lahtiseks, kas mtEcoBI poolt põhjustatud mtDNA stress mõjutab globaalset katabolismi läbi sirtuiinide/atsetülatsiooni ja kui, siis milline *Drosophila* sirtuiinidest sellega täpselt tegeleb. Lisaks sellele ei ole meil lõplikku vastust sarah valgu mehhanismi kohta mtDNA stressi kontekstis. Tema vaieldamatu roll TAG-ide tarbimise regulatsioonis on üllatav, kuna enamasti neuraalkoes funktsioneeriva fosfaasi kaltsineuriini inhibiitorina on teda uuritud eelkõige mälu ja käitumise kontekstis. On küll täheldatud tema homoloogi, DSCR1 rolli katabolismi muutmisel, kuid see on vastupidine minu andmetele ehk krooniline DSCR1 üleekspressioon nihutab katabolismi glükolüüsi suunas (Ermak *et al.*, 2012). Kuid võttes arvesse tema assotsiatsiooni mitmete kaasasündinud ja degeneratiivsete neuraalkoe patoloogiatega nagu Downi sündroom ja Alzheimeri tõbi, on minu poolt kirjeldatud seos mtDNA stressi ja selle valgu vahel potentsiaalne uute ühenduste avastamisel mitokondri ja nende haiguste vahel, mis kunagi võivad loodetavasti viia uute ravimeetodite väljatöötamisele.



Joonis 15. *tubGS>mtEcoBI* suremus Sirt2 üleekspressiooni tüves.



Joonis 16. *sraKD* pS6K tasemed 6-ndal ja 8-ndal päeval.

KOKKUVÕTE

Mitokondrite üheks peamiseks rolliks peetakse ATP tootmist oksüdatiivse fosforüleerimise teel. Lisaks sellele on mitokondril teadaolevalt ka palju muid olulisi funktsioone. Varem arvati, et mtDNA defektidest tingitud patoloogiad on põhjustatud ainult defekts hingamisahelas, mis viib ROS-ide üleproduktioonile ning ATP vähenemisele. Kuid ühe rohkem on kirjeldatud haigusi ning haiguste mudeleid laboratoorsetes organismides, kus hingamisahel on intaktne ning mainitud metaboliitide tasemed normaalsed. Seega mitokondri defektidest tingitud muutused võivad avalduda ka muudel viisidel.

Käesolevas magistritöös uurisin seoseid mitokondriaalse stressi ja metaboolsete defektide vahel *Drosophila* mudelsüsteemis. Suhkrute omastamise defektist tingitud fenotüübi muutusi uuriti *tubGS>mtEcoBI* ekspressiooni korral. Suur osa tööst baseerus aga transkriptoomika andmete põhjal üleekspresseerunud valgu sarah rolli selgitamisele metabolismis.

Töö alguses näidati ATP mõõtmisega seda, et üldise *mtEcoBI* ekspressiooni tekitatud metaboolne jäikus on suuresti lihaskoe spetsiifiline. *tubGS>mtEcoBI* elulemuse katse metformiini sisaldaval söötmel kinnitab, et toitainete omastamise efekt on vähemasti osaliselt seotud glükoosi transpordiga rakku ja seda eriti just lihaskoes. Kuna diabeet II on põhjustatud eelkõige suhkrute transpordi defektist läbi insuliin-sõltuva mehhanismi lihaskoes, rõhutab see mtDNA stabiilsuse varem kirjeldamata rolli selle haiguse kujunemisel.

Sarah valgul ei olnud näha rolli mtDNA topoloogia reguleerimisel, elulemusel või ATP taseme muutustel, kuid on teatud määral oluline metabolismi reguleerimisel. Võrreldes *tubGS>mtEcoBI* tüvega oli *sraKD* tüves endiselt defekt suhkrute utiliseerimisel, kuid huvitaval kombel oli blokeerunud ka rasvade katabolisatsioon. Karnitiinide ja hargnenud ahelaga aminohapete ning nende vaheühendite kuhjumine *sraKD* tüvedes annab alust oletada defekti ECHS1 ensüümis. Selle ensüümi poolt katalüüsitud reaktsioon on vajalik nii hargnenud ahelaga aminohapete kui ka rasvade katabolisatsioonil (Zhang *et al.*, 2017). Kuna seda ensüümi reguleerib imetajates SIRT3, testisin selle *Drosophila* homoloogi Sirt2 üleekspressiooni mõju *mtEcoBI* stressile. Hoolimata sellest, et mitokondriaalse sirtuiini defekt seletaks ka glükoosi internalisatsiooni inhibitsiooni, ei päästnud Sirt2 üleekspressioon *tubGS>mtEcoBI* letaalset efekti. Küll ei saa aga kindel olla, et Sirt2 on *Drosophilas* ainuke mitokondriaalne sirtuiin, mis reguleerib ECHS1 ensüümi. Seega on tööühmal plaan kontrollida antud kontekstis ka Sirt4 kui hiljuti kirjeldatud mitokondriaalset sirtuiini *Drosophilas* (Wood *et al.*, 2018) mõju *mtEcoBI* poolt põhjustatud efektile.

Käesoleva töö andmetest on näha, et mtEcoBI poolt põhjustatud metaboolne reprogrammeerimine on vähemalt osaliselt seotud suhkrute transpordiga ja seda eriti lihaskoes. Rasvavarude kiire kadumine on ühe süsivesikute utiliseerimise inhibitsiooni tulemus, kuid selle muudab võimalikuks *tubGS*>mtEcoBI kontekstis just sarah valgu üleekspressioon. Seega põhjustab süsteemne mtEcoBI ekspressioon tegelikult mõlema süsinikuallika kasutamise blokki. Mis on mtDNA stressi poolt põhjustatud sellise fenomeni bioloogiline roll, on hetkel ebaselge ning töögrupp jätkab mehhanismi väljaselgitamiseks vajalikku tööd.

MtDNA stress response limits the use of carbon sources of catabolism in

Drosophila melanogaster

Liina Ots

SUMMARY

One of the main roles of mitochondria is thought to be ATP production via oxidative phosphorylation. In addition to that mitochondria are also known to perform many other functions. Previously it was thought that mitochondrial defects can cause pathologies due to overproduction of ROS and ATP depletion. However, there is an amounting evidence that mtDNA instability can cause metabolic reprogramming without any discernible effects on respiratory chain. Thus, mitochondrial defects can cause a wide variety of metabolic rearrangements that are not directly connected to respiratory chain dysfunction.

This master thesis investigated the relationship between mtDNA stress and metabolic defects in *Drosophila* model system. A transgenic system targeting bacterial Type I endonuclease to mitochondrial matrix was employed to induce mtDNA stress. Effects of this type of mtDNA stress on carbohydrate metabolism in ubiquitous (using *tubGS* driver) and muscle-specific (using *mhcGS* driver) expression pattern were investigated. ATP levels became largely similarly depleted both in case of *tubGS* and *mhcGS* drivers, demonstrating that effects on muscle tissue is the probable cause of total ATP depletion. Moreover, metformin that facilitates glucose uptake in muscle was able to partially alleviate the lethal effect of mtEcoBI expression. This demonstrates, that the metabolic rearrangements were at least partially caused by inhibition of glucose uptake in muscle tissues. A substantial part of this work was dedicated to analyze the effects of sarah protein, which overexpression were seen in transcriptomic analysis. The role of sarah in metabolic changes induced by mtEcoBI sm were examined with genetical manipulation of *sraKD* RNA levels.

It did not affect mtDNA integrity, early lethality or ATP depletion. Instead it was demonstrated that it had a role in utilization of lipids in the context of mtEcoBI-induced stress. Namely, while *sraKD* did not alleviate the defect in carbohydrate utilization, it did block the consumption of lipid stores, along with accumulation of several carnitine species. Interestingly, some of these carnitines were intermediates of branched-chain amino acid (BCAA) catabolism. Enoyl-CoA-hydratase (ECHS1) is commonly shared between both fatty acid and BCAA catabolic pathways (Zhang *et al.*, 2017). This enzyme is known to be regulated in mammals by SIRT3 enzyme, which is also known to regulate the internalization of glucose via controlling the contact between hexokinase and voltage-dependent anion channel (VDAC). Therefore we tested if

overexpression of Sirt2, which is the homologue of SIRT3 in *Drosophila*, is able to rescue the effects of mtEcoBI. However, this was found not to be the case. Currently it is unclear, which one of the several *Drosophila* sirtuins is the true mitochondrial sirtuin and work continues on testing other mitochondrial sirtuin candidates for rescuing effect.

In this master thesis it is shown that mtDNA stress induced by mtEcoBI limits the utilizations of catabolic carbon sources and sarah upregulation is a stress response aimed at rescuing the lipid utilization. As above-mentioned results do not exhaustively explain the pathway that connects mtDNA stress to metabolic reprogramming, work continues on the mechanism and biological rationale of this phenomenon.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat Priit Jõersi, kes võimaldas mul enda magistritööd teha sellisel huvitaval teemal ja kelle suurepärase juhendamise all töö valmis. Lisaks tahan ka tänada Molekulaarbioloogia ja Biokeemia labori inimesi meeldiva ja sõbraliku õhkkonna eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Acosta-Jaquez, H. A., Keller, J. A., Foster, K. G., Ekim, B., Soliman, G. A., Feener, E. P., Ballif, B. A ja Fingar, D. C. (2009). Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Molecular and cellular biology*, 29(15), 4308-4324.
- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, M. ja Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic acids research*, 31(6), 1640-1645.
- Apel, K., ja Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, 55, 207-225.
- Ashburner, M., Golic, K. G., ja Hawley, R. S. (2005) *Drosophila: a laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Atamna, H. (2004). Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. *Ageing research reviews*, 3(3), 303-318.
- Baker, B. M., Nargund, A. M., Sun, T., ja Haynes, C. M. (2012). Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2 α kinase GCN-2. *PLoS genetics*, 8(6), e1002760.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., ... ja Mootha, V. K. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 341.
- Bevan, P. (2001). Insulin signalling. *Journal of cell science*, 114(8), 1429-1430.
- Bogenhagen, D. F., Rousseau, D., ja Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), 3665-3675.
- Brand, A. H., ja Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *development*, 118(2), 401-415.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J., ja Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, 142, w13659.
- Carvalho, E., Kotani, K., Peroni, O. D., ja Kahn, B. B. (2005). Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289(4), E551-E561.
- Chang, K. T., & Min, K. T. (2005). *Drosophila melanogaster* homolog of Down syndrome critical region 1 is critical for mitochondrial function. *Nature neuroscience*, 8(11), 1577.
- Chen, H., ja Chan, D. C. (2009). Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Human molecular genetics*, 18(R2), R169-R176.

- D'Erchia, A. M., Atlante, A., Gadaleta, G., ... ja Pesole, A. (2015). Tissue-specific mtDNA abundance from exome data and its correlation with mitochondrial transcription, mass and respiratory activity. *Mitochondrion*, 20, 13-21.
- Ermak, G., Morgan, T. E., & Davies, K. J. (2001). Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38787-38794.
- Ermak, G., Sojitra, S., Yin, F., Cadenas, E., Cuervo, A. M., ja Davies, K. J. (2012). Chronic expression of RCAN1-1L protein induces mitochondrial autophagy and metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 14088-14098.
- Fernandez-Marcos, P. J., ja Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis-. *The American journal of clinical nutrition*, 93(4), 884S-890S.
- Fuentes, J. J., Genescà, L., Kingsbury, T. J., Cunningham, K. W., Pérez-Riba, M., Estivill, X., & Luna, S. D. L. (2000). DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human molecular genetics*, 9(11), 1681-1690.
- Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., ja Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a011080.
- Gincel, D., Hilal, Z. A. I. D., ja SHOSHAN-BARMATZ, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal*, 358(1), 147-155.
- Gleyzer, N., Vercauteren, K., ja Scarpulla, R. C. (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and cellular biology*, 25(4), 1354-1366.
- Goodpaster, B. H., ja Sparks, L. M. (2017). Metabolic flexibility in health and disease. *Cell metabolism*, 25(5), 1027-1036.
- Guda, P., Guda, C., ja Subramaniam, S. (2007). Reconstruction of pathways associated with amino acid metabolism in human mitochondria. *Genomics, proteomics ja bioinformatics*, 5(3), 166-176.
- Haus, J. M., Kashyap, S. R., Kasumov, T., Zhang, R., Kelly, K. R., DeFronzo, R. A., ja Kirwan, J. P. (2009). Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*, 58(2), 337-343.
- Hodge, T., ja Colombini, M. (1997). Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *The Journal of membrane biology*, 157(3), 271-279.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., ja Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4), 225.
- Huang, X., Zhai, D., ja Huang, Y. (2000). Study on the relationship between calcium-induced calcium release from mitochondria and PTP opening. *Molecular and cellular biochemistry*, 213(1-2), 29-35.

- Iborra, F. J., Kimura, H., ja Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology*, 2(1), 9.
- Inoki, K., Kim, J., ja Guan, K. L. (2012). AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 381-400.
- Jheng, H. F., Tsai, P. J., Guo, S. M., Kuo, L. H., Chang, C. S., Su, I. J., Chang, C. R. ja Tsai, Y. S. (2012). Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Molecular and cellular biology*, 32(2), 309-319.
- Jiang, X., Jiang, H., Shen, Z. ja Wang, X. (2014). Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), 14782-14787.
- Jing, E., O'Neill, B. T., Rardin, M. J., ... Kahn, C. R. (2013). Sirt3 regulates metabolic flexibility of skeletal muscle through reversible enzymatic deacetylation. *Diabetes*, 62(10), 3404-3417.
- Khan, N. A., Nikkanen, J., Yatsuga, S., Jackson, C., Wang, L., Pradhan, S., Kivelä, R., Pessia, A., Velagapudi, V. ja Suomalainen, A. (2017). mTORC1 regulates mitochondrial integrated stress response and mitochondrial myopathy progression. *Cell metabolism*, 26(2), 419-428.
- Kita, Y., Takamura, T., Misu, H., ... Kaneko, S. (2012). Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *PloS one*, 7(9), e43056.
- Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., ... Muoio, D. M (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell metabolism*, 7(1), 45-56.
- Krssak, M., Brehm, A., Bernroider, E., ... Roden, M. (2004). Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(12), 3048-3056.
- Kucej, M., ja Butow, R. A. (2007). Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends in cell biology*, 17(12), 586-592.
- Lallukka, S., ja Yki-Järvinen, H. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Practice ja Research Clinical Endocrinology ja Metabolism*, 30(3), 385-395.
- Lewis, S. C., Uchiyama, L. F., ja Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*, 353(6296), aaf5549.
- Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L., ... Schwer, B. (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and cellular biology*, 27(24), 8807-8814.
- Mammucari, C., Gherardi, G., Zamparo, I., ... Rosario, R. (2015). The mitochondrial calcium uniporter controls skeletal muscle trophism in vivo. *Cell reports*, 10(8), 1269-1279.
- McBride, H. M., Neuspiel, M., ja Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology*, 16(14), R551-R560.
- Miller, W. L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and cellular endocrinology*, 379(1-2), 62-73.

- Mueckler, M., ja Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3), 121-138.
- Ngo, H. B., Kaiser, J. T., ja Chan, D. C. (2011). The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(11), 1290.
- Niccoli, T., Cabecinha, M., Tillmann, A., ... Partridge, L. (2016). Increased glucose transport into neurons rescues A β toxicity in *Drosophila*. *Current Biology*, 26(17), 2291-2300.
- Ono, T., Isobe, K., Nakada, K., ja Hayashi, J. I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nature genetics*, 28(3), 272.
- Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H., ja Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12596-12601.
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., ... Finkel, T. (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature cell biology*, 15(12), 1464.
- Park, J., Chen, Y., Tishkoff, D. X., ... Zhao, Y. (2013). SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Molecular cell*, 50(6), 919-930.
- Pohjoismäki, J. L., Wanrooij, S., Hyvärinen, A. K., Goffart, S., Holt, I. J., Spelbrink, J. N., ja Jacobs, H. T. (2006). Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Nucleic acids research*, 34(20), 5815-5828.
- Powell, D. J., Turban, S., Alexander, G. R. A. Y., Hajduch, E., ja Hundal, H. S. (2004). Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C ζ activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochemical Journal*, 382(2), 619-629.
- Prokop, A. (2013). A rough guide to *Drosophila* mating schemes. *J. Roote ja A. Prokop (Eds.) G*, 3, 353-358.
- Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A., ja Brand, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27255-27264.
- Quirós, P. M., Mottis, A., ja Auwerx, J. (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(4), 213.
- Rahman, M., Nirala, N. K., Singh, A., ... Acharya, U. R. (2014). *Drosophila* Sirt2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase β and regulates complex V activity. *J Cell Biol*, jcb-201404118.
- Renard, P., Michel, S., Rommelaere, G., ja Arnould, T. (2012) Mammalian mitochondrial genetics, genomics and turnover. *Cellular Bioenergetics in Health and Diseases: New Perspectives in Mitochondrial Biology*. 1-83.

- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., ja Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(9), 566.
- Rodenburg, R. J. (2011). Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(2), 283-292.
- Rudolf, R., Mongillo, M., Magalhães, P. J., ja Pozzan, T. (2004). In vivo monitoring of Ca²⁺ uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. *The Journal of cell biology*, 166(4), 527-536.
- Samuel, V. T., Liu, Z. X., Qu, X., Elder, B. D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A. J. ja Shulman, G. I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32345-32353.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Mîinea, C. P., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. W. ja Lienhard, G. E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14599-14602.
- Santulli, G., Xie, W., Reiken, S. R., ja Marks, A. R. (2015). Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11389-11394.
- Scialo, F., Sriram, A., Stefanatos, R., ja 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.
- Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., ja Agrawal, R. K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 115(1), 97-108.
- Sikalidis, A. K., Lee, J. I., ja Stipanuk, M. H. (2011). Gene expression and integrated stress response in HepG2/C3A cells cultured in amino acid deficient medium. *Amino acids*, 41(1), 159-171.
- Suomalainen, A., ja Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), 77.
- Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., ja Kamata, T. (2000). Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13175-13178.
- Szendroedi, J., Yoshimura, T., Phielix, E., Shulman, G. I. ja Rode, M. (2014). Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26), 9597-9602.
- Taniuchi, S., Miyake, M., Tsugawa, K., Oyadomari, M., ja Oyadomari, S. (2016). Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 α kinases. *Scientific reports*, 6, 32886.
- Taylor, R. W., Pyle, A., Griffin, H., ... Chinnery, P. F. (2014). Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *Jama*, 312(1), 68-77.

- Thrash, J. C., Boyd, A., Huggett, M. J., Grote, J., Carini, P., Yoder, R. J., Robbertse, B., Spatafora, J. W., Rappe, M. S., ja Giovannoni, S. J. (2011). Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade. *Scientific reports*, 1, 13.
- Tilg, H., Moschen, A. R., ja Roden, M. (2017). NAFLD and diabetes mellitus. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(1), 32.
- Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A. T., Dufour, E., Khvorostov, I., Spelbrink, J. N., Wibom, R., Jacobs, H. T. ja Larsson, N. G. (2005). Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 17993-17998.
- Tymoczko, J. L., Berg, J. M., ja Stryer, L. (2011). *Biochemistry: a short course*. Macmillan.
- Tynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Holt, I. J. ja Suomalainen, A. (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Human molecular genetics*, 13(24), 3219-3227.
- Weinberg, S. E., Sena, L. A., ja Chandel, N. S. (2015). Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*, 42(3), 406-417.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(12), 872.
- Wood, J. G., Schwer, B., Wickremesinghe, P. C., ... Helfand, S. L. (2018). Sirt4 is a mitochondrial regulator of metabolism and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201720673.
- Yalgin, C., Järvinen, S., George, J., Naudi, A., Andjelkovic, A., Dufour, E., Bahhir, D., Ots, L., Gerards, M., Parhiala, M., Pamplona, Reinald., Jacobs H. T., Jöers, P. *parandamisel*.
- Yamada, R., Deshpande, S. A., Keebaugh, E. S., Ehrlich, M. R., Soto Obando, A., ja Ja, W. W. (2017). Mifepristone reduces food palatability and affects *Drosophila* feeding and lifespan. *The Journals of Gerontology: Series A*, 72(2), 173-180.
- Yang, L., Long, Q., Liu, J., Tang, H., Li, Y., Bao, F., Qin, D., Pei, D. ja Liu, X. (2015). Mitochondrial fusion provides an 'initial metabolic complementation' controlled by mtDNA. *Cellular and molecular life sciences*, 72(13), 2585-2598.
- Zhang, Y. K., Qu, Y. Y., Lin, Y., ... Wei, X. (2017). Enoyl-CoA hydratase-1 regulates mTOR signaling and apoptosis by sensing nutrients. *Nature communications*, 8(1), 464.
- Zhou, G., Meng, S., Li, Y., Ghebre, Y. T., ja Cooke, J. P. (2016). Optimal ROS signaling is critical for nuclear reprogramming. *Cell reports*, 15(5), 919-925.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., ... Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*, 108(8), 1167-1174.

LISAD

Ristamisskeemid

Ristamisskeemid on koostatud selliselt, et välja on toodud ainult kõnealused kromosoomid (selle töö puhul on esindatud 2. ja 3. kromosoom). 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. Samuti on ristamisel saadud järglaste genotüüpideks märgitud ainult huvipakkunud tulemused. Ristamisel kasutati *balancer* kromosoomi, mille abil selekteeriti välja huvipakkuva geeniga isendid.

Ristamised on tehtud eesmärgiga kokku viia *driver* ja mtEcoBI subühikute geenid

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

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

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

UAS-GLUT1 ekspressioonikasseti ristamise eesmärgiks oli, et eri tüvedes ja kromosoomides olevad geenid tuua kokku ühte tüvesse.

1. kõigepealt ristati omavahel *balancer* kromosoomiga tüved, selleks et need ühte kärbsse tüvesse kokku saada.

$$\frac{+}{CyO}; \frac{+}{+} \times \frac{+}{+}; \frac{+}{Sb} = \frac{+}{CyO}; \frac{+}{Sb}$$

2. Edasi ristati saadud tüved eraldi nii homosügootse *UAS-Glut1* (lühendatud *Glut1* allpool) kui ka *HsdR* geeni isovorme kandvate *Drosophila*'tega.

$$\frac{+}{CyO}; \frac{+}{Sb} \times \frac{Glut1}{Glut1} = \frac{Glut1}{CyO}; \frac{+}{Sb}$$

$$\frac{+}{CyO}; \frac{+}{Sb} \times \frac{HsdRx}{HsdRx} = \frac{+}{CyO}; \frac{HsdRx}{Sb}$$

3. Eelmistest ristamistest pärit kärbsed ristati järgnevalt omavahel, nii *Glut1* kui ka *HsdR* geeni puhul ning valiti välja isendid, kes oleks vastavas kromosoomis oleva geeni suhtes homosügootne ning omaks teises kromosoomis tema *balancer* kromosoomi.

$$\frac{Glut1}{CyO}; \frac{+}{Sb} \times \frac{Glut1}{CyO}; \frac{+}{Sb} = \frac{Glut1}{Glut1}; \frac{+}{Sb}$$

$$\frac{+}{CyO}; \frac{HsdRx}{Sb} \times \frac{+}{CyO}; \frac{HsdRx}{Sb} = \frac{+}{CyO}; \frac{HsdRx}{HsdRx}$$

4. Eelmistest ristamistest pärit isendid ristati omavahel

$$\frac{Glut1}{Glut1}; \frac{+}{Sb} \times \frac{+}{CyO}; \frac{HsdRx}{Rx} = \frac{Glut1}{CyO}; \frac{HsdRx}{Sb}$$

5. Eelmistest ristamistest pärit isendid ristati omavahel

$$\frac{Glut1}{CyO}; \frac{R}{Sb} \times \frac{Glut1}{CyO}; \frac{HsdRx}{Sb} = \frac{Glut1}{Glut1}; \frac{HsdRx}{HsdRx}$$

Sirt2 tüve ristamise eesmärgiks oli eraldi kärbestes olevad *UAS-Sirt2* ja *tubGS*, mis mõlemad asuvad 3-ndas kromosoomis, saada ühte kromosoomi tüves, mis oleks mõlema geeni suhtes homosügootne.

1. Kõigepealt ristati omavahel *UAS-Sirt2* ja *tubGS* tüved. Kuna *balancer* kromosoomi ei olnud, võis toimunud rekombinatsioon mõlemad kassetud kokku tuua ühte kromosoomi. Esimeses põlvkonnas esineb saadud võimalik tulemus vaid iduteerakkudes, kuid mitte somaatilistes rakkudes ja seetõttu tuleb ristamise tulemusena saadud kärbsed omavahel veel ristata et soovitud geenikonstrukti jõuaks ka keharakkudesse ja oleks jälgitav silma värvi muutuse kaudu. Silmas tuleb pidada, et soovitud on tulemus, kus algse ristamisega on iduteerakkudes toimunud homoloogiline rekombinatsioon, mida muidugi kõigis iduteerakkudes toimunud ei ole. Lihtsuse mõttes on *UAS-Sirt2* kassett allpool lühendatud *Sirt2*-ks.

$$\frac{+}{+}; \frac{Sirt2}{Sirt2} \times \frac{+}{+}; \frac{tubGS}{tubGS} = \frac{+}{+}; \frac{Sirt2. tubGS}{+}$$

2. Järgmisena ristati saadud järglasi *balancer* kromosoomiga ning saadud järglastest valiti markergeenide põhjal välja mõned järglased. Markergeenidena on kasutusel nii *Sirt2* kui ka *tubGS* puhul geenikonstruktiga kaasas olev punast silmavärvi määrav geen. Kaks sellist geeni koos annavad sõltuvalt doosiefektist järglaskonnas punasemate silmadega isendid kui juhul, kui esineks vaid 1 markergeeni koopia. Samuti pidi järglaskonnas esinema ka *balancer* kromosoom, mida fenotüüpilise markeri alusel kindlaks sai teha.

$$\frac{+}{+}; \frac{Sirt2. tubGS}{+} \times \frac{+}{Sb} = \frac{+}{+}; \frac{Sirt2. tubGS}{Sb}$$

3. Selleks, et järglaskonda suurendada ristati eelmisest ristamisest saadud isased kärbsed $+/Sb$ emastega ning eraldati punaste silmadega emased ja isasesd.

$$\frac{+}{+}; \frac{Sirt2. tubGS}{+} \times \frac{+}{+}; \frac{+}{Sb} = \frac{+}{+}; \frac{Sirt2. tubGS}{Sb}$$

4. Viimases etapis ristamisel saadud järglased ristati omavahel ning selekteeriti välja *balancer* kromosoomi mitte kandvad isendid, mida siis juba edasiseks tööks kasutada sai.

$$\frac{+}{+}; \frac{Sirt2. tubGS}{Sb} \times \frac{+}{+}; \frac{Sirt2. tubGS}{Sb} = \frac{Sirt2. tubGS}{Sirt2. tubGS}$$

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liina Ots (22.05.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**MtDNA stressivastus limiteerib katabolismi süsinikuallikate kasutamist *Drosophila melanogaster*'is**“, 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 **01.06.2020** 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, 28.05.2018