

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

**Mitokondriaalsest stressist põhjustatud seriini metabolismi muutuste mõju  
epigeneetikale ja post-translatsioonilistele modifikatsioonidele**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Susanna Janno

Juhendaja dotsent Priit Jõers

TARTU 2020

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Mitokondri struktuur ja ATP süntees .....	7
1.2. Mitokondriaalsed haigused.....	9
1.3. Mitokondri ja metabolismi seosed .....	10
1.4. mtDNA ja nukleoidid .....	14
1.5. Meie töögrupi eelneva töö ülevaade .....	15
1.5.1. GAL4-UAS ekspressioonisüsteem.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	20
2.1. Töö eesmärk .....	20
2.2. Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. <i>Drosophila melanogasteri</i> käsitlemine.....	20
2.2.2. RNA eraldamine .....	21
2.2.3. HPLC meetod.....	22
2.2.4. Western blot .....	22
2.2.5. Statistiline analüüs.....	24
2.3. Tulemused .....	24
2.4. Arutelu.....	31
KOKKUVÕTE.....	33
SUMMARY .....	34
TÄNUSÕNAD.....	35
KASUTATUD KIRJANDUS.....	36
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	43
LISAD .....	44
LIHTLITSENTS.....	47

## KASUTATUD LÜHENDID

**2-OG** – 2-oksoglutaraat (ingl.k. *2-oxoglutarate*)

**2-OGDD** – 2-oksoglutaraat sõltuv dioksügenaas (ingl.k. *2-oxoglutarate-dependent dioxygenase*)

**AcCoA** – atsetüülkoensüüm A (ingl.k. *acetyl coenzyme A*)

**ACLY** – ATP-tsitraadi lüaas (ingl.k. *ATP citrate lyase*)

**CPEO** – krooniline progresseeruv väline oftalmopleegia (ingl.k. *chronic progressive external ophthalmoplegia*)

**DEPC** – dietüülpürokarbonaat (ingl.k. *diethyl pyrocarbonate*)

**ECL** – võimendatud kemoluminestsents (ingl.k. *enhanced chemiluminescence*)

**HMG** – (ingl.k. *high-mobility group*)

**HPLC** – kõrgsurvevedelikkromatograafia (ingl.k. *high-performance liquid chromatography*)

**KAT** – lüsiini atsetültransferaas (ingl.k. *lysine acetyltransferase*)

**MELAS** – (ingl.k. *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*)

**MERRF** – (ingl.k. *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*)

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

**mTERF** – mitokondriaalne transkriptsiooni terminatsiooni faktor 1 (ingl.k. *mitochondrial transcription termination factor 1*)

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

**mtTFB2** – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor B2 (ingl.k. *mitochondrial transcription factor B2*)

**OAA** – oksaloatsetaat (ingl.k. *oxaloacetic acid*)

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

**PDH** – püruvaadi dehüdrogenaas (ingl.k. *pyruvate dehydrogenase*)

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

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

**PFK1** – fosfofruktokinaas-1 (ingl.k. *phosphofructokinase-1*)

**PFK2** – 6-fosfofrukto-2-kinaas (ingl.k. *6-phosphofructo-2-kinase*)

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

**SAM** – S-adenosüül metioniin (ingl.k. *S-Adenosyl methionine*)

**SDH** – suktsinaadi dehüdrogenaas (ingl.k. *succinate dehydrogenase*)

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

**TET** – (ingl.k. *ten-eleven translocation*)

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

**THF** – tetrahüdrofolaat (ingl.k. *tetrahydrofolate*)

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

**Mitokondriaalsest stressist põhjustatud seriini metabolismi muutuste mõju  
epigeneetikale ja post-translatsioonilistele modifikatsioonidele**

Bakalaureusetöö

Susanna Janno

**Lühikokkuvõte.** Mitokondriaalse DNA manipuleerimine *in vivo* *Drosophila* mudelorganismis mitokondrisse viidud tüüp I bakteriaalse restriksiooni endonukleaasiga (mtEcoBI) põhjustab mitmesuguseid metabolismi ümberkorraldusi, muu hulgas ka seriini taseme tõusu (Bahhir jt., 2019). See võib omakorda põhjustada epigeneetiliste ning post-translatsiooniliste modifikatsioonide muutusi, kuna seriin on keskseks ühendiks ühesüsinikulises metabolismis, mille kaudu toodetakse metüülrühma peamisi doonoreid. Lõputöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas mitokondriaalsest stressist tulenevad seriini metabolismi muutused mõjutavad kvantitatiivselt ja/või kvalitatiivselt valkude ja RNA metüülatsiooni. Tulemustest selgus, et RNA modifikatsioonide tase oli langenud või jäi samaks. Valkude mono- ja dimetüülatsiooni tulemused olid ebahütlased, kuid histoon 3 lüsiin 4 spetsiifilise trimetüülatsiooni (H3K4me3) puhul oli näha märkimisväärset tõusu tükedes, kus mtEcoBI oli aktiivne.

**CERCS teaduseriala kood: P310 proteiinid, ensümolooogia; P320 nukleiinhappesüntees, proteiinsüntees; B220 geneetika, tsütogeneetika**

Märksõnad: seriin, metüülatsioon, mtEcoBI, H3, H3K4me3, RNA, ühesüsinikuline metabolism

**Effects of changes in serine metabolism due to mitochondrial stress on epigenetics and  
post-translational modifications**

Bachelor's thesis

Susanna Janno

**Abstract.** Manipulation of mitochondrial DNA *in vivo* in *Drosophila* with a type I bacterial restriction endonuclease (mtEcoBI) inserted in mitochondria leads to alteration of metabolism, including increase in serine levels (Bahhir jt., 2019). Elevated serine levels can lead to changes in epigenetic and post-translational modifications as it is a central compound in one-carbon metabolism, which produces the main methylgroup donors. The aim of this thesis was to find out whether changes in serine metabolism due to mitochondrial stress affect the methylation of proteins and RNA quantitatively and/or qualitatively. The results showed that the level of RNA modifications had decreased or remained the same. Protein mono- and dimethylation results were inconsistent, but histone 3 lysine 4 specific trimethylation (H3K4me3) showed a significant increase in strains where mtEcoBI was active.

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

Keywords: serine, methylation, mtEcoBI, H3, H3K4me3, RNA, one-carbon metabolism

## SISSEJUHATUS

Mitokonder on eukarüootse raku organell, mille peamiseks ülesandeks on toota ATP-d läbi oksüdatiivse fosforülatsiooni (OXPHOS) ning seeläbi varustada rakku energiaga (Schaffer ja Suleiman, 2007). Klassikalise ettekujutuse järgi on mitokondriaalsete haigustega kaasnevaid muutusi seostatud just hingamisahela defektiga, kuid juba nende haiguste kirjeldamise algusest on täheldatud patoloogiate fenotüübi märkimisväärset varieeruvust (Wallace ja Chalkia, 2013; Liang jt., 2014). Üha suurenev hulk kirjeldatud kontakte mitokondri ja üldise metabolismi vahel annab alust oletada, et mitokondriaalsete haiguste põhjused ei seisne mitte ainult hingamisahela defektides vaid on palju komplekssemad ning võivad mõjutada metabolismi sõltumata hingamisahela funktsioneerimisest.

Viimasel ajal on üha enam fookusesse tõusnud mitokondri regulatoorne roll üldises raku metabolismis. Nimelt käituvad mitokondriaalsed metaboliidid ka kui signaalmolekulid, mis osalevad raku laiemal homöostaasi reguleerimisel läbi nukleiinhapete epigeneetiliste ja valkude post-translatsiooniliste modifikatsioonide. Eriti on hakatud sellisel regulatsioonil tähelepanu pöörama TCA tsükli metaboliitide rollile, mis on muutnud arvamust nendest metaboliitidest kui pelgalt kõrvalproduktidest ning andnud neile vaheühenditele uue tähenduse raku homöostaasi regulatsioonil (Frezza, 2017).

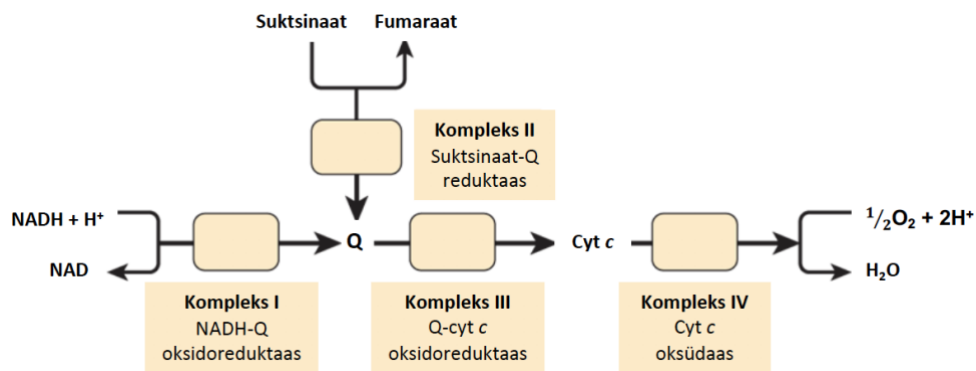
Meie uurimisgrupis on eelneva töö tulemusena leitud, et mitokondriaalse DNA manipuleerimine *in vivo Drosophila* mudelorganismis mõjutab muu hulgas ka seriini metabolismi (Bahhir jt., 2019), mis on keskse tähtsusega aminohape ka ühesüsinikulises (1C) metabolismis. 1C metabolismi üheks rolliks on toota metüülrühma doonoreid nagu tetrahüdrofolaat (THF) ja S-adenosüül-metioniin (SAM). Seega saab oletada, et seriini metabolismi muutused võivad viia ka läbi 1C metabolismi epigeneetiliste ja post-translatsiooniliste modifikatsioonide (metülatsioon, atsetülatsioon) muutusteni. Metülatsiooni muutustel on aga omakorda potentsiaal tugevalt mõjutada rakkude üldist metabolismi ja geenide ekspressiooni (Matilainen jt., 2017).

Lõputöö eesmärk on välja selgitada, kas mitokondriaalsest stressist tulenevad seriini metabolismi muutused mõjutavad kvantitatiivselt ja/või kvalitatiivselt valkude ja RNA metülatsiooni.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Mitokondri struktuur ja ATP süntees

Mitokondri on eukariootse raku organell, mis sisaldab loomses rakus ainukesena ekstras nukleaarset DNA-d ning mille enimtuntud funktsiooniks on ATP sünteesimine (Schaffer ja Suleiman, 2007). Varasem ettekujutus mitokondritest kui jäikadest struktuuridest, mis tugines suuresti fikseeritud preparaate elektronmikroskoopia tulemuste väärtõlgendamisele, on osutunud valeks. Tänu elusrakkude mikroskoopiale on tänaseks teada, et mitokondrid moodustavad raku dünaamilise võrgustiku, milles toimuv pidev liitumine ning lahknemine on tihedalt seotud mitokondri muude funktsioonidega (Westermann, 2010). Mitokondri on tsütoplastmast eraldatud kahe membraaniga – sisemise ja välimise membraaniga – millede vahel asub intermembraanne ruum. Mitokondri sisemist ruumi, mis on ümbritsetud sisemembraaniga, nimetatakse maatriksiks. Välimembraanis paikneb arvukalt poore moodustavaid valgukomplekse – poriid – mis teevad välimembraani läbilaskvaks ionidele ja väikestele kuni 5 kDa suurustele laenguta molekulidele (Alberts jt., 2015). Suuremate molekulide transport toimub spetsiifiliste transporterite abil (Kühlbrandt, 2015). Mitokondri sisemembraan on välimembraaniga võrreldes palju selektiivsem ka väikeste molekulide (näit. ionide) suhtes (Kühlbrandt, 2015). Selline selektiivsus tagab muuhulgas ka prootonigradiendi tekkimise võimalikkuse, mis on mitokondriaalset ATP sünteesi käivitavaks jõuks (Kühlbrandt, 2015). ATP süntees toimub läbi OXPHOS-i, mille jaoks on vajalikud hingamisahela valgukompleksid, mis prootoneid pumbates tekitavad elektroosmootilise gradiendi ATP sünteesiks (Kühlbrandt, 2015). Prootoneid pumbatakse üle sisemembraani membraanidevahelisse ruumi energia abil, mis vabaneb elektronide liikumisel madalamale energeetilisele tasemele nende transpordi käigus piki hingamisahelat. Elektronid läbivad nelja valgukompleksi: hingamisahelasse sisenemine toimub kompleksis I (substraadiks NADH) ja kompleksis II (substraadiks suktsinaat, mille konverteerimisel fumaraadiks moodustub ka FADH<sub>2</sub>), edasi suunatakse kompleks III-le ja siis kompleks IV-le. Viimane kompleks suunab elektronid hapnikule, mille tulemusena tekib vesinike lisamisega vesi (Joonis 1) (Botham & Mayes, 2018).



**Joonis 1. Hingamisahel.** *Cyt c* – tsütokroom c. Joonis on kohandatud raamatust Botham ja Mayes, 2018

Pideva prootonite pumpamise tagajärjel tekib maatriksi ja sisemembraani vahel kontsentratsioonide erinevus (mis põhjustab ka laengute erinevuse ehk membraanpotentsiaali) ning see gradient saab tasakaalustada ATP süntaasi vahendusel. Prootonite liikumine läbi ATP süntaasi struktuuri paneb pöörlema osa ATP süntaasist, mille poolt põhjustatud konformatsiooniliste muutuste tulemusena algab ATP süntees (Hassinen, 2007; Botham ja Mayes, 2018). ATP-d sünteesitakse ADP-st ja fosfaationidest ning 360° ATP süntaasi pöördega suudetakse sünteesida 3 ATP molekuli (Kühlbrandt, 2015; Hassinen, 2007). Lisaks korrektsele elektronide liikumisele piki hingamisahela komplekse toimub mitokondris pidevalt ka elektronide kõrvalekalle hingamisahelast, mis tähendab, et osad elektronid liiguvad otse hapnikule enne kompleks IV aktiivtsentrit mitte ühelt elektronkandjalt teisele (Shokolenko jt., 2007). See juhtub enamasti kompleksidel I ja III ja selle tulemusena tekivad reaktiivsed hapnikuühendid ehk ROS-id (Zhao jt., 2019). Need on väga reaktiivsed molekulid ja on võimelised reageerima praktiliselt kõikide raku komponentidega (valgud, nukleiinhapped, membraanid jt.), mis bioloogilises kontekstis tähendab nende lagunemist või ebasoovitavate modifikatsioonide teket. Paradoksaasel kombel on limiteeritud ROS-ide produktsioon teatud hulgal rakule vajalik, sest nad on ka olulised signaalmolekulid, mis osalevad muu hulgas ka raku proliferatsioonis ja hüpoksiaga kohanemisel (Zhao jt., 2019). Hingamisahela defektide tõttu võivad aga elektronid oma teelt kõrvale kalduda liiga suurel määral ja see põhjustab ROS-ide üleproduktsiooni (Kennelly, 2018), mis ületab raku võime neid konverteerida vähem toksilisteks molekulideks ning võib põhjustada pöördumatuid kahjustusi ning isegi rakusurma (Zhao jt., 2019).

Mitokonder on organell, mis on välja kujunenud bakteriaalse endosümbioosi teel eukariootse eellarakuga juba umbes 1 miljard aastat tagasi (Heinaru, 2012). Evolutsioneerumise käigus kaotas see organism enamuse oma geenidest: osa kanti peremeesraku kromosoomi koosseisu ning osad geenid elimineeriti. Allesjäänud DNA-st sai mitokondriaalne DNA ehk mtDNA

(Heinaru, 2012). Hulkraksetes loomades on mtDNA molekulid enamasti rõngasjad ja mtDNA genoom on tavaliselt 16-17 kb (Heinaru, 2012) suurune, kuid see varieerub organismiti. On kirjeldatud nii 10 kb (Pett jt., 2011) ja ka 48 kb suuruseid mtDNA molekule (Ladoukakis ja Zouros, 2017). Käesoleva töö mudelorganismi *Drosophila melanogasteri* mtDNA on umbes 20 kb suurune (Ciesielski jt., 2018). Inimese mtDNA on 16 571 kb suurune ning sisaldab 37 geeni (Heinaru, 2012). Imetajate hingamisahela kompleksidel I, III, IV ja V on kokku identifitseeritud hetkeseisuga 86 subühikut (Caruana & Stroud, 2020), mida kodeerivad nii raku tuumas kui ka mitokondri enda DNA-s paiknevad geenid. MtDNA 37-st geenist 13 kodeerivad valke, mis on kõik hingamisahela subühikud. Samuti kodeerib mtDNA hingamisahela komplekside translatsiooniks vajalikke RNA-sid - 22 tRNA-d ja 2 rRNAd. (Heinaru, 2012; Ylikallio ja Suomalainen, 2012). Ülejäänud subühikud (mille hulgas on ka kõik kompleks II komponendid) on kodeeritud tuuma DNA poolt (Shokolenko jt., 2007). Suur enamus mitokondri proteoomist, mis koosneb 1100-1900 valgust, kodeeritakse samuti tuuma poolt (Calvo jt., 2016; Smith & Robinson, 2016). MtDNA poolt kodeeritud subühikud on olulised transmembraansed valgud hingamisahela komplekside assambleerumisel, ilma nende subühikuteta funktsioneerivad komplekse ei moodustu. Seega enamik hingamisahela subühikutest on kodeeritud küll tuuma poolt, kuid hingamisahela veatuks toimimiseks on vajalik nii tuuma kui ka mitokondri DNA.

## **1.2. Mitokondriaalsed haigused**

Mitokondriaalsed haigused on päritavatest metaboolsetest haigustest ühed levinumad, esinemissagedusega 1:2000 (Suomalainen ja Battersby, 2018). Mitokondriaalsete haiguste põhjuseks on mitokondri ebanormaalne/häiritud funktsioon, mis võib olla põhjustatud mutatsioonidest nii mitokondri kui ka tuuma geenides (Vafai ja Mootha, 2012). Klassikaliselt on mitokondriaalseid haigusi seostatud just hingamisahela defektidega, kuna ebanormaalselt töötav OXPHOS põhjustab ATP taseme langust ja samuti ka ROS-ide üleproduktsooni (Suomalainen ja Battersby, 2018). Nagu eelpool mainitud, võivad ROS-id reageerida ja seeläbi kahjustada kõiki biokeemilisi molekule, nii valke, nukleiinhappeid kui ka membraanlipiide (Kennelly, 2018). ROS-ideest tingitud oksüdatiivne stress võib tekitada omakorda geneetilisi mutatsioone läbi DNA kahjustamise ning samuti ka teisi patofüsioloogilisi seisundeid (Kennelly, 2018). Näiteks on ROS-ideest tingitud oksüdatiivset stressi seostatud ka diabeedi, maksahaiguse ja neurodegeneratiivsete haigustega, kuigi nende haiguste täpne kausaalne seos ROS-idega on jäänud ebaselgeks (Van Houten jt., 2006). ROS-id põhjustavad DNA-s nii mutatsioone (näiteks läbi guaniini oksüdeerimise) kui ka kaheaheelalisi katkeid, algatavad lipiidide peroksüdatsiooni, mille tulemusena tekib omakorda reaktiivseid ühendeid ning samuti

oksüdeerivad ROS-id valkudes aminohapete kõrvalahelaid ning lõhuvad peptiidsideid (Kennelly, 2018).

Mitokondriaalsed haigused võivad esineda igas vanuses inimesel alates imikueast kuni täiskasvanueani ning olla multisüsteemsed või hoopis koespetsiifilised. Lisaks mõjutavad need enamikke organsüsteeme (Vafai ja Mootha, 2012). Alates mitokondriaalsete haiguste kirjeldamise algusest on täheldatud nende patoloogiate fenotüübi märkimisväärset varieeruvust, mis eristab neid enamikest teistest patoloogiatest. Näiteks võib ühes positsioonis olev identne asendusmutatsioon põhjustada erineva patoloogilise fenotüübi erinevates patsientides (Wallace ja Chalkia, 2013; Liang jt., 2014). Üheks selliseks mutatsiooniks on tRNA<sub>Leu(UUR)</sub> nt 3243A>G, mis võib põhjustada Leigh'i sündroomi, MELAS sündroomi, kroonilist progresseeruvat välist oftalmopleegiat (CPEO), kardiomiopaatia, migreeni, diabeeti ja kuulmise kadumist (Wallace ja Chalkia, 2013). Samuti mitokondriaalse tRNA süntetaasi ARS2, mille ülesandeks on liita tRNA aminohappega ja viia see ribosoomi valgusünteesiks, defektid viivad erinevate fenotüüpideni nagu kardiomiopaatia (Götz jt., 2011), munasarjade düsfunktsioon ja kuulmise kadumine (Pierce jt., 2011). Samas on kirjeldatud ka juhtumeid, kus erinevad punktmutatsioonid põhjustavad kliiniliselt identseid haigusi. Näiteks MERRF sündroomi seostatakse mitmete erinevate tRNA punktmutatsioonidega (m.8344A>G, m.8356T>C, m.3463G>A) (Liang jt., 2014). Samuti on tRNA punktmutatsioon m.3243A>G MELAS sündroomi põhjustajaks (Goto, 1995), kuid ka teised mutatsioonid mtDNAs – m.3271T>C, m.3291T>C, m.13513G>A – viivad sama haiguseni (Liang jt., 2014). Selline mtDNA mutatsioonide paradoks, kus tihti puudub lineaarne seos mutatsiooni ja patoloogia tüübi vahel ning nende patoloogiate väga mitmekesine kliiniline pilt, viitab oluliselt keerulisematele seostele mitokondri funktsiooni ja metabolismi vahel kui lihtsalt ATP puudus ja/või ROS-ide üleproduktioon (Suomalainen ja Battersby, 2018).

### **1.3. Mitokondri ja metabolismi seosed**

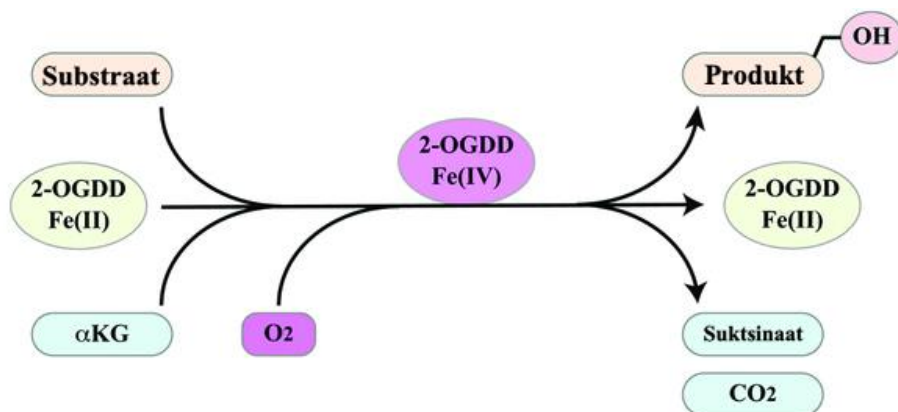
Seda hüpoteesi toetavad ka meie üha kasvavad teadmised mitokondri ülesannete kompleksusest, millede hulka kuuluvad peale ATP tootmise läbi OXPHOS-i veel paljud teised metabolismi protsessid: rasvhapete metabolism, aminohapete süntees, valkude biosüntees, apoptoos, rakusignaalide regulatsioon (Gerhold, 2018; Schaffer ja Suleiman, 2007). Läbi erinevate molekulide sünteesi reguleerib mitokondri mitmeid bioloogilisi protsesse nagu rakkude proliferatsioon, diferentseerumine ning kohanemine stressiga (Chandel, 2015). Viimasel ajal on üha enam fookusesse tõusnud mitokondriaalsete metaboliitide roll signaalmolekulidena, mis osalevad raku laiema homoöstaasi reguleerimisel läbi nukleiinhapete epigeneetiliste ja valkude posttranslatsiooniliste modifikatsioonide. Eriti on tähelepanu

pälvinud TCA tsükli vahevormide osalus sellisel regulatsioonil, mis on andnud nende ammu tuntud katabolismi vaheühenditele uue dimensiooni raku homöostaasi regulatsioonil (Frezza, 2017). TCA tsükli erinevad metaboliidid osalevad muuhulgas ka kromatiini modifitseerimisel, DNA metülatsioonil ja post-translatsioonilistes modifikatsioonides (Martinez-Reyes ja Chandel, 2020), mis laiendab oluliselt kesksete katabolismiradade mõju ning seob toitainete kasutamise otseselt raku homöostaasiga.

Üheks näiteks sellise regulatsiooni kohta on tsitraat, mis on allosteeriliseks regulaatoriks süsiniku katabolismis (Iacobazzi ja Infantino, 2014). Akumuleerunud tsitraat aeglustab fosfofruktokinaas-1 (PFK1) inhibitsiooni kaudu glükolüüsi ning on võimeline inhibeerima ka 6-fosfofrukto-2-kinaasi (PFK2), mille ülesandeks on fruktoos-6-fosfaadist konverteerida PFK1 allosteerilist aktivaatorit fruktoos-2,6-bisfosfaati (Ros ja Schulze, 2013). Samuti aktiveerib tsitraat atsetüülkoensüüm A (AcCoA) karboksülaasi, mis on rasvhapete sünteesis esimeseks sammuks, ning inhibeerib mitokondriaalset rasvhapete transporti (Frezza, 2017). Seega tsitraadi kogunemine rakus on oluliseks signaaliks, mille tulemusena rakk eelistab kataboolsele metabolismile (glükolüüs, rasvhapete oksüdatsioon, TCA tsükkel) anaboolset metabolismi (rasvhapete süntees) (Frezza, 2017). AcCoA on vajalik nii tsütosoolis biosünteesi protsessides – rasvhapete ja kolesterooli sünteesil – kui ka atsetülatsiooni protsessis, mis on tuntud post-translatsiooniline modifikatsioon ja reguleerib mitmete valkude aktiivsust (Pietrocola jt., 2015; Choudhary jt., 2014). AcCoA-d ei transpordita otse tsütosooli vaid see saadakse mitokondrist eksporditud tsitraadist, mille ATP-tsitraadi lüaas (ACLY) konverteerib AcCoA-ks ja oksaloatsetaadiks (OAA) (Martinez-Reyes ja Chandel, 2020). Valkude atsetülatsiooni läbi viivad lüsiini atsetüültransferaasid (KAT) kasutavad AcCoA-d kofaktorina, mille poolt annetatav atsetüülrühma jääk lisatakse valgus lüsiini jäägile (Choudhary jt., 2014). Valke, mida atsetüleeritakse on palju ning nende seas on ka histoonid, millede atsetülatsioon muudab kromatiini „avatumaks“ geeni ekspressioonile (Sivanand jt., 2017). Kõrge AcCoA tase rakus aga viib ülemäärasele histoonide atsetülatsioonile ning see omakorda tõstab ekspressioonitaset geenidel, mis on seotud raku paljunemise ning kasvuga (Lee jt., 2014). Näiteks vähirakud reguleerivad üles just ensüüme, mis on vajalikud AcCoA moodustumiseks (Martinez-Reyes ja Chandel, 2020). Seega AcCoA hulk rakus mõjutab valkude atsetülatsiooni kaudu ka immuun-, vähi- ja tüvirakkude funktsioone.

Lisaks tsitraadile/AcCoA-le on oluline roll kromatiini modifitseerimisel ka 2-oksoglutaraadil (2-OG; tuntud ka kui  $\alpha$ -ketoglutaraat) läbi 2-OG sõltuvate dioksügenaaside (2-OGDD) aktiivsuse kontrolli. See on perekond ensüüme, mis katalüüsivad erinevate substraatide (lipiidid, valgud, nukleiinhapped) hüdroksüülimise protsessi (Martinez ja Hausinger, 2015), mille hulka kuulub ka DNA ja histoonide demetülatsioon (Hausinger, 2004). 2-OGDD seovad

substraadi kahe-elektronilise oksüdatsiooni protsessi 2-oksoglutaraadi dekarboksülatsiooni reaktsiooniga, mille tulemusena tekib hüdroksüülrühmaga produkt ning suktsinaat ja süsihapegaas (Joonis 2) (Farrow ja Facchini, 2014; Biamonti jt., 2018). On teada, et nende valkude aktiivsus sõltub nende kofaktori 2-OG kontsentratsioonist (Martinez-Reyes 2020).



**Joonis 2. 2-OGDD perekonna ensüümreaktsioon.** Joonis on kohandatud artiklist Biamonti jt., 2018

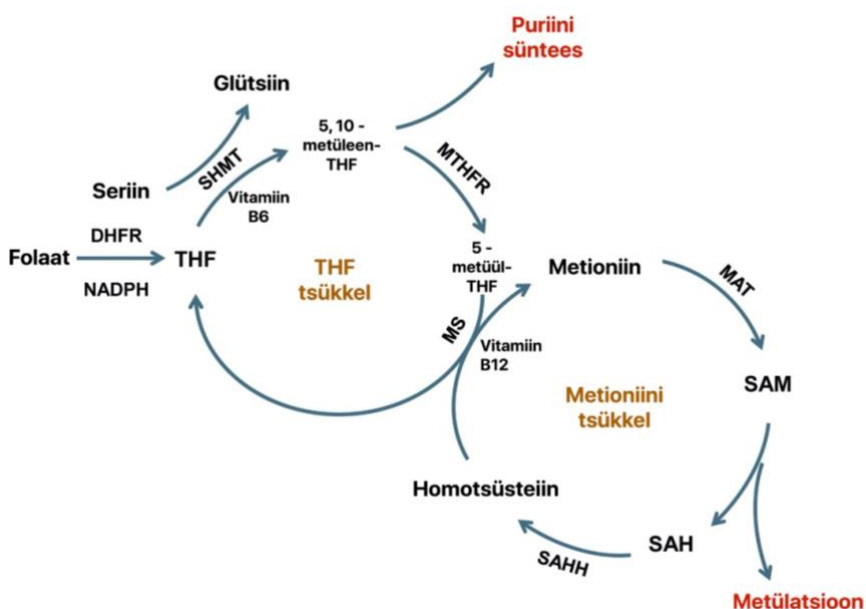
Lisaks sellele on 2-oksoglutaraat vajalik metaboliit ka kromatiini modifitseerimisel olles substraadiks histoonide ja teatud tüüpi DNA demetülaasidele, vastavalt lüsiini demetülaasidele ja TET (*ten eleven translocation*) ensüümidele (Martinez-Reyes ja Chandel, 2020). Histoonide metülatsioon reguleerib transkriptsiooni aktiivsust muutes kromatiini struktuuri, mille tagajärjel represseeritakse geeniekspressiooni (Heinaru, 2012). Seega võib 2-oksoglutaraadi kontsentratsioon reguleerida histoonide ja nukleiinhapete metülatsiooni taset ja seeläbi mõjutada geeniekspressiooni ning ka raku saatust.

2-OGDD perekonna ensüümreaktsioonide üheks produktiks on suktsinaat (Joonis 2), mis akumulereerudes inhibeerib 2-OGDD ensüüme ja seetõttu ka histoonide ning DNA metülatsiooni (Martinez-Reyes ja Chandel, 2020). Suktsinaati võib rakus akumulereeruda ka siis, kui suktsinaadi dehüdrogenaas (SDH) on muteerunud ja ei ole võimeline tootma fumaraati (Sciacovelli ja Frezza, 2016), mis on järgmine oluline sõlmpunkt TCA tsükliks.

Lisaks 2-OG ja suktsinaadile on oluline 2-OGDD perekonna ensüümide reguleerija ka fumaraat. Fumaraat on struktuurilt sarnane molekul suktsinaadile, millel on C5 küljes (fumaraadil C4 küljes) kaks hapniku aatomit, mis interakteeruvad dioksügenaasidega (Xiao jt., 2012), ning seeläbi inhibeerib fumaraat 2-OGDD perekonnast TET ensüüme, mis osalevad demetülatsioonis, põhjustades seega DNA hüpermetülatsiooni, mis omakorda muudab transkriptsiooni aktiivsust (Sciacovelli jt., 2016; Laukka jt., 2016). Selline TCA tsükli metaboliitide regulatsioon ja seos nukleiinhapete epigeneetiliste ja valkude post-

translatsioonilise modifikatsioonidega ning üldise metabolismiga näitab, et mitokondriaalsed metaboliidid ei ole pelgalt vaheühendid metabolismi radades vaid mängivad palju olulisemat rolli raku laiemal homöostaasil.

Teiste metabolismi radade kõrval toimub mitokondris ka ühesüsinikuline (1C) metabolism, mis on oluline osa erinevate metaboliitide – ATP, S-adenosüül-metioniin (SAM), NAD(P)H – biosünteesil. 1C metabolism toimub nii tsütosoolis kui ka mitokondris ning seriini ja formaadi vahendamine kahe keskkonna vahel annab 1C metabolismile paindlikkuse liikuda erinevates suundades vastavalt metaboolsetele vajadustele (Newman ja Maddocks, 2017). 1C metabolism toetub folaatide võimele aktsepteerida ning kanda edasi süsinikrühmasid (Tibbetts ja Appling, 2010) Tetrahüdrofolaat (THF) on folaatidest peamine süsinikrühma edasi kandja ning seriin on üks peamistest metüülrühma doonoritest THF tsükliks (Davis jt., 2003), mis omakorda annab metüülrühma edasi puriini sünteesiks ning metülatsiooniks (Joonis 3) (Newman ja Maddocks, 2017). Seega on seriini taseme muutusel võimalik otsene mõju metülatsioonile läbi doonormolekulide sünteesi taseme. Mitmel erineval juhul on täheldatud mitokondriaalse düsfunktsiooni tulemusena seriini sünteesi tõusu, mis seeläbi võib põhjustada 1C metabolismi komplikatsioone (Bao jt., 2016; Nikkanen jt., 2016; Bahhir jt., 2019). Kuigi on teada, et seriin on vajalik kompleks I funktsioneerimiseks (Lucas jt., 2018), on siiski jäänud sellise fenomeni põhjuslik seos mitokondriaalse stressiga ebaselgeks.



**Joonis 3. THF ja SAM tsükkel.** DHFR – dihidrofolaadi reduktaas; SHMT – seriini hüdroksümetüültransferaas; MTHFR – metüleetetrahydrofolaadi reduktaas; MS – metioniini süntaas; MAT – metioniini adenüültransferaas; SAM – S-adenosüül-metioniin; SAH – S-adenosüül homotsüsteiin; SAHH – S-adenosüül homotsüsteiini hüdrolaas. Joonis on kohandatud artiklist Zeng jt., 2019

#### 1.4. mtDNA ja nukleoidid

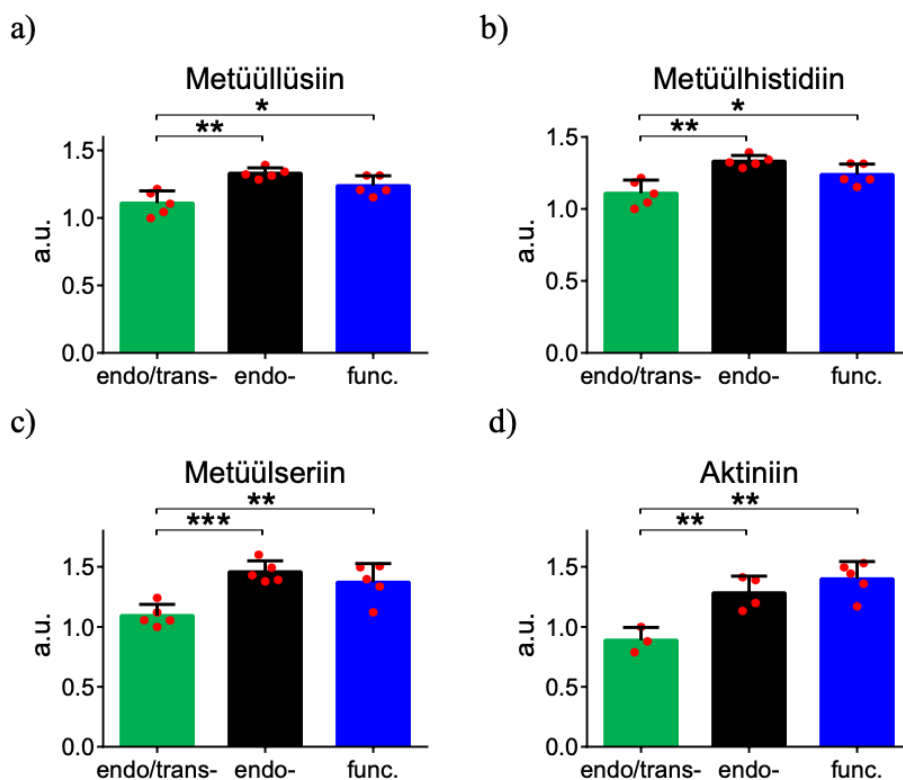
Mitokondri kromosoom on tavaliselt rõngakujuline ning eksisteerib maatriksis *in vivo* DNA-valkkompleksina ehk nukleoidina (Nunnari ja Suomalainen, 2012; Chen jt., 2007). MtDNA pakkumisel nukleoidiks mängib olulist rolli mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A (TFAM), mille seondumist mtDNA-ga peetakse esimeseks sündmuseks mitmeetapilises nukleoidi moodustumise protsessis (Kukat jt., 2015). See on HMG (ingl.k. *high-mobility group*) grupi valk, kuhu kuuluvad mitmed DNA struktuuri muutusi vahendavad valgud (Reeves, 2010). TFAM on võimeline ilma spetsiifilise järjestuseta DNA-le seonduma ning painutama selle ahelaid U-kujuliselt (Kukat ja Larsson, 2013). Samuti on näidatud, et ka *in vitro* seondub TFAM homodimeerina DNA-ga ning pakib selle nukleoidiga sarnasesse struktuuri (Kaufman jt., 2007). Nukleoidis esineb veel mitmeid erinevaid valke, kuid täpses nukleoidi koostises pole veel kokkuleppele jõutud, seda suuresti tänu erinevate töögruppide poolt saadud erinevatele andmetele kui ka tõenäoliselt nukleoidide heterogeensuse tõttu (Hensen jt., 2014; Lewis jt., 2016). Erandiks on TFAM, mille esinemist igas nukleoidis peetakse tänu oma rollile mtDNA pakkimisel universaalseks nähtuseks. Lisaks sellele on nukleoidis peaaegu alati ka valgud, mille funktsioon on seotud mtDNA sünteesi ja geeniekspressiooniga: DNA helikaas Twinkle, DNA polümeraas  $\gamma$  (POLG) ja mitokondriaalne üheahelalist DNA-d siduv valk (mtSSB), mtRNA polümeraas (POLRMT), eelnevalt mainitud TFAM, mitokondriaalne transkriptsioonifaktor B2 (mtTFB2), transkriptsiooni terminatsioonifaktor (mTERF) jt. (Hensen jt., 2014). Nukleoidide koostises on kirjeldatud ka mitmeid metaboolseid ensüüme, millede funktsioon ei ole teadaolevalt otseselt seotud mtDNA sünteesi ja geenide ekspressiooniga (Hensen jt., 2014). Nende hulgas on ka mitmeid seriini metabolismiradades osalevaid ensüüme (Hensen jt. 2014). See annab alust oletada, et mtDNA stabiilsus võib mõjutada metabolismi mitte ainult hingamisahela subühikuid kodeerivate geenide defektide kaudu vaid potentsiaalselt ka läbi nukleoidide struktuuri. Tänu pikalt eksisteerinud ettekujutusele mtDNA muutuste ja OXPHOS-i defektide vahelisele otsesele seosele on seda tüüpi võimalik kommunikatsioon jäänud paljuski tähelepanuta. Siiski on varasemalt pärmis ja nüüd ka inimese rakkudes kirjeldatud seoseid nukleoidi struktuuri ja metabolismi vahel. Sellised bifunktsionaalsed valgud, mis seovad omavahel nukleoidi struktuuri ja metabolismi, on pärmis Aco1p (akonitaas) ja Ilv5p (Kucej jt., 2008) ning inimese rakkudes LETM1 (Durigon jt., 2018). Lisaks oma rollile TCA tsükli (akonitaas katalüüsib tsitraadi konverteerimist isotsitraadiks) (Lushchak jt., 2014) on Aco1p-l oluline roll ka mtDNA pakkimisel, olles isegi võimeline komplementeerima Abf2p (TFAM-i homoloog pärmis) funktsiooni (Chen jt., 2005). Ilv5p funktsioneerib hargnenud ahelaga aminohapete – valiini, leutsiini ja isoleutsiini – biosünteesil, kuid lisaks sellele osaleb ka mtDNA pakkimisel (Bateman jt., 2002). Ilv5p

interaktsioon nukleoididega on sõltuv keskkonnas olevatest toitainetest, aminohapete nälja korral tõuseb *Ilv5p* kontsentratsioon nukleoidis (Kucej jt., 2008). Deletsioonid *ILV5* geenis põhjustavad muude fenomenide kõrval ka mtDNA destabilisatsiooni (Macierzanka jt., 2008). Inimese rakkudes kirjeldatud LETM1 geenist kodeeritud valk on seotud mitokondriaalsete ribosoomidega, osaleb mtDNA ekspressioonis ning reguleerib ka püruvaadi dehüdrogenaasi (PDH) aktiivsust (Durigon jt., 2018). LETM1 inhibeerib PDH-d (Durigon jt., 2018; Jiang jt., 2013), mis on vajalik glükoosi metabolismis püruvaadi tekkeks ning sellise regulatsiooni kaudu muudab LETM1 katabolismi tasakaalu. Samuti LETM1 puudumine viib rakus toitainete metabolismi muutustele, mis omakorda põhjustab nukleoidi struktuuri muutumist (Durigon jt., 2018). Selliste valkude olemasolu nukleoidis, mis osalevad ka nukleoidi struktuuri formeerumisel, tõestab metabolismi otseseid, OXPHOS-st sõltumatuid seoseid nukleoidide struktuuriga ning mtDNA stabiilsusega.

### **1.5. Meie töögrupi eelneva töö ülevaade**

Meie töögrupis on eelneva töö tulemusena kirjeldatud uudset mehhanismi, mille kaudu mtDNA stabiilsus reguleerib üldist metabolismi loomses mudelorganismis *Drosophila melanogasteris* (Bahhir jt., 2019). See avastati tänu mtDNA *in vivo* manipulatsioonile mitokondrisse suunatud tüüp I bakteriaalse restriksiooni endonukleaasiga (mtEcoBI). Kolmest eri subühikust (M, S ja R) koosnevad tüüp I endonukleaasid on võimelised DNA-d lõikama ja ka metüleerima (Murray, 2000), seondudes oma spetsiifiliste sihtmärkjärjestusega (*D. melanogasteri* mtDNA-s on EcoBI seondumisjärjestusi kolm). Vastavalt seostumisjärjestuse metülatsioonile nad kas dissotseeruvad (täielikult metüleeritud), metüleerivad (hemimetüleeritud) või lõikavad DNA-d (metüleerimata). Nende unikaalne lõikamisprotsess algab DNA translokatsiooniga, mille käigus jäävad nad seotuks oma seostumisjärjestusega (Murray, 2000). Kuna DNA-d liigutatakse kompleksist mööda piki ahelate keerdumist, tekitavad nad positiivset superkeerumist „ettepoole“ ja negatiivset superkeerumist „tahapoole“, muutes niimoodi DNA natiivset konformatsiooni (Janscak jt., 1999). DNA-s kaksikahelaliste katkete tekitamine võib toimuda juhuslikult, kuid tihti on see seotud translokatsiooni takistustega nagu kõrgemat järku struktuuridega ja DNA-valk interaktsioonidega (Loenen, 2013). Lisaks on neil võime ka eemaldada tänu translokatsioonilisele aktiivsusele märklaud-DNA-lt märkimisväärse tugevusega seotud molekule (nt. DNA triplekse) (Firman ja Szczelkun, 2000). Selline mtDNA manipuleerimine varajases arenguetapis (vastsestaadiumis) *D. melanogasteris* modifitseeris oluliselt mtDNA-d tehes sellesse katkeid ning põhjustades ka topoloogilisi muutusi, mis omakorda tekitas mtDNA ekspressiooni häirete kaudu hingamisahela defekti ning ROS-ide üleproduktiooni (Bahhir jt., 2019). Täiskasvanud kärbses oli aga mtDNA modifitseerimine

palju tagasihoidlikum ja ei põhjustanud hingamisahela defekte. Hoolimata sellest oli mtEcoBI ekspressioon letaalne tingituna ainevahetuse ümberkorraldustest, mille tulemusena ei suutnud organismid enam kataboliseerida suhkruid. See oli põhjustatud kahe fenomeni poolt: tsütosoolse AcCoA langusest, mis viis ekstramitokondriaalsete valkude atsetülatsiooni vähenemisele ning suhkrute rakku liikumise blokeerimise tõttu Akt kinaasi inhibitsiooni poolt. Sellised muutused on väga sarnased metaboolsetele ümberkorraldustele tüüp II diabeediga patsientidel. Diabeet on üks kõige kiiremini kasvav probleem tervisevaldkonnas. IDF (*International Diabetes Federation*) andmete põhjal (2019 aasta seisuga) on viimase 20 aasta jooksul diabeeti põdevate inimeste arv kolmekordistunud ning tänaseks umbes 9,3% tööealiste inimeste (20-79 aastat) populatsioonist on haigestunud tüüp II diabeeti ja see number on siiani kasvavas trendis. Diabeet mõjutab suuresti ka majandust – iga aastased kulutused diabeediga seotud tervishoiule on 760 miljardit USA dollarit ning IDF prognoosib ka kulutuste kasvu aastani 2045. Hoolimata aastakümneid kestnud intensiivsest uurimistööst on diabeet II täpne tekkemehhanism siiani ebaselge. Seega näitab meie töögrupi varasem töö, et diabeedi tekkimise põhjus võib olla seotud just mtDNA stabiilsuse muutustega *in vivo* ilma, et see viiks hingamisahela defektideni. Lisaks ümberkorraldustele süsinikuallikate katabolismis oli tõusnud ka seriini tase, fenomen, mida on tihti täheldatud ka teiste mtDNA stressisüsteemide puhul (Bao jt., 2016; Nikkanen jt., 2016), kuid mille mehhanism on jäänud ebaselgeks. Kuna seriin on süsinikrühma doonor ühesüsinikulises metabolismis (Davis, jt., 2003), on seega võimalus, et seriini üleproduktioonist tulenevad muutused võivad mõjutada nii valkude post-translatsioonilisi modifikatsioone kui ka tuuma DNA metülatsiooni. Selline mehhanism võib olla viisiks, kuidas kommuniqueeritakse mtDNA stabiilsuse muutusi mitokondrist väljapoole ning viia metabolismi ümberkorraldustele. Lisaks seriini tõusule näitas meie töögrupis varem läbi viidud metaboolika ka osade metüleeritud aminohapete (Joonis 4a-c) ja ka trimetüüllüsiini katabolismi produkti aktiniini taseme tõusu (Joonis 4d). Need andmed viitavad sellele, et ka valkude metülatsioon võib olla suurenenud.



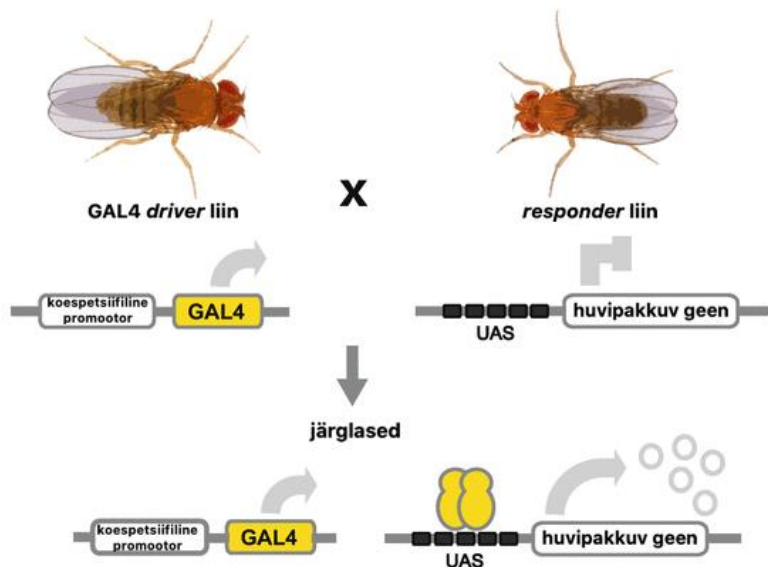
**Joonis 4. Aminohapete metüülsiooni ja aktiniini tase.** a) Lüsiini metüülsiooni b) Histidiini metüülsiooni c) Serini metüülsiooni d) Aktiniini tase; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; tulemused on saadud üldise metaboolika analüüsi käigus meie uurimisgrupis.

Seega on käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada kas ja kuidas mtDNA stressist põhjustatud seriini üleproduktioon mõjutab nii üldist kui ka spetsiifilist RNA ja valkude metüülsiooni.

### 1.5.1. GAL4-UAS ekspressioonisüsteem

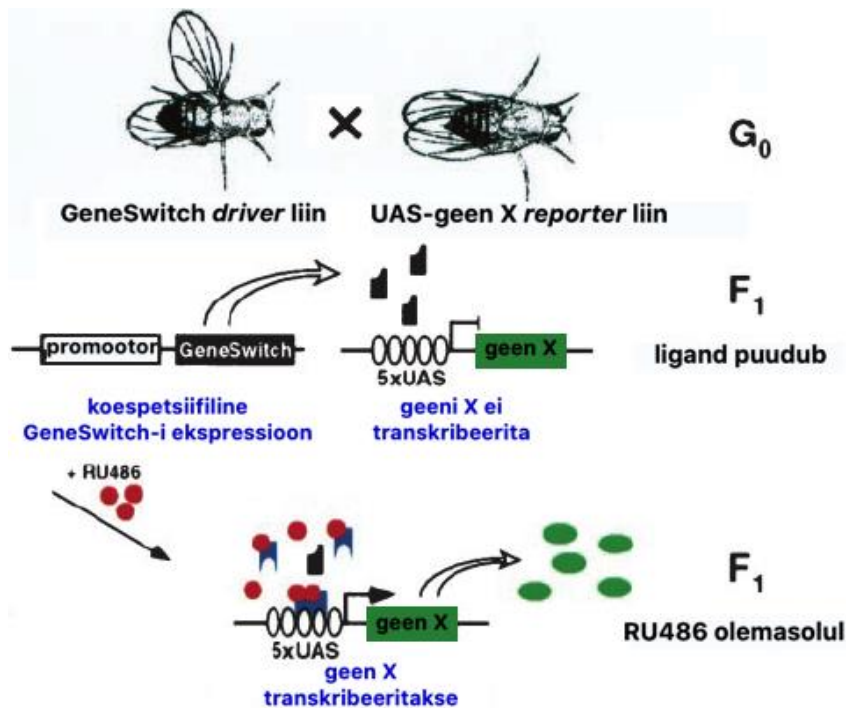
Kõige rohkem kasutatud leidnud transgeeni ekspressiooni süsteem *Drosophilas* baseerub GAL4-UAS-il (Osterwalder jt., 2001). See on kahest komponendist koosnev süsteem, pärmi *Saccharomyces cerevisiae* transkriptsioonifaktorist GAL4 ja DNA märklauajärjestusest UAS (ülesvoolu aktiveeriv järjestus, ingl.k. *upstream activation sequence*). GAL4 seondub nende DNA järjestustega ja on seeläbi võimeline aktiveerima nende geenide transkriptsiooni, millede promootorregioonis esineb UAS-e. Kasutades erinevaid koespetsiifilisi promootoreid on võimalik reguleerida GAL4 ekspressiooni nii, et GAL4 valku ekspresseeritaks ainult teatud kudedes ja see omakorda võimaldab transgeensete geenide transkriptsiooni (Chow, 2017) (Joonis 5). Samuti on sellise kahekomponentse süsteemi eeliseks võimalus uurida toksilisi või surmavaid geeniprodukte, kuna nende ekspressiooni ei toimu *responder* liinis (*Drosophila* liin, kus sihtmärk geeni ees on UAS järjestus, kuid puudub GAL4) (Duffy, 2002). GAL4-UAS süsteem on laialdaselt kasutusel ja seda on rakendatud tuhandetes erinevates *Drosophila*

katsetes: transgeenide ekspressioonil, kudede ablatsioonil kasutades programmeeritud rakusurma mehhanisme, signaaliradades, rakkudevahelisel kommunikatsioonil (Osterwalder, 2001).



**Joonis 5. GAL4-UAS süsteemi skeem.** Joonis on kohandatud raamatu peatükist Caygill ja Brand, 2016

GeneSwitch GAL4 süsteem (GS), mida kasutati ka käesolevas töös *Drosophilas* mtEcoBI ekspresseerimiseks, on edasiarendus algsest GAL4-UAS süsteemist. GS süsteem võimaldab huvipakkuva geeni ekspressiooni indutseeritavat regulatsiooni, mis tähendab, et geeni ekspressioon indutseeritakse vaid selle soodustaja (ingl.k. *inducer*) olemasolul (Scialo jt., 2016) (Joonis 6). GS süsteemi puhul kasutatakse modifitseeritud GAL4 valku, mis koosneb GAL4 aktivatsiooni domäänist ja progesterooni steroidi retseptori ligandiga seondumise domäänist. Selline valk on küll võimeline seonduma UAS järjestustele, kuid vaikeolekus ei aktiveeri transkriptsiooni (Joonis 5). Sünteetilise steroidi analoogi mifepristooni (RU486) seondumisel muutub selle liitvalgu konformatsioon, mille tulemusena on ta võimeline aktiveerima transkriptsiooni. Seetõttu saab GS driveri aktiivsust kontrollida progesterooni retseptori ligandi RU486 ehk mifepristooni puudumise või olemasoluga (Scialo jt., 2016).



**Joonis 6. GeneSwitch süsteemi skeem.** Joonis on kohandatud artiklist Osterwalder jt., 2001

Meie töögrupis on eelneva uurimistöö käigus juba välja töötatud süsteem mtDNA stressi tekitamiseks, mida on võimalik kontrollida GAL4-UAS süsteemiga. Katsete läbiviimiseks on konstrueeritud kolm *D. melanogasteri* tüve erinevate mtEcoBI aktiivsustega: endo/trans-, endo- ja func. Endo/trans- on kontrolltüvi, kus endonukleas mtEcoBI on inaktiivne, endo- tüvel on tänu punktmutatsioonile D298E endonukleaarses domäänis mtEcoBI-l ainult translokatsiooniline aktiivsus ja func. tüvel on mtEcoBI-l nii endonukleasne kui ka translokatsiooniline aktiivsus tänu Walker A motiivis esinevale ATP sidumiseks vajaliku lüsiini muteerimisele K477R punktmutatsiooniga.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärk

Lõputöö eesmärk on välja selgitada, kas mitokondriaalsest stressist tulenevad seriini metabolismi muutused mõjutavad kvantitatiivselt ja/või kvalitatiivselt valkude ja RNA metülatsiooni.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. *Drosophila melanogasteri* käsitlemine

*Drosophila* kasvatamiseks kasutati järgnevate koostisosadega söödet:

**Tabel 1.** Töös kasutatud söötme komponendid

Komponent	Lõppkontsentratsioon
Agar	1%
Pärm	3,5%
Maisijahu	1,5%
Sojajahu	1%
Sahharoos	1,5%
Glükoos	3%
Suhkrusiirup	3%
Propioonhape	0,5%
Nipagiin	0,1%

Segati kokku agar, pärm, maisijahu, sojajahu ning lisati vesi. See kuumutati keemiseni ning lisati sahharoos, glükoos ja suhkrusiirup. Söödet keedeti 20 minutit ning lasti sellel magnetsegajal jahtuda 65°C-ni. Siis lisati propioonhape ja nipagiin ning vajadusel ka mifepristoon, millega GAL4/UAS ekspressioonisüsteem indutseeriti (vt. „GAL4-UAS ekspressioonisüsteem“). Sööde valati välja viaalidesse (4-8 ml) ja pudelitesse (35 ml), lasti tarduda umbes 2 h. Need korgiti ning hoiti kuni kasutamiseni 4°C juures, kuid mitte üle 3 nädala.

Kärbsed inkubeeriti kas 18°C või 25°C juures. Mikroskoobi all töötamisel kasutati nende uimastamiseks CO<sub>2</sub> anesteasiat.

Neitsite korjamiseks inkubeeriti kärbsed 18°C juures. See pikendas perioodi, mille käigus emased ei kopuleerunud 16 tunnini. See võimaldas isoleerida neitseid kaks korda ööpäeva jooksul, hommikul enne kella 9.00 ja õhtul kell 17.00. Ristamisel paigutati pudelitesse emaseid ja isaseid kärbsed vahekorras 2:1 ehk 60 emast ja 30 isast kärbest. Neid hoiti 25°C juures.

Pärast kolme päeva pikkust ristumisperioodi eemaldati pudelitest vanemad nii, et pudelitesse jäid ainult nende larvistaadiumis järglased. Vajadusel kanti vanemad uutesse pudelitesse, et tagada piisavalt suur järglaskond. MtEcoBI indutseerimiseks kanti järglased 10. päevaks 200  $\mu$ M mifepristooni kontsentratsiooniga söötmetele, vahetades söötme värske vastu iga kolme päeva tagant.

### 2.2.2. RNA eraldamine

40 isast kärbest homogeniseeriti jääl 1 ml fenoolil baseeruva kommertsiaalse RNA eraldamiseks mõeldud Fenzol+ (A&A Biotechnology) lahusega. Seejärel inkubeeriti saadud lüsaati toatemperatuuril 5 minutit, lisati 200  $\mu$ l kloroformi, segati 15 sekundit ning lasti seista toatemperatuuril veel 3 minutit. Siis tsentrifugeeriti proove tingimustes 4°C, 12 000 g, 15 minutit. Lahuse ülemine faas eemaldati ning segati 500  $\mu$ l isopropanooliga. Proove hoiti 10 minutit toatemperatuuril ning seejärel tsentrifugeeriti neid uuesti tingimustel 4°C, 12 000 g, 10 minutit. Siis pesti saadud sadet 75% etanooliga, tsentrifugeeriti tingimustel 7 500 g, 5 minutit. Proovidel lasti kuivada paar minutit 37°C juures. Kuivanud proovid lahustati Milli Q vees ning inkubeeriti 60°C juures 10 minutit. Et kogu DNA materjalist proovides lahti saada lisati neile 20  $\mu$ l 10x DNAasi puhvrit ja 10  $\mu$ l (10 ühikut) DNAasi I-e. Seejärel inkubeeriti saadud lahuseid 37°C juures üks tund. Lahusest eraldati RNA 1 ruumala fenooliga (pH=5), segati ning tsentrifugeeriti maksimaalsel kiirusel 4°C juures 5 minutit. Proovide ülemine faas eraldati ja sellele lisati 1 ruumala kloroformi ning tsentrifugeeriti uuesti maksimaalsel kiirusel 4°C juures 5 minutit. Ülemine faas eraldati uuesti, lisati 1/10 ruumalast 3M NaAc-d, 2,5 ruumala 95% etanooli, segati ja inkubeeriti proove -20°C juures üleöö. Seejärel tsentrifugeeriti tuube tingimustes 4°C, 11 000 g, 10 minutit. Proovid pesti 500  $\mu$ l etanooliga ning kuivatati paar minutit 37°C juures. Saadud RNA sade lahustati 60  $\mu$ l Milli Q vees ja kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriliselt NanoDrop (Thermo Scientific) aparatuuriga. Järgnevalt töödeldi saadud RNA lahust P1 nukleaasiga (Sigma, N8630), mis lõikas kogu eraldatud RNA monomeerideks. Selleks viidi 40  $\mu$ g RNA kogus 82  $\mu$ l ruumalani RNAaside inhibiitori DEPC-ga (dietüülpürokarbonaat, ingl.k. *diethyl pyrocarbonate*) töödeldud vees ning kuumutati 95°C juures 4 minutit. Seejärel lahust jahutati ning lisati 8  $\mu$ l 10 mM ZnSO<sub>4</sub> ja 15  $\mu$ l P1 (200). Seda inkubeeriti 37°C juures üleöö. Fosfaatgruppide eemaldamiseks nukleotiidide küljest lisati lahusesse 12  $\mu$ l 10x Fast AP puhvrit, 7  $\mu$ l vett ja 1  $\mu$ l Fast AP ensüümi (ThermoFisher, EF0651). Seda inkubeeriti 37°C juures 3 tundi ning analüüsiti saadud nukleosiide HPLC-l.

### 2.2.3. HPLC meetod

Töös kasutatakse RNA nukleosiidide metülatiooni uurimiseks *high-performance liquid chromatography* (HPLC) meetodit (Shimadzu Prominence HPLC süsteem kolonniga Supercosil LC-18-S, mille mõõtmed on 25 cm x 4,6 mm, 5 µm). HPLC põhimõte on keemilistest segudest eraldada ning analüüsida erinevaid komponente (Snyder jt., 2010), mida tehakse proovi pumpamisega läbi kolonni, millega on ühendatud detektor (Meyer, 2013). Detektoreid võib olla erinevaid, antud töös kasutati nukleosiidide detekteerimiseks UV kiirguse neeldumise mõõtmist. Erinevate komponentide eraldamine põhineb nende liikumise kiirusel läbi kolonni. Kui proov on läbi kolonni liikunud, tekitab iga komponent selles proovis graafikule piigi. Iga piigi määrab retentsiooniaeg (*retention time*) – aeg, mil komponent on jõudnud läbi kolonni liikuda ning piigi pindala näitab komponendi kontsentratsiooni proovis (Snyder jt., 2010). Nukleosiidide lahutatamiseks kasutasin varem välja töötatud protokollit (Gehrke ja Kuo, 1989), mis nägi ette kolme erineva puhvri (A, B ja C) (puhvrite koostised on näha Tabelis 2) kontsentratsiooni varieerimist voolukiirusel 1,0 ml/min katse käigus järgnevalt: 1) 100% HPLC puhver A 12 minutit, 2) üleminek 10%-le HPLC puhver B-le 8 minutiga, 3) üleminek 25% HPLC puhver B-le 4 minutiga, 4) üleminek 100% HPLC puhver B-le 9 minutiga, 5) 0%-100% HPLC puhver C-le 35 minutiga, hoides 100% HPLC puhver C-d 10 minutit.

**Tabel 2.** HPLC-s kasutatud puhvrite koostised ja pH

Puhver	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> konts.	Lisand ja selle konts.	Puhvri pH
Puhver A	0,01 M	Metanool; 20 %	5,3
Puhver B	0,01 M	Metanool; 20 %	5,1
Puhver C	0,01 M	Atsetonitril; 35 %	4,9

Kuna antud tingimustel on erinevalt modifitseeritud nukleosiididel erinev retentsiooniaeg, on võimalik P1-ga töödeldud ja defosforüleeritud RNA proovis detekteerida neid erinevalt modifitseeritud nukleosiide ning nende UV lainepikkustel (260 ja 280 nm) tulevate piikide järgi leida ka kontsentratsioonid. Retentsiooniaja ja sellele vastava modifitseeritud nukleosiid identifitseeriti varem välja töötatud protokollit järgi (Gehrke ja Kuo, 1989).

### 2.2.4. Western blot

Valkude eraldamiseks koguti kokku 30 isast kärbest, külmutati vedelas lämmastikus ning homogeniseeriti 300 µl westerni homogenisatsioonipuhvris (PBS; 1,5% Triton X-100;

Complete Mini EDTA-vaba proteaasi inhibiitor – 11836170001 Roche; PhosSTOP fosfataasi inhibiitor – 4906845001 Roche). Lüsaaati inkubeeriti jääl 15 min ning tseentrifuugiti siis 4°C juures 13 000 g ja 15 minutit. Koguti kokku supernatant, milles leiduva valgu kogus determineeriti Bradfordi meetodiga. See põhineb värvi Coomassie Brilliant Blue G-250 seandumisel valguga, mille tulemusena moodustub sinine valgukompleks ning kontsentratsiooni määramiseks kvantifitseeritakse neeldumine 595 nm juures. Peale mõõtmisi segati kokku supernatant ja 2xSDS laadimispuhver (50 mM Tris·Cl, pH 6,8; 0,01% Serva Blue G; 4% SDS; 12% glütserool; 0,1 M DTT) vahekorras 1:1. Westerni jaoks kasutati BioRad Criterioni gradientseid AnyKD (#5671124) eelvalatud geele. 60 µg totaalset valgulüsaaati eraldati geelis esialgse 70 V ja hilisema 90 V pingega BioRad Criterion voolutusüsteemiga. Valmis westerni geelikassett eemaldati ja geelilt lõigati ära *stacking* osa, mis on vajalik hammastesse laetud valguproovide kontsentreerimiseks hästi piiritletud ribadeks (ingl.k. *band*). Ülejäänud osa inkubeeriti 5 minutit Lonza westerni ülekande puhvris. Samuti inkubeeriti samas puhvris nitrotselluloosi membraan (GE Healthcare Amersham™ Protran™ 0,45 µm) ja filterpaberid. Ülekanne toimus nn. „märja“ ülekande meetodiga BioRad Criterioni ülekandesüsteemis (#1703989), mille jaoks komplekteeriti 3 filterpaberist, geelist, nitrotselluloosi membraanist ning veel 3 filterpaberist koosnev nn. *transfer pack*. Seda voolutati 30 V juures umbes 1 tund. Järgnevalt inkubeeriti membraani loksutil toatemperatuuril 1 tund primaarse antikeha inkubatsioonipuhvris (Tabel 3) eesmärgiga blokeerida antikeha mittespetsiifilist sidumist. Seejärel vahetati puhver primaarse antikehaga sisaldava puhvri vastu (Tabel 3) ning inkubeeriti 4°C juures loksutil üleöö. Primaarse antikehaga puhver eemaldati ning membraani pesti loksutil 3 x 15 min TBS/Tween 20-ga. Järgnes membraani inkubeerimine loksutil peroksüdaasiga konjugeeritud sekundaarse küüliku primaarse antikeha mittevareiaabli osa vastase antikehaga 1 tund toatemperatuuril. Membraani pesti uuesti TBS/Tween 20-ga 3 x 15 min. Signaali visualiseerimiseks kasutati ECL (ingl.k. *enhanced chemiluminescence*) reagenti (BioRad Clarity Western ECL Substrate, #1705061), mis segati kokku kahest komponendist tootja poolt valmistatud protokoll järgi. ECL-i lahusega inkubeeriti membraane 5 minutit ja signaal mõõdeti ning analüüsiti BioRad XRS masina abil Image Lab programmis. Üldise mono- ja dimetülatsiooni analüüsi korral inkubeeriti membraani mittespetsiifilise Ponceau S valguvärviga, et kvantifitseerida membraanil olevat totaalset valgukogust, mida kasutati tulemuste normaliseerimiseks. Histoon 3 (H3) trimetülatsiooni uurimisel normaliseeriti tulemused teisel membraanil visualiseeritud H3 koguse vastu. Analüüsimisel kasutati optimaalse pikkusega säriaega, et välistada üleeksponeeritud signaali kvantifitseerimist ning signaali normaliseerimiseks mõõdeti taustsignaali mitmes eri kohas membraanil.

**Tabel 3.** Töös kasutatud antikehad ja inkubatsioonipuhvrid

<b>Antikeha</b>	<b>Primaarse antikeha inkubatsioonipuhver</b>	<b>Sekundaarse antikeha inkubatsioonipuhver</b>	<b>Primaarse antikeha lahjendus</b>	<b>Sekundaarse antikeha lahjendus</b>
Anti-histoon 3 (ab1791)	5% BSA ja 1x TBS + 0,1% Tween20	5% piimapulber ja 1x TBS + 0,1% Tween20	1 : 5 000	1 : 10 000
Anti- metüleeritud lüsiin (mono- ja dimetüleeritud) (ab23366)	5% BSA ja 1x TBS + 0,1% Tween20	5% piimapulber ja 1x TBS + 0,1% Tween20	1 : 5 000	1 : 10 000
H3K4me3 (AB_2615077)	5% BSA ja 1x TBS + 0,1% Tween20	5% piimapulber ja 1x TBS + 0,1% Tween20	1 : 5 000	1 : 10 000

### 2.2.5. Statistiline analüüs

Kõikide katsete tulemusi analüüsiti nii Exceli kui ka GraphPad Prism 6 programmidega. Töös kasutati katsetes 4 või 5 bioloogilist kordust ning statistiline relevantsus determineeriti kahe-suunalise Student t-testiga. Antud testi p-väärtuste tähised graafikutel on \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Graafikud koostati GraphPad Prism 6 programmiga.

### 2.3. Tulemused

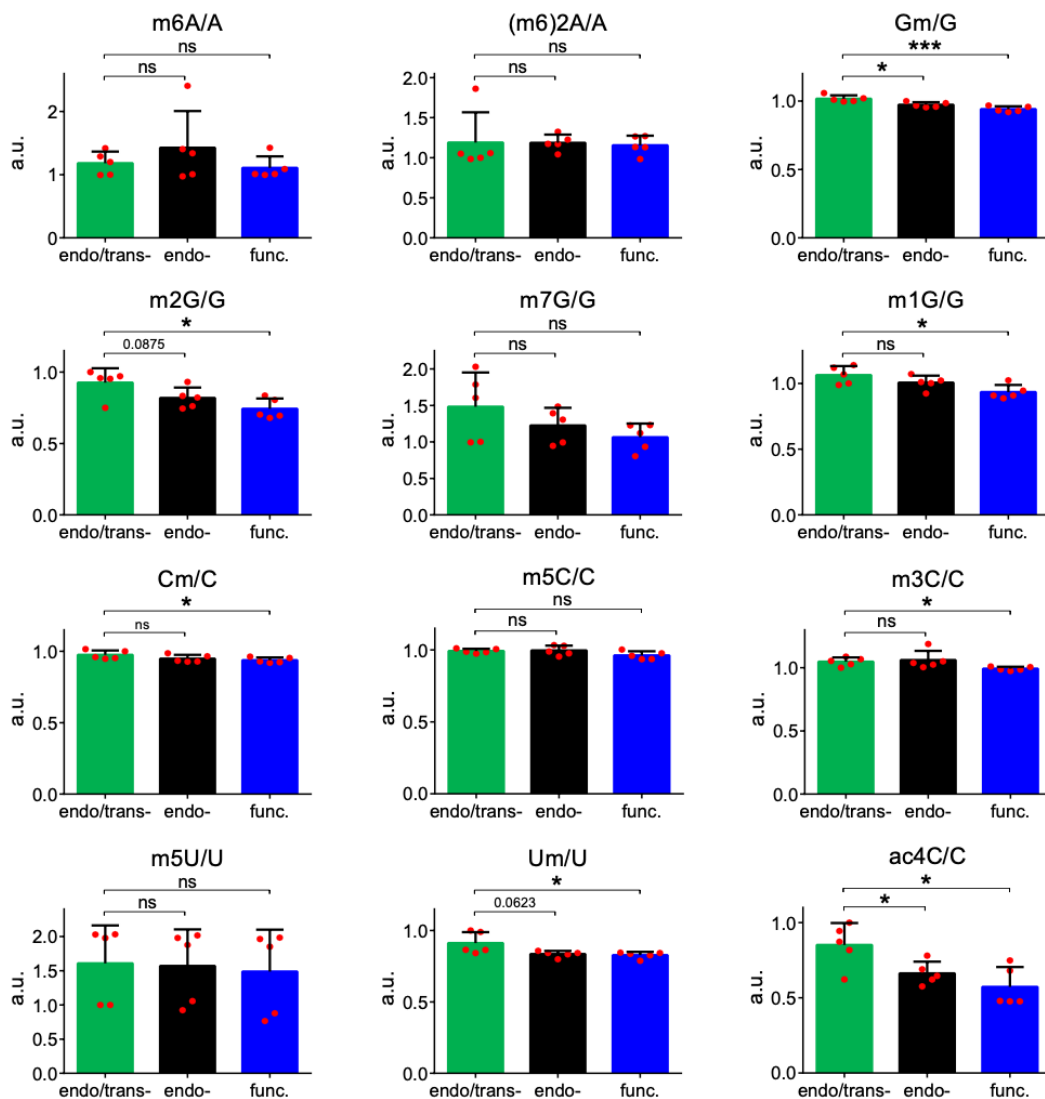
Meie töögrupi varasema töö tulemusena on kirjeldatud, et mitokondriaalse DNA manipuleerimine *in vivo D.melanogasteri* mudelorganismis mõjutab muu hulgas ka seriini metabolismi (Bahhir jt., 2019). Seriin on peale oma funktsiooni kui aminohape ka oluline metaboliit, mis osaleb ühesüsinikulises metabolismis süsinikrühma doonorina. Seega võib seriini taseme muutus potentsiaalselt mõjutada nii nukleiinhapete kui ka valkude metülatsiooni. Kuna sellised metülatsiooni muutused võivad põhjustada laiaulatuslikke muutusi raku homöosaasil ja metabolismil, võib see olla üheks viisiks, mille abil vahendatakse mtDNA meie poolt varem kirjeldatud stressist tulenevaid metaboolseid muutusi (Bahhir jt., 2019) väljapoole mitokondrit. Hüpooteesi kontrollimiseks uurisin *D. melanogasteris* RNA metülatsiooni, valkude

üldist mono- ja dimetülatsiooni ning H3K4 spetsiifilist trimetülatsiooni. Katsetes kasutasin kolme tüve: endo/trans-, endo- ja func. Endo/trans- on kontrolltüvi, mis ekspresseerib mtEcoBI inaktiivset vormi, endo- tüves on mtEcoBI-l ainult translokatsiooniline aktiivsus ning func. tüvi kannab mtEcoBI täielikult aktiivset vormi, millel on nii endonukleasne kui ka translokatsiooniline aktiivsus. Antud isovormide ekspresseerimiseks ristasin nende tüvede neitseid tubGS tüve isastega. Nende ristamiste järglaskond sisaldas nii tubGS transkriptsiooni aktivaatorit kui ka kõiki vastava mtEcoBI isovormi gene. Tüvede täpsemad genotüübid on kirjeldatud Tabelis 4. Eksperimentides kasutasin 4 (valkude katsed) või 5 (RNA katsed) bioloogilist kordust. MtEcoBI ekspressiooni indutseerimiseks viidi kärbsed mifepristooni sisaldavale söötlele (konts. 200 µM), millel hoiti neid 10 päeva, kandes neid üle värsketele mifepristooniga söötlele iga kolme päeva tagant.

**Tabel 4.** Tüvede nimetused ja genotüübid

Tüve nimetus	Genotüüp	Allikas	Kirjeldus
endo/trans-	<i>UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS;</i> <i>UAS-mtHsdR (K477R)/UAS-mtHsdR (K477R)</i>	Bahhir jt., 2019	Inaktiivset mtEcoBI isovormi gene sisaldav tüvi
endo-	<i>UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS;</i> <i>UAS-mtHsdR (D298E)/UAS-mtHsdR (D298E)</i>	Bahhir jt., 2019	Translokatsiooniliselt aktiivset mtEcoBI isovormi gene sisaldav tüvi
func.	<i>UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS/UAS-mtHsdM.UAS-mtHsdS;</i> <i>UAS-mtHsdR/UAS-mtHsdR</i>	Bahhir jt., 2019	Translokatsiooniliselt ja endonukleasselt aktiivset mtEcoBI isovormi gene sisaldav tüvi
tubGS	<i>tubGS/tubGS</i>	Scott Pletcheri grupp	Sisaldab oma genoomis tubuliini promotori kontrolli all olev GeneSwitch liitvalku

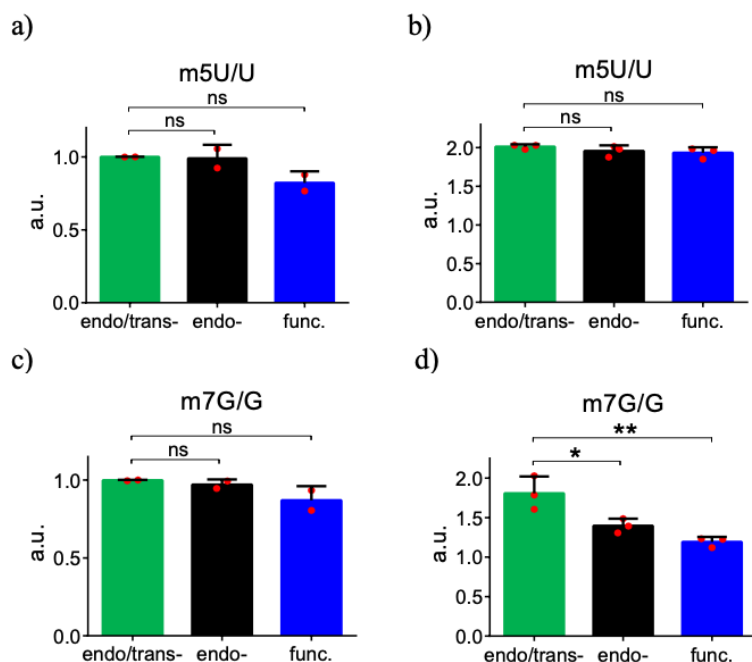
RNA modifikatsioonide uurimiseks eraldasid kärbestest totaalse RNA, mida seejärel töötlesin P1 nukleaasiga, mis kogu RNA monomeerideks lõikas. Saadud nukleotiididelt eemaldasid fosfaadi ja nukleosiide analüüsisin HPLC-ga. Detekteerisime järgnevate RNA modifikatsioonide kontsentratsioone: m6A – N6-metüüladenosiin; (m6)2A – N6,N6-dimetüüladenosiin; Gm – 2'-O-metüülguanosiin; m2G – N2-metüülguanosiin; m7G – N7-metüülguanosiin; m1G – N1-metüülguanosiin; Cm – 2'-O-metüültsütidiin; m5C – 5-metüültsütidiin; m3C – 3-metüültsütidiin; m5U – 5-metüüluridiin; Um – 2'-O-metüüluridiin; ac4C – N4-atsetüültsütidiin. Kuna seriini tase oli tõusnud vastusena mtDNA stressile, siis meie algne hüpotees eeldas ka metülatsiooni tõusu, kuid tulemused näitavad, et detekteeritud metüleeritud nukleosiidide kontsentratsioonid jäävad kas samaks või langevad vastusena endo- ja/või func mtEcoBI ekspressioonile (Joonis 7). Iga modifitseeritud nukleosiidi kontsentratsioon on normaliseeritud sama nukleosiidi metüleerimata vormi kontsentratsiooni vastu. Graafikuid, kus tulemused on normaliseeritud kõikide metüleerimata nukleosiidide kontsentratsioonide summa vastu, näeb töö Lisas 1. Lisaks sellele näitas HPLC analüüs ka tsütosiini atsetülatsiooni efekti langust func. tüves, mis korreleerub meie varasemate tulemustega valkude atsetülatsiooni vähenemise kohta meie töörühmas (Bahhir jt., 2019).



**Joonis 7. RNA nukleosiidide metülatsioon.** m6A – N6-metüüladenosiin; (m6)2A – N6,N6-dimetüüladenosiin; Gm – 2'-O-metüülguanosiin; m2G – N2-metüülguanosiin; m7G – N7-metüülguanosiin; m1G – N1-metüülguanosiin; Cm – 2'-O-metüülsütidiin; m5C – 5-metüülsütidiin; m3C – 3-metüülsütidiin; m5U – 5-metüüluridiin; Um – 2'-O-metüüluridiin; ac4C – N4-atsetüülsütidiin; Endo/trans- - inaktiivset mtEcoBI-d kandev tüvi; endo- - translokatsioonilise aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi; func. – translokatsioonilise ja endonukleasse aktiivsusega mtEcoBI-d kandev tüvi; ns (ingl.k. *not significant*) – statistiliselt mitte relevantne; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; punased punktid tähistavad iga individuaalse katse tulemust

Modifikatsioonid m7G ja m5U torkavad analüüsitud modifikatsioonide hulgas silma oma suurte standardhälvetega, mistõttu tegin neile eraldi graafikud (Joonis 8). Saadud graafikutest saab järeldada, et suur standardhälve oli tingitud erinevustest kahe erineva katse vahel (modifikatsioone analüüsiti kahes erinevas katses, millest esimene sisaldas kahte bioloogilist

kordust ja teine kolme). Teiste modifikatsioonide puhul niivõrd suurt standardhälvet ei olnud ning põhjus, miks just nende kahe modifikatsiooni puhul katsed erinesid, on hetkel ebaselge.

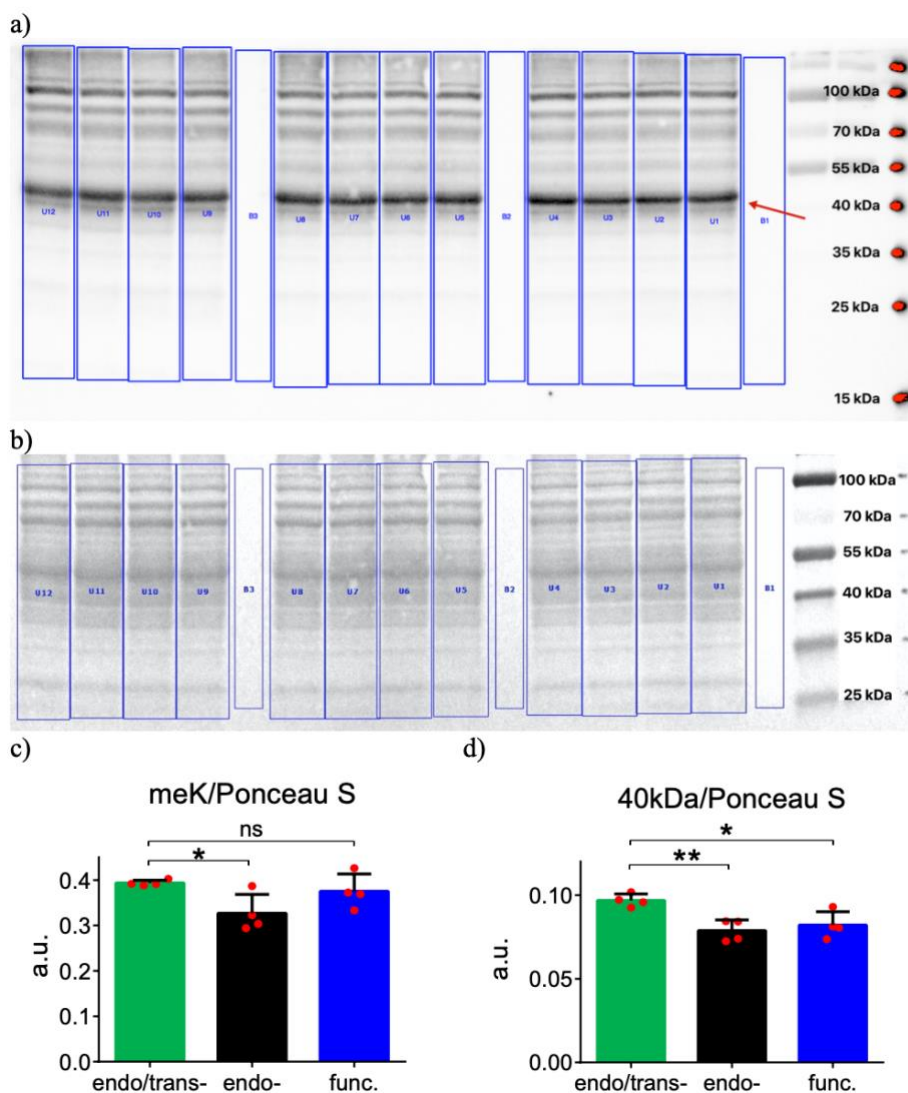


**Joonis 8. m7G ja m5U katsed eraldi.** a) m5U kordused 1 ja 2 b) m5U kordused 3, 4 ja 5 c) m7G kordused 1 ja 2 d) m7G kordused 3, 4 ja 5; ns (ingl.k. *not significant*) – statistiliselt mitterelevantne, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

Kuna meie töögrupi varasema töö tulemusena on näidatud lisaks seriini tõusule osade metüleeritud aminohapete ja ka trimetüüllüsiini katabolismi produkti aktiniini taseme tõusu, siis eeldasin ka valkude metülatsiooni tõusu ning selle kontrollimiseks analüüsisin nii valkude üldist kui ka spetsiifiliselt histoon 3 metülatsiooni muutusi.

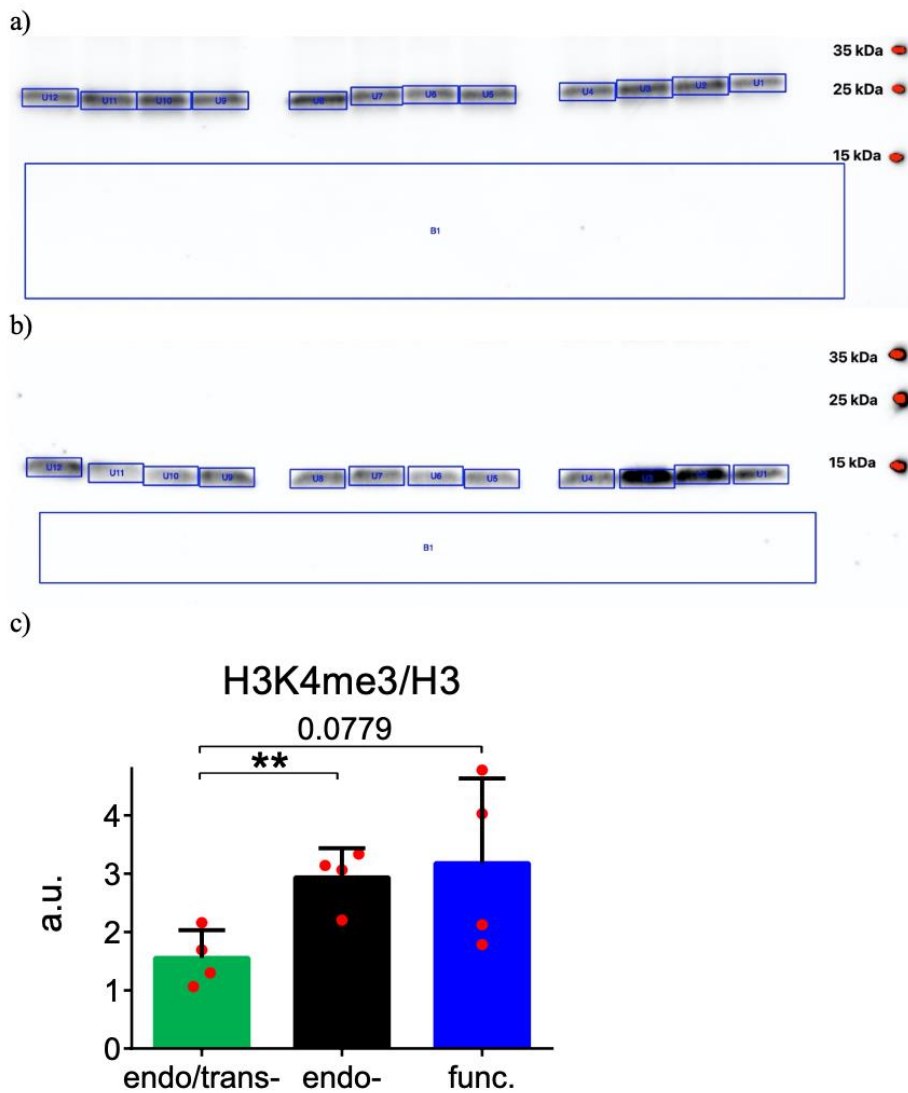
Tulemused ei näidanud üldist valkude mono- ja dimetülatsiooni tõusu (Joonis 9a-c). Kuid oli võimalik detekteerida, et metülatsiooni tasemes oli valkude vahel olulisi erinevusi. Näiteks oli umbes 40 KDa suuruse valgu metülatsiooni tase erinev globaalsest tasemest (Joonis 9a) (Lisa 2). Kuigi see võib tähendada ka antud valgu üldise taseme muutust, leidsin siiski, et on põhjust analüüsida ka spetsiifiliste valkude metülatsiooni eraldi. Ühtedeks tugevalt metüleeritud valkudeks, mille puhul see post-translatsiooniline modifikatsioon on ka otseses seoses valkude ekspressiooniga läbi kromatiini modifikatsioonide, on histoonid. Histoonides üheks sihtmärk-aminohapeteks, mida metüleeritakse, on lüsiinid (metüleeritakse ka arginiini ja histidiini) (Greer ja Shi, 2012). Lüsiini metülatsioon histoonides võib viia nii geenide ekspressiooni aktivatsiooni kui ka represserimiseni, see oleneb metülatsiooni asukohast ning ka liidetud metüülrühmade arvust (mono-, di-, või trimetülatsioon) (Zhang ja Reinberg, 2001). Samuti on lüsiini metüleerimine vaheetapiks kromatiini modifitseerimisel, metülatsiooni kaudu

reguleeritakse teiste kromatiini modifitseerivate faktorite seandumist ja seeläbi geeni transkriptsiooni regulatsiooni (Martin ja Zhang, 2005). Näiteks metüleeritud H4 lüsiin 9 (K9) on seandumiskohaks heterokromatiini valgule HP1, mis osaleb heterokromatiini moodustumisel (Martin ja Zhang, 2005). Heterokromatiin on tihedalt kokkupakitud DNA vorm, kui transkriptsioon toimub oluliselt madalama aktiivsusega kui „avatumas“ konformatsioonis olevas eukromatiinis. Samas H3 lüsiin K4, K36 ja K79 seostatakse positiivse geeni ekspressiooniga ning H3K4 metülatsioon funktsioneerib kui seandumiskoht ensüümide jaoks, mis geeni ekspressioonil osalevad (histooni atsetültransferaasid, lüsiini metüültransferaasid) (Martin ja Zhang, 2005).



**Joonis 9. Üldine mono- ja dimetülatsioon** a) metüleeritud lüsiin (meK); punane nool tähistab 40 kDa suuruse valgu kvantifitseerimisel kasutatud riba (*band*); sinised ristkülikud tähistab kvantifitseerimisel kasutatud alasid b) Ponceau S värvitud c) üldine mono- ja dimetülatsioon H3-l; d) 40 kDa suuruse valgu metülatsioon; ns (ingl.k. *not significant*) – statistiliselt mitterelevantne, \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$

Kuna antud *Drosophila* tüvedes oli suurenenud aktiniini, trimetüüllüsiini laguprodukti kontsentratsioon, siis see võib tähendada ka trimetüüllüsiinide hulga kasvu. Erinevalt üldisest mono- ja dimetülatsioonist, oli histoon 3 trimetülatsiooni (H3K4me3) puhul märgata selle modifikatsiooni märkimisväärset suurenemist. H3K4me3 puhul on näha, et metülatsiooni tase on tõusnud nii endo- kui ka func, tüves võrreldes kontrolltüvega (Joonis 10c). Selle katse puhul on märgata ka modifitseeritud histooni märkimisväärselt erinevate migratsiooni võrreldes modifitseerimata vormiga. Histoon 3 suurus on umbes 15kDa ning see vastas tema migratsioonile H3 westernil (Joonis 10b). Trimetüleeritud H3 jookseb aga pisut kõrgemal, umbes 25 kDa juures (Joonis 10a). Selle modifikatsiooni poolt põhjustatud H3 migratsiooni muutusi poliakrüülamiidgeelis on täheldatud ka varem (Lisa 3) (Crump jt., 2011).



**Joonis 10. Histoon 3 trimetülatsioon** a) Trimetüleeritud histoon 3 (H3K4me3) western b) Histoon 3 (H3) western c) statistiline analüüs; \*\*  $p < 0.01$

## 2.4. Arutelu

Töö tulemused ei näitanud globaalset ega üldist metülatsiooni taseme tõusu RNA-l ning valkudel, mis on vastupidiseks tulemuseks algselt püstitatud hüpoteesile, et seriini hulga tõus suurendab ka metülatsiooni.

RNA nukleosiidide metülatsiooni muutused olid ebahühtlased, modifikatsiooni hulk jäi kas samaks või pigem langes. Atsetüleeritud tsütosiini (ac4C) tase langes samuti vastusena mtDNA stressile ja see korreleerub hästi meie töögrupi varasemate andmetega valkude atsetülatsiooni muutuste kohta (Bahhir jt., 2019). See tõestab üldise atsetülatsiooni taseme vähenemist ka väljaspool valkude modifikatsioone ja viitab sellele, et see efekt on põhjustatud pigem tsitraadi transpordist mitokondrist tsütoplasmasse kui spetsiifiliste atsetülaaside/deatsetülaasise inhibitsioonist või aktivatsioonist. Kõige suuremat efekti RNA nukleosiidide metülatsioonis näeb guanosiinide puhul. Nii N2-metüülguanosiini (m2G) ja N1-metüülguanosiini (m1G) tase endo- ja func. tüves oli langenud rohkem võrreldes teiste modifitseeritud nukleosiididega. Siia võib reservatsioonidega lugeda ka m7G, kui arvestada tema taseme muutusi vaid ühe katse raames analüüsitud kolme bioloogilise korduse puhul. m2G modifikatsiooni leidub ribosomaalses RNA-s (rRNA), väikeses tuuma RNA-s (snRNA) ja ka transpordi-RNA-s (tRNA). m1G modifikatsiooni esineb nii rRNA-s kui ka tRNA-s. m1G modifikatsioon on spetsiifiline ning asub tRNA-s 37. positsioonil (Li ja Björk, 1999). Sellised spetsiifilised muutused teatud modifikatsioonide puhul võivad olla põhjustatud erinevate mehhanismide poolt. Näiteks võivad meie töögrupi poolt varem kirjeldatud metabolismi tasakaalu muutused põhjustada erinevate RNA-de suhete muutusi, mis võivad peegelduda globaalses modifikatsioonide suhete muutustes. Samuti, kuna modifikatsioonide tase on alati tasakaal keemiliste rühmade lisamise ja eemaldamise vahel, siis võib antud juhul olla ka tegemist demetülaaside suurenenud aktiivsusega. Mõlema modifikatsiooni (m2G ja m1G) demetüleerimisega on seotud *E. coli*-st pärit 2-OGDD gruppi kuuluv demetülaas AlkB (homoloogideks eukariootides on ALKBH1-8) (Fedeles jt., 2015). Seega võib eeldada, et põhjuseks, miks metülatsiooni taseme muutus eeldustele ei vastanud ning pigem langes, võib olla TCA tsükli vahevormide kontsentratsioonide muutuses. 2-OGDD gruppi kuuluvate demetülaaside kofaktoriks on 2-oksoglutarat (2-OG) (vt „Mitokondri ja metabolismi seosed“), mis tähendab et 2-OGDD aktiivsus sõltub suurest 2-OG hulgast. On täheldatud, et 2-OG taseme muutused põhjustavad ka metülatsiooni efekti muutusi (Carey jt., 2015) ja kuna varasema töö tulemusena on leitud, et mtEcoBI ekspressioon suurendab 2-OG kontsentratsiooni (Bahhir jt., 2019), siis võib olla see üheks põhjuseks, miks selliste RNA modifikatsioonide efekt on langenud.

Samamoodi nagu ka RNA puhul, on valkude metülatsiooni muutused ebahühtlased. Histon 3 K4 spetsiifilise trimetülatsiooni (H3K4me3) puhul on näha kindlat suurenemist nii func. kui ka endo- tüves. Fakt, et endo- ja func. tüves oli trimetülatsiooni tõus sarnane, tõestab seda, et metülatsioonimustrite muutmiseks piisab ainult mtEcoBI translokatsioonilisest aktiivsusest nii valkude kui ka RNA puhul. Antud aktiivsus võib põhjustada muutusi nukleoidi struktuuris, muutes tõestatult mtDNA topoloogiat (Bahhir jt., 2019) ning teoreetiliselt lõhkudes ka mtDNA ja valkude vahelisi kontakte. Kuna H3K4me3 on ülerepresenteeritud tavaliselt aktiivsete promootorite regioonides (Heintzman jt., 2007), siis võib see tähendada seda, et vastusena mtEcoBI poolt põhjustatud stressile reorganiseeritakse ka globaalne transkriptsioon märkimisväärselt.

*Drosophila* mtEcoBI kaudu indutseeritud mtDNA stress viib küll RNA ja valkude metülatsiooni muutustele, kuid need on kompleksamad kui esialgu eeldatud otsene seos seriini kontsentratsiooni tõusu ja metülatsiooni suurenemise vahel. Et välja selgitada, kuidas täpsemalt ning mis põhjustel need modifikatsioonide muutused on tekkinud vastusena sellisele mtDNA stressisüsteemile, on vaja täpsemalt analüüsida spetsiifiliste valkude ja teiste histoonide lüsiinide modifitseerituse taset kui ka detekteerida muutuste jaotust erinevate RNA-de tüüpide (näit. tsütosoolsed vs, mitokondriaalsed) vahel, fraktsioneerides neid enne HPLC analüüsi.

## KOKKUVÕTE

Meie uurimisgrupi varasem töö on näidanud, et mtDNA manipuleerimine *in vivo* tüüp I bakteriaalse restriksiooni endonukleaasi mtEcoBI-ga viib muuhulgas ka seriini taseme tõusuni. Kuna seriin on oluline osa ühesüsinikulises metabolismis, millel on keskne tähtsus epigeneetikas ning post-translatsioonilistes modifikatsioonides, võivad nende modifikatsioonide muutused olla viisiks, kuidas kommunikeeritakse mtDNA stressi muutusi üldisele metabolismile.

Lõputöö eesmärgiks oli välja selgitada, kas mitokondriaalsest stressist tuleneavad seriini metabolismi muutused mõjutavad kvantitatiivselt ja/või kvalitatiivselt valkude ja RNA metülatsiooni. Selleks uurisin *Drosophila melanogasteris* RNA nukleosiidide metülatsiooni, valkude üldist mono- ja dimetülatsiooni ja histoon 3 lüsiin 4 spetsiifilist trimetülatsiooni (H3K3me3).

RNA nukleosiidide metülatsioon oli sellise mtDNA stressisüsteemi puhul kas langenud või jäi samaks. Kõige suuremat metülatsiooni efekti muutust nägi guanosiini puhul (m1G, m2G, m7G). RNA nukleosiidide taseme langus võib olla seotud TCA tsükli metaboliidi 2-oksoglutaraadiga (2-OG), mis on muu hulgas kofaktoriks 2-oksoglutaraat-sõltuvate dioksügenaaside (2-OGDD) perekonna demetülaasidele, sest varasem töö meie uurimisgrupis on näidanud, et 2-OG tase sellise mtDNA stressisüsteemi puhul on tõusnud.

Valkude üldise mono- ja dimetülatsiooni katsete tulemus oli ebahütlane. Metülatsiooni efekt oli langenud translokatsiooniliselt aktiivse mtEcoBI-ga *Drosophila* tüves, kuid jäi samaks täisfunktsionaalse mtEcoBI-ga *Drosophila* tüves võrreldes kontrolltüvega. Katse tulemuses oli näha aga 40 kDa suuruse valgu metülatsiooni erinevat taset võrreldes globaalse tasemega. Seetõttu otsustasin uurida ka valke spetsiifilisemalt ja tegin katse, et näha kas H3K4me3 tase on muutunud.

H3K4me3 puhul oli hästi näha metülatsiooni taseme tõusu, mis on põhjustatud mtDNA modifitseerimisest mtEcoBI translokatsioonilise aktiivsuse poolt. See annab alust oletada, et selle modifikatsiooni puhul piisab endonukleaasil ainult translokatsioonilisest aktiivsusest, et metülatsioonimustreid muuta ning seeläbi põhjustada muutusi nukleoidi struktuuris, lõhkudes mtDNA-valk kontakte ja muutes mtDNA topoloogiat. Samuti on teada, et H3K4me3 modifikatsioon on tavaliselt ülerepresenteeritud aktiivsete promootorite regioonides. Seega võib H3K4me3 taseme tõus viidata ka globaalse transkriptsiooni reorganisatsioonile.

## SUMMARY

Previous work done by our research group has shown that mtDNA manipulation *in vivo* with a type I bacterial restriction endonuclease mtEcoBI leads to an increase in serine levels. As serine plays an important role in one-carbon metabolism, which is central to epigenetics and post-translational modifications, changes in these modifications may be a way to communicate changes in mtDNA stress to overall metabolism.

The aim of this thesis was to find out whether changes in serine metabolism due to mitochondrial stress affect the methylation of proteins and RNA quantitatively and/or qualitatively. For that I analyzed RNA nucleoside methylation, histone 3 (H3) mono- and dimethylation and histone 3 lysine 4 specific trimethylation (H3K4me3) in *Drosophila melanogaster*.

The methylation of RNA nucleosides in such mtDNA stress system decreased or remained the same. The largest change on methylation effect was seen with guanosine (m1G, m2G, m7G). Decreased levels of RNA nucleoside methylation may be associated with the TCA cycle metabolite 2-oxoglutarate (2-OG), which is a cofactor for demethylases of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (2-OGDD) family. That may be because previous work done by our research group has shown increased levels on 2-OG in such mtDNA stress system.

The results of mono- and dimethylation experiments of proteins were inconsistent. The methylation effect was reduced in the *Drosophila* strain where mtEcoBI had only translocational activity (endo-) but remained the same in the *Drosophila* strain where mtEcoBI had both translocational and endonuclease activity (func.) compared to the control strain. However, the experiment showed a different level of methylation of the 40 kDa protein compared to the global level. Therefore, I decided to study the proteins more specifically and did an experiment with H3K4me3 to see if the levels of this modification had changed.

The experiment with H3K4me3 showed an increase in methylation levels due to modification of mtDNA by mtEcoBI translocational activity. This suggests that translocational activity of mtEcoBI alone is sufficient to alter methylation patterns and thereby cause changes in nucleotide structure, disrupting mtDNA-protein contacts and altering mtDNA topology. It is also known that H3K4me3 modification is usually overrepresented in regions of active promoters. Thus, an increased level of H3K4me3 may also indicate a reorganization of global transcription.

## **TÄNUSÕNAD**

Soovin tänada üldise ja mikroobiokeemia labori õppejõude ja töötajaid, kes suuremal või vähemal määral mulle töö tegemisel abikäe ulatasid. Eriline tänu kuulub juhendajale Priit Jõers, kes mind töö tegemisel igati toetas ning motiveeris.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2015). Molecular biology of the cell, 6th edition. New York: Garland Science.
- Alexandrov, A., Martzen, M. R. and Phizicky, E. M. (2002). Two proteins that form a complex are required for 7-methylguanosine modification of yeast tRNA. *RNA*, 8, 1253-1266.
- Bahhir, D., Yalgin, C., Ots, L., ... Jöers, P. (2019). Manipulating mtDNA in vivo reprograms metabolism via novel response mechanisms. *PLoS Genet.*, 15(10).
- Bao, X. R., Ong, S.-E., Goldberger, O., ... Mootha, V. K. (2016). Mitochondrial dysfunction remodels one-carbon metabolism in human cells. *eLife*, 5.
- Bateman, J. M., Perlman, P. S. and Butow, R. A. (2002). Mutational bisection of the mitochondrial DNA stability and amino acid biosynthetic functions of *Ilv5p* of budding yeast. *Genetics*, 161(3), 1043-1052.
- Beckingham, K. M., Armstrong, J. D., Texada, M. J., Munjaal, R. and Baker, D. A. (2005). *Drosophila melanogaster* - the model organism of choice for the complex biology of multi-cellular organisms. *Gravitational and Space Biology*, 18(2).
- Bharucha, K. N. (2009). The epicurean fly: using *Drosophila melanogaster* to study metabolism. *Pediatr. Res.*, 65(2), 132-137.
- Biamonti, G., Maita, L. and Montecucco, A. (2018). The Krebs cycle connection: reciprocal influence between alternative splicing programs and cell metabolism. *Front. Oncol.*, 8(408).
- Botham, K. M. and Mayes, P. A. (2018). The respiratory chain & oxidative phosphorylation. *In* V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly and P. A. Weil, *Harper's Illustrated Biochemistry*, 31e. New York: McGraw-Hill Education.
- Calvo, S. E., Clauser, K. R. and Mootha, V. K. (2016). MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D1251-D1257.
- Caruana, N. J. and Stroud, D. A. (2020). The road to the structure of the mitochondrial respiratory chain supercomplex. *Biochem. Soc. Trans.*, 48(2), 621-629.
- Caygill, E. E. and Brand, A. H. (2016). The GAL4 System: A versatile system for the manipulation and analysis of gene expression. p. 33-52. *In* C. Dahmann, *Drosophila: methods and protocols*. New York: Springer Science+Business Media.
- Chandel, N. S. (2015). Evolution of mitochondria as signaling organelles. *Cell Metab.*, 22(2), 204-206.
- Chen, X., Wang, X. and Butow, R. A. (2007). Yeast aconitase binds and provides metabolically coupled protection to mitochondrial DNA. *PNAS*, 104(34), 13738-13743.

- Chen, X., Wang, X., Kaufman, B. A. and Butow, R. A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science*, 307(5710), 714-717.
- Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. and Mann, M. (2014). The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15(8), 536-550.
- Ciesielski, G. L., Nadalutti, C. A., Oliveira, M. T., Jacobs, H. T., Griffith, J. D. and Kaguni, L. S. (2018). Structural rearrangements in the mitochondrial genome of *Drosophila melanogaster* induced by elevated levels of the replicative DNA helicase. *Nucleic Acids Res.*, 46(6), 3034-3046.
- Crump, N. T., Hazzalin, C. A., Bowers, E. M., Alani, R. M., Cole, P. A. and Mahadevan, L. C. (2011). Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionarily conserved and mediated by p300/CBP. *PNAS*, 108(19), 7814-7819.
- Davis, S. R., Stacpoole, P. W., Williamson, J., Kick, L. S., Quinlivan, E. P., Coats, B. S., ... Gregory III, J. F. (2003). Tracer-derived total and folate-dependent homocysteine remethylation and synthesis rates in humans indicate that serine is the main one-carbon donor. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 286(2), E272-E279.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, 34(1-2), 1-15.
- Durigon, R., Mitchell, A. L., Jones, A. W., ... Spinazzola, A. (2018). LETM1 couples mitochondrial DNA metabolism and nutrient preference. *EMBO Mol. Med.*, 10(9).
- Farrow, S. C. and Facchini, P. J. (2014). Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Front. Plant Sci.*, 5(524).
- Fedeles, B. I., Singh, V., Delaney, J. C., Li, D. and Essigmann, J. M. (2015). The AlkB family of Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases: repairing nucleic acid alkylation damage and beyond. *J. Biol. Chem.*, 290(34), 20734-20742.
- Firman, K. and Szczelkun, M. D. (2000). Measuring motion on DNA by the type I restriction endonuclease EcoR124I using triplex displacement. *EMBO J.*, 19(9), 2094-2102.
- Frezza, C. (2017). Mitochondrial metabolites: undercover signalling molecules. *Interface Focus*, 7(2).
- Gehrke, C. W. and Kuo, K. C. (1989). Ribonucleoside analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 471, 3-36.
- Gerhold, J. M. (2018). Mitokondrid. p. 677 *In* T. Maimets and S. Kuuse, *Rakubioloogia*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.

- Gong, F., Clouaire, T., Aguirrebengoa, M., Legube, G. and Miller, K. M. (2017). Histone demethylase KDM5A regulates the ZMYND8–NuRD chromatin remodeler to promote DNA repair. *J. Cell Biol.*, 216(7), 1959-1974.
- Goto, Y. (1995). Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve Suppl.*, 3, S107-S112.
- Greer, E. L. and Shi, Y. (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.*, 13(5), 343-357.
- Götz, A., Tyynismaa, H., Euro, L., ... Suomalainen, A. (2011). Exome sequencing identifies mitochondrial alanyl-tRNA synthetase mutations in infantile mitochondrial cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 88(5), 635-642.
- Hassinen, I. (2007). Regulation of mitochondrial respiration in heart muscle. p. 3-26. *In* S. W. Schaffer and M. S. Suleiman, *Mitochondria: the dynamic organelle*. New York: Springer Science + Business Media.
- Hausinger, R. P. (2004). Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 39(1), 21-68.
- Heinaru, A. (2012). *Geneetika: õpik kõrgkoolidele*. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., ... Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genet.*, 39, 311-318.
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J. M. and Spelbrink, J. N. (2014). To be or not to be a nucleoid protein: A comparison of mass- spectrometry based approaches in the identification of potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie*, 100, 219-226.
- Iacobazzi, V. and Infantino, V. (2014). Citrate—new functions for an old metabolite. *Biol. Chem.*, 395(4), 387-399.
- Janscak, P., MacWilliams, M. P., Sandmeier, U., Nagaraja, V. and Bickle, T. A. (1999). DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes. *EMBO J.*, 18(9), 2638-2647.
- Jiang, D., Zhao, L., Clish, C. B. and Clapham, D. E. (2013). Letm1, the mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf–Hirschhorn syndrome. *PNAS*, 110(24), E2249-E2254.
- Kaufman, B. A., Durisic, N., Mativetsky, J. M., Costantino, S., Hancock, M. A., Grutter, P. and Shoubridge, E. A. (2007). The Mitochondrial Transcription Factor TFAM Coordinates the Assembly of Multiple DNA Molecules into Nucleoid-like Structures. *Mol. Biol. Cell*, 18, 3225-3236.

- Kennelly, P. J. (2018). The Biochemical Roles of Transition Metals. *In* V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, & P. A. Weil, Harper's Illustrated Biochemistry, 31e. New York: McGraw-Hill Education.
- Kennelly, P. J. (2018). The Biochemistry of Aging. *In* V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, & P. A. Weil, Harper's Illustrated Biochemistry, 31e. New York: McGraw-Hill Education.
- Kucej, M., Kucejova, B., Subramanian, R., Chen, X. and Butow, R. A. (2008). Mitochondrial nucleoids undergo remodeling in response to metabolic cues. *J. Cell Sci.*, 121, 1861-1868.
- Kukat, C. and Larsson, N.-G. (2013). mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. *Cell Press*, 23(9), 457-463.
- Kukat, C., Davies, K. M., Wurm, C. A., ... Larsson, N.-G. (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *PNAS*, 112(36), 11288-11293.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.*, 13.
- Labuschagne, C. F., van der Broek, N. J., Mackay, G. M., Vousden, K. H. and Maddocks, O. D. (2014). Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep.*, 7(4), 1248-1258.
- Ladoukakis, E. D. and Zouros, E. (2017). Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. *J. Biol. Res.*, 24(2).
- Laukka, T., Mariani, C. J., Ihantola, T., Cao, J. Z., Hokkanen, J., Kaelin, Jr, W. G., ... Koivunen, P. (2016). Fumarate and succinate regulate expression of hypoxia-inducible genes via TET enzymes. *J. Biol. Chem.*, 291(8), 4256-4265.
- Lee, J. V., Carrer, A., Shah, S., ... Wellen, K. E. (2014). Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell histone acetylation. *Cell Metab.*, 20(2), 306-319.
- Lewis, S. C., Uchiyama, L. F. and Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science*, 353(6296).
- Li, J. N. and Björk, G. R. (1999). Structural alterations of the tRNA(m1G37)methyltransferase from *Salmonella typhimurium* affect tRNA substrate specificity. *RNA*, 5(3), 395-408.
- Liang, C., Ahmad, K. and Sue, C. M. (2014). The broadening spectrum of mitochondrial disease: Shifts in the diagnostic paradigm. *Biochim. Biophys. Acta*, 1840(4), 1360-1367.
- Loenen, W. A., Dryden, D. T., Raleigh, E. A. and Wilson, G. G. (2013). Type I restriction enzymes and their relatives. *Nucleic Acids Res.*, 42(1), 20-44.

- Lucas, S., Chen, G., Aras, S. and Wang, J. (2018). Serine catabolism is essential to maintain mitochondrial respiration in mammalian cells. *Life Sci. Alliance*, 1(2).
- Lushchak, O. V., Piroddi, M., Galli, F. and Lushchak, V. I. (2014). Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Rep.*, 9(1), 8-15.
- Macierzanka, M., Plotka, M., Pryputniewicz-Drobinska, D., Lewandowska, A., Lightowers, R. and Marszalek, J. (2008). Maintenance and stabilization of mtDNA can be facilitated by the DNA-binding activity of Ilv5p. *ScienceDirect*, 1783(1), 107-117.
- Martin, C. and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 838-849.
- Martinez, S., Hausinger, R. P. (2015). Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *J. Biol. Chem.*, 290(34), 20702-20711.
- Martinez-Reyes, I. and Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.*, 11(102).
- Matilainen, O., Quirós, M. P. and Auwerx, J. (2017). Mitochondria and epigenetics – crosstalk in homeostasis and stress. *Trends Cell Biol.*, 27(6), 453-463.
- Meyer, V. R. (2013). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons.
- Morris, A. A., Leonard, J. V., Brown, G. K., ... Turnbull, D. M. (1996). Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of leigh disease. *Ann. Neurol.*, 40(1), 25-30.
- Murray, N. E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(2), 412-434.
- Newman, A. C. and Maddocks, O. D. (2017). Serine and Functional Metabolites in Cancer. *Trends Cell Biol.*, 27(9), 645-657.
- Nikkanen, J., Forsström, S., Euro, L., ... Suomalainen, A. (2016). Mitochondrial DNA replication defects disturb cellular dNTP pools and remodel one-carbon metabolism. *Cell Metab.*, 23(4), 635-648.
- Nunnari, J. and Suomalainen, A. (2012). *Mitochondria: In Sickness and in Health*. Cell Press, 148(6), 1145-1159.
- Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H. and Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *PNAS*, 98(2), 12596-12601.
- Pett, W., Ryan, J. F., Pang, K., Mullkin, J. C., Martindale, M. Q., Baxevanis, A. D. and Lavrov, D. V. (2011). Extreme mitochondrial evolution in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*: Insight from mtDNA and the nuclear genome. *Mitochondrial DNA*, 22(4), 130-142.

- Pierce, S. B., Chisholm, K. M., Lynch, E. D., Lee, M. K., Walsh, T., Opitz, J. M., ... King, M.-C. (2011). Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. *PNAS*, 108(16), 6543-6548.
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F. and Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.*, 21(6), 805-821.
- Reeves, R. (2010). HMG nuclear proteins: linking chromatin structure to cellular phenotype. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1799(1-2), 3-14.
- Roote, J. and Prokop, A. (2013). How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics. *G3 (Bethesda)*, 3(2), 353-358.
- Ros, S. and Schulze, A. (2013). Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6- biphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metab.*, 1(1), 8.
- Schaffer, S. W. and Suleiman, M.-S. (2007). *Mitochondria: the dynamic organelle*. New York: Springer Science & Business Media.
- Sciacovelli, M. and Frezza, C. (2016). Oncometabolites: unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. *Free Radic. Biol. Med.*, 100, 175-181.
- Sciacovelli, M., Goncalves, E., Johnson, T. I., ... Frezza, C. (2016). Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*, 537, 544-547.
- Scialo, F., Sriram, A., Stefanatos, R. and Sanz, A. (2016). Practical recommendations for the use of the GeneSwitch Gal4 system to knock-down genes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 11(8).
- Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A. and Dontsova, O. A. (2007). Ribosomal RNA guanine-(N2)-methyltransferases and their targets. *Nucleic Acids Res.*, 35(7), 2295-2301.
- Shokolenko, I. N., Ledoux, S. P. and Wilson, G. L. (2007). Mitochondrial DNA damage and repair. p. 323-347. *In* S. W. Schaffer and M. S. Suleiman (ed.), *Mitochondria: The Dynamic Organelle*. New York: Springer Science + Business Media.
- Sivanand, S., Viney, I. and Wellen, K. E. (2017). Spatiotemporal control of acetyl-CoA metabolism in chromatin regulation. *Trends Biochem. Sci.*, 43(1), 61-74.
- Smith, A. C. and Robinson, A. J. (2016). MitoMiner v3.1, an update on the mitochondrial proteomics database. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1), D1258-D1261.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. and Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Third Edition. John Wiley & Sons.
- Spinelli, J. B. and Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol.*, 20, 745-754.

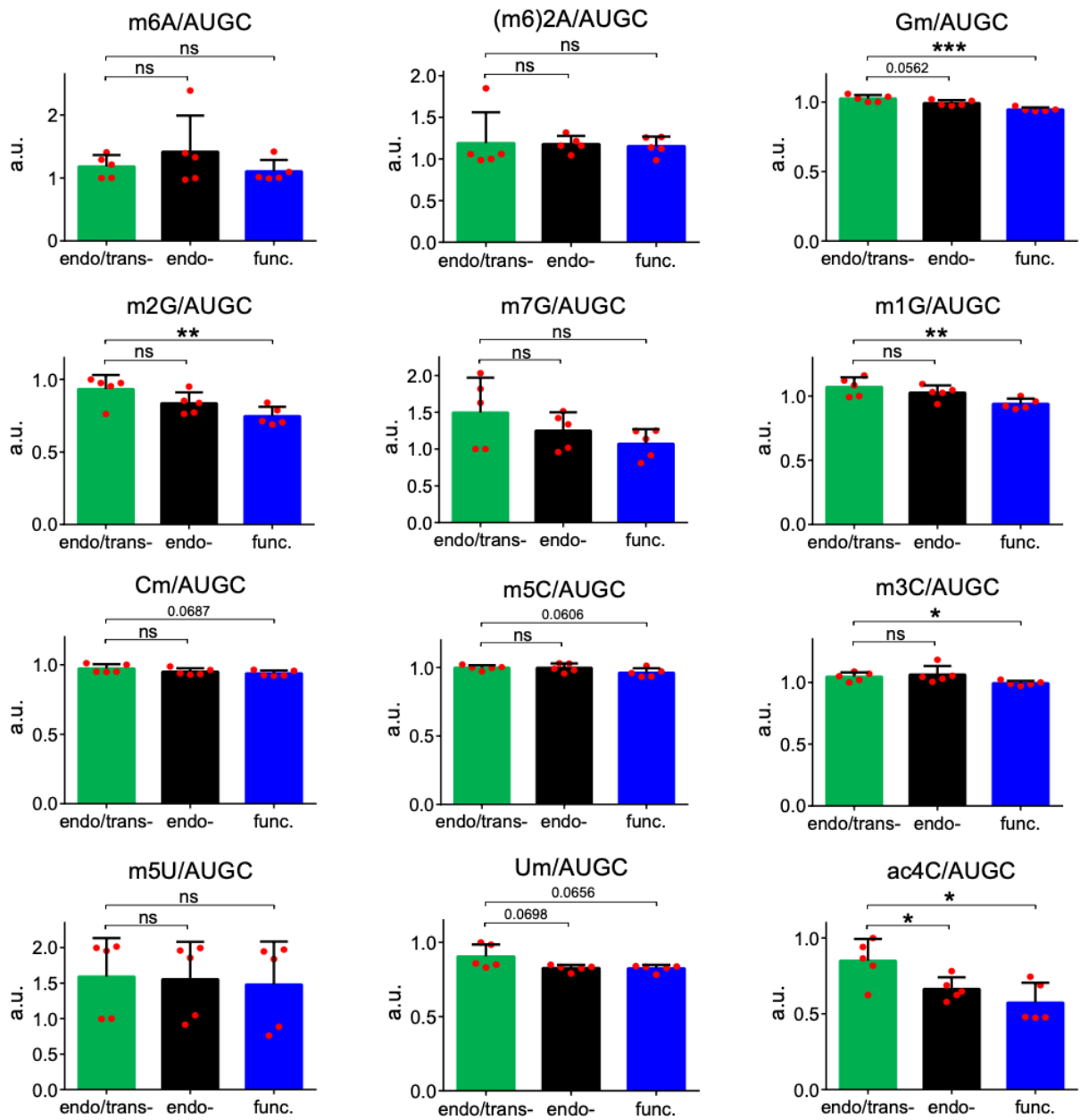
- Subramanian, M., Srinivasan, T. and Sudarsanam, D. (2014). Examining the Gm18 and m1G Modification Positions in tRNA Sequences. *Genomics Inform.*, 12(2), 71-75.
- Suomalainen, A. and Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.*, 19, 77-92.
- Zeng, J. D., Wu, W. K., Wang, H. Y. and Li, X. X. (2019). Serine and one-carbon metabolism, a bridge that links mTOR signaling and DNA methylation in cancer. *Pharmacol. Res.*, 149.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, 15, 2343-2360.
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L. and Yu, Z. B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 44(1), 3-15.
- Zheng, G., Qin, Y., Clark, W. C., Dai, Q., Yi, C., He, C., ... Pan, T. (2015). Efficient and quantitative high-throughput transfer RNA sequencing. *Nature Methods*, 12(9), 835-837.
- Tibbetts, A. S. and Appling, D. R. (2010). Compartmentalization of mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 30, 57-81.
- Vafai, S. B. and Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature*, 491(7424), 374-383.
- Wallace, D. C. and Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(11).
- Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., .. Nikoskelainen, E. K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242(4884), 1427-1430.
- Van Houten, B., Woshner, V. and Santos, J. H. (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair*, 5(2), 145-152.
- Vartak, R., Deng, J., Fang, H. and Bai, Y. (2015). Redefining the roles of mitochondrial DNA-encoded subunits in respiratory Complex I assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 1852(7), 1531-1539.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 872-884.
- Ylikallio, E. and Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann. Med.*, 44(1), 41-59.

## KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

- 1) *Addgene Blog: Quick Guide to Working with Drosophila Part 2: Controlling Gene Expression in Flies with Gal4/UAS* (2017). Kasutatud 24.10.19 <https://blog.addgene.org/quick-guide-to-working-with-drosophila-part-2-controlling-gene-expression-in-flies-with-gal4/uas>
- 2) *IDF Diabetes Atlas, 9th edition: Worldwide toll of diabetes* (2019). Kasutatud 16.05.20 <https://diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html>
- 3) *IDF Diabetes Atlas, 9th edition: Individual, social and economic impact* (2019). Kasutatud 16.05.20 <https://diabetesatlas.org/en/sections/individual-social-and-economic-impact.html>

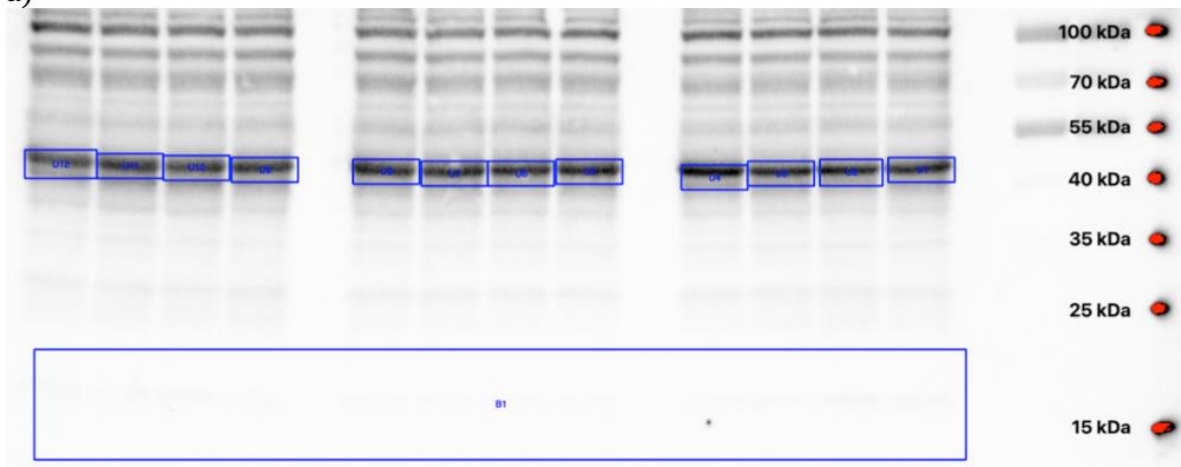
## LISAD

**Lisa 1. RNA modifikatsioonide tulemused normaliseeritud kogu nukleosiidide kontsentratsioonide summa vastu.**

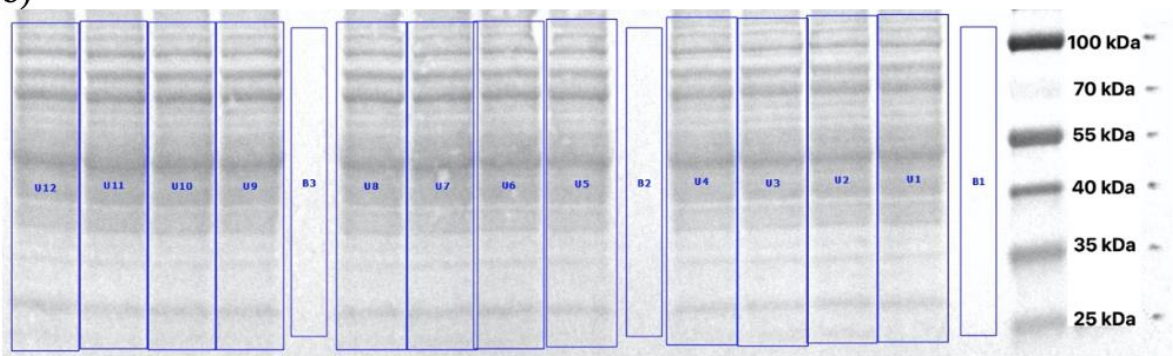


**Lisa 2. 40 kDa suuruse valgu kvantifitseerimine.** a) metüleeritud lüsiini Western b) Ponceau S värvitud c) statistiline analüüs

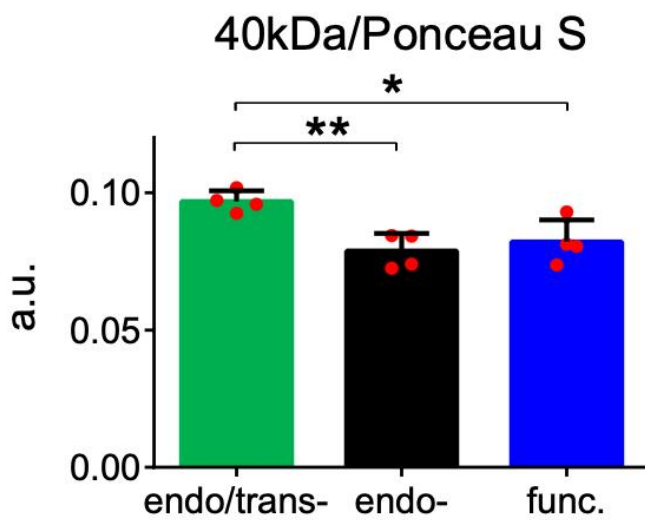
a)



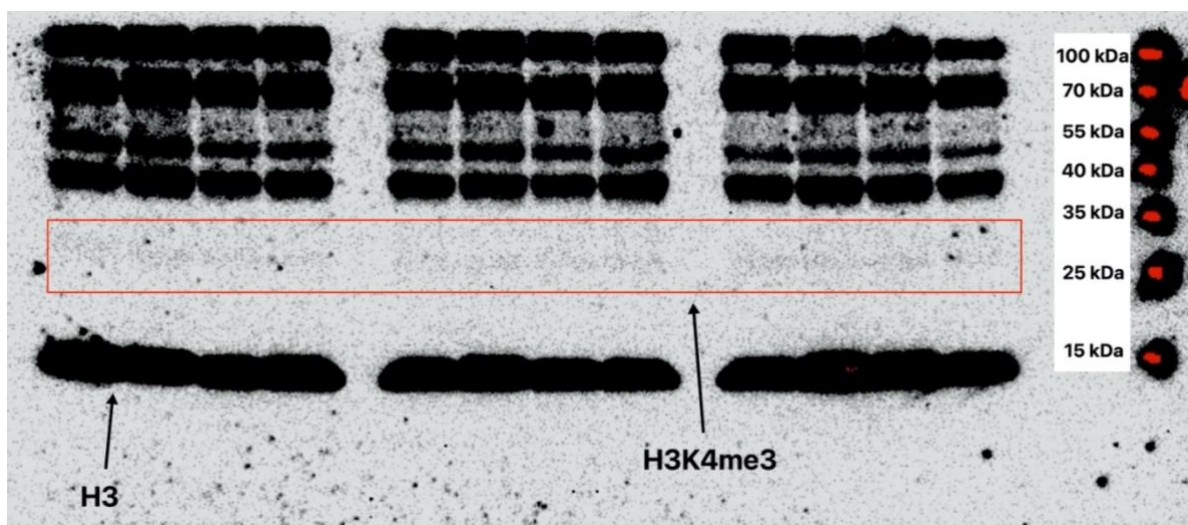
b)



c)



**Lisa 3. Histoon 3 üleeksoneeritud Western.** Pildil on näha õrnalt ka trimetüleeritud H3 jooksmit geelil 25kDa juures (tähistatud punase kastiga)



## **LIHTLITSENTS**

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

Mina, Susanna Janno

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Mitokondriaalsest stressist põhjustatud seriini metabolismi muutuste mõju epigeneetikale ja post-translatsioonilistele modifikatsioonidele“,

mille juhendaja on dotsent Priit Jõers,

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

Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Susanna Janno*

**08.06.2020**