

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Koit Aasumets

**Mitokondriaalsete DNA-valk komplekside (nukleoidide) koosluse
määramiseks vajalike eraldamisskeemide optimeerimine**

Bakalaureusetöö

Juhendaja dotsent Joachim Matthias Gerhold

Tartu 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Mitokonder.....	7
1.2 Mitokondriaalne DNA	8
1.3 Mitokondriaalsed nukleoidid ja mtNAP-id.....	10
1.3.1 mtDNA replikatsioon, transkriptsioon ja reparatsioon	10
1.3.2 Mitokondrite segregatsioon ja nukleoidid.....	12
1.4 Nukleoidide isoleerimine ja mtNAP-ide tuvastamine	12
1.4.1 mtDNA seostusvalgud.....	13
1.4.2 Mitokondriaalsed haigused	13
1.4.3 Probleemid nukleoproteiinkomplekside uurimisel.....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärk.....	19
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1 Rakuliinid, sööde ja detergendid.....	19
2.2.2 Mitokondrite eraldamine HEK293e rakkudest	20
2.2.3 Totaalse mitokondriaalse valguga hulga mõõtmine Bradford'i meetodil.....	20
2.2.4 I fraktsiooni lüüsimine detergentidega.....	21
2.2.5 Mitokondrite puhastamine sahharoosi gradiendiga.....	22
2.2.6 12% SDS polüakrüülamiid geelelektroforees	23
2.2.7 Western blotting	23
2.2.8 Flotatsioon.....	25
2.2.9 DNA analüüs (dot blot ja Southern hübriidatsioon).....	26
2.3. Tulemused ja arutelu.....	28
2.3.1 I fraktsiooni ja puhaste mitokondrite lüüsimised	28
2.3.1 Flotatsioon n-dodetsüül- β -D-maltosiidiga	32

3. KOKKUVÕTE	35
SUMMARY	36
LISAD	38
Lisa 1 Töölahused	38
Lisa 2 Antikehad	41
Lisa 3 PCR programm	41
ALLIKAD	42
TÄNUAVALDUSED.....	48
LIHTLITSENTS.....	49

KASUTATUD LÜHENDID

AAm/BAAm - akrüülamiid/bisakrüülamiid

APE 1 - apuriin/apürimidiin endonukleas 1

BER - aluse väljalõikereparatsioon

BSA - veise seerumalbumiin

BrdU - 5-bromo-2-desoksüridiin

CBB - Coomassie briljantsinine

COS 7 - *Cercopithecus aethiops* neerurakud (SV40 transformeeritud)

COX II - tsütokroom c oksüdaas II subühik

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenüülindool

DDM - n-dodetsüül- β -D-malosiid

DMEM - Dulbecco modifitseeritud Eagles meedium

DMSO - dimetüülsulfoksiid

DTT - ditiotreitool

ECL - võimendatud kemiluminestsents

FBS - veise looteserum

HEK293 - inimese embrüonaalsed neerurakud

HeLa - inimese epiteeliaalse kartsinoomi rakuliin

HRP - mädarõika peroksidaas

LC-MS/MS - vedelkromatograafia-tandem mass-spektromeetria

MAM - mitokondritega assotsieerunud membraanid

MMR - DNA paardumisvigade reparatsioon

mTERF - mitokondriaalne transkriptsiooni terminatsioonifaktor

mtNAPs - mitokondriaalsete nukleoididega seotud valgud

mtSSB - mitokondriaalne üheaahelalist DNAd siduv valk

NAPS - naatriumpersulfaat

OPA1 - optiline atroofia 1 (autosomaalne dominantne)

PBS - fosfaatpuhverdatud soolalahus

PMSF - fenüülmetaansulfonüülfluoriid

POLG - polümeraas γ (gamma)

SDS-PAGE - naatrium dodetsüülsulfaat-poliakrüülamiid geelektroforees

SSBR - üheaheelaliste katkete reparatsioon

SSC - naatriumkloriid-naatriumtsitraat

TBST - Tris-puhverdatud sool Tween 20 lisandiga

TEMED - tetrametüületüleendiamiin

TFAM - mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A

VDAC 1 - pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1 (mitokondriaalne poriin)

SISSEJUHATUS

Mitokondrid on eukariootse raku organellid, mis vastutavad mitmete rakule eluliselt oluliste funktsioonide eest. Raku füsioloogia sõltub mitmetest bioenergeetilistest protsessidest, kusjuures üle 90% energiast, mida rakud vajavad oma füsioloogilise tasakaalu säilitamiseks, saab alguse mitokondritest. Seetõttu on selle organelli respiratoorsel funktsioonil väga oluline osa eukariootse raku elutegevuses. Peale selle on mitokondritel tähtis roll kaltsiumi homöostaasi säilitamisel (Vandecasteele jt, 2001), mitmete metaboliitide tootmisel ja ümbertöötlemisel ning ka apoptoosis (Newmeyer jt, 2003).

Imetajate mitokondritel on tsirkulaarne DNA, millelt kodeeritakse ülekaalukalt energiatootmisprotsessideks vajalikke valke. Praeguseks on kindel, et mitokondriaalne DNA (mtDNA) esineb rakkudes kompleksis valkudega. Vastavaid komplekse on teaduslikus kirjanduses nimetatud nukleoidideks, kuid täpne nukleoidi definitsioon ning kompositsioon on praegu ebaselgelt presenteeritud.

Imetajate mtDNA-d on hakatud viimastel kümnenditel intensiivsemalt uurima just selleks, et paremini mõista mtDNA geneetikat inimestel avalduvate haiguste kontekstis. Võrreldes nukleaarse DNA-ga on mtDNA-l üle kümne korra kõrgem mutatsioonisagedus. On ilmselge, et oksüdatiivne kahjustus on üks peamistest DNA-s esinevate vigastuste põhjustajatest (Lan, 2004).

Mitokondriaalsed nukleoidid on dünaamilised struktuurid ning paljud valgud on erineval moel nukleoididega seotud. Paljud identifitseeritud nukleoididega assotsieeritud valgud ei seonu ainult mtDNA-ga, vaid ka kaudsete valk-valk interaktsioonide teel. Seega on oluline välja töötada nukleoidide eraldamisskeemid, et paremini mõista ja uurida erinevate valkude dünaamilist käitumist nukleoididega seondumise käigus. Lisaks on vaja paika panna piir, alates millest on tegemist nukleoididega seotud valkudega ja mis tuleks lugeda „saastuseks“. Sellest tulenevalt on võimalik hõlpsamalt defineerida, mis nukleoidid tegelikult on.

Käesoleva töö teoreetilise osa eesmärk on anda ülevaade mitokondriaalsest DNA-st ja selle rollist mitokondriaalsete haiguste kujunemises, mtDNA-valk komplekside (nukleoidide) kirjeldamise senistest takistustest ja edusammudest ning perspektiividest. Eksperimentaalse osa ülesandeks on välja töötada mitokondrite ja nukleoidide isoleerimisskeemid ning lisaks ka uurida mitokondrite väljapuhastamisel saadud fraktsioonide vahelisi erinevusi.

Märksõnad: mitokondriaalne DNA, nukleoid, eraldamisskeemid, TFAM, mtSSB

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

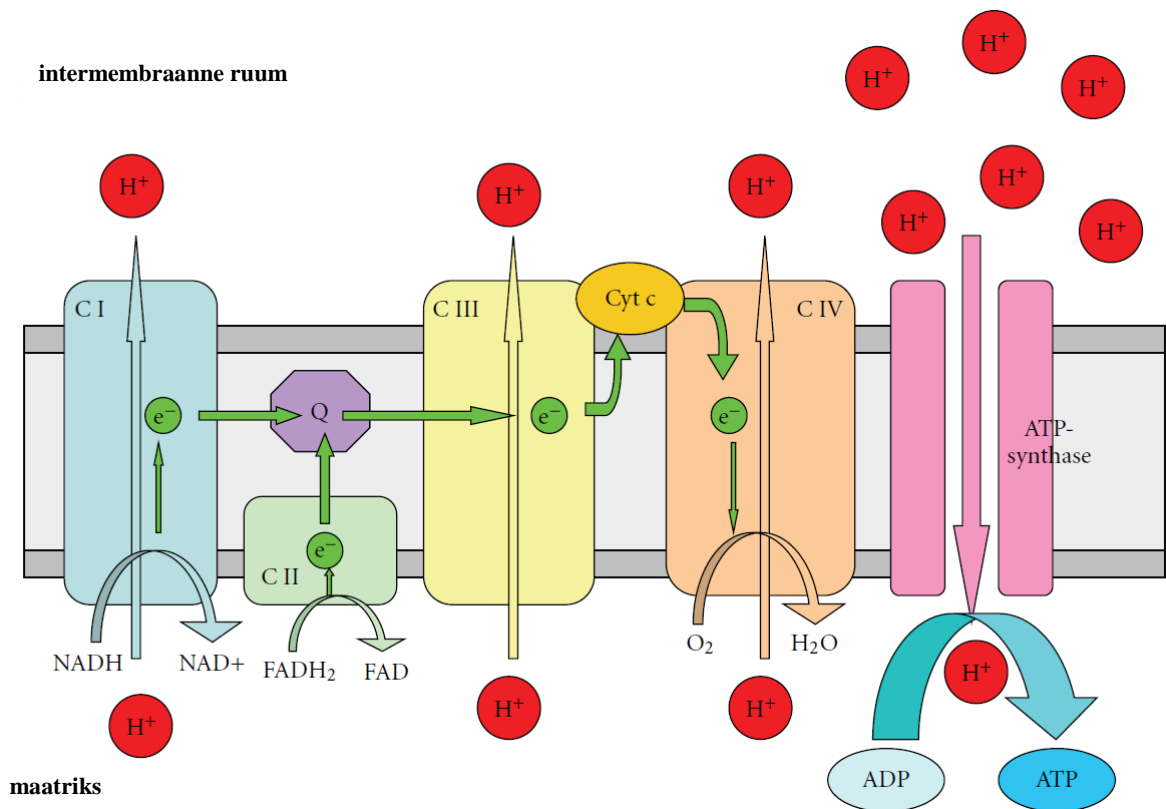
1.1 Mitokonder

Enimaktsepteeritud evolutsiooniteooria kohaselt on mitokondrid moodustunud eukarüootse raku ja α -proteobakteri (*Alphaproteobacteria*) vahelise endosümbioosi tulemusena, oletatavalt ~1,5 miljardi aasta eest (Busch, 2014).

Mitokondrid on peamiselt ATP sünteesimiseks spetsialiseerunud organelid, mistõttu kutsutakse neid ka raku energiajaamadeks. Oluline on, et energiat ei valmistata mitokondrites, vaid saadakse orgaanilistest ühenditest ning konverteeritakse ATP vormi mitokondrites.

Mitokondrid koosnevad neljast põhilisest kompartmentist: maatriks, unikaalne valgurikas sisemembraan, millel paiknevad ühtlasi DNA-valk kompleksid (nukleoidid), intermembraanne ruum ning välismembraan. Sisemembraan on voltunud arvukateks kristadeks ning sisemembraanis asuvad hingamisahela komponendid, mis on olulised makroergilise ühendi ATP sünteesimiseks. Respiratsiooni masinavärk mitokondrites on organiseeritud viieks valkkompleksiks: elektrontransportahela (ETC) kompleksid I kuni IV ning oksüdatiivse fosforüülimise (OXPHOS) kompleks V ehk ATP-süntaas.

Rakuline energiavalaadus adenosiintrifosfaat (ATP) genereeritakse toidust saadavatest ainetest. Tsütosoolist pärit püruvaat (glükolüüs) ja rasvhapped (lipolüüs) sisenevad mitokondritesse ning lõhustatakse seal atsetüül-CoA-ni. Atsetüül-CoA metaboliseeritakse mitokondri maatriksis asuvas tsitraaditsükli (TCA-s), seejuures NAD^+ redutseeritakse NADH-ks ning FAD FADH₂-ks. Oksüdatiivse fosforüülimise (vt joonis 1) käigus kantakse elektronid NADH-lt ja FADH₂-lt üle ETC kuni hapnikuni. See elektronide transport genereerib mitokondri sisemembraanil prootongradiendi, mida kasutab ära ATP-süntaas ATP produtseerimiseks. Kui elektron liigub mööda ETC-d, vabastatakse osa energiast kolme hingamisahela kompleksi tööhoidmiseks, mis pumpavad H⁺ maatriksist välja. Sellest johtuv elektrokeemiline prootongradient mööda sisemembraani suunab H⁺ tagasi läbi ATP süntaasi (ka F₀F₁-ATPaas). Mitokondri maatriksis kasutab ATPaas H⁺ liikumisel tekkivat energiat ATP sünteesimiseks (ADP + P_i).



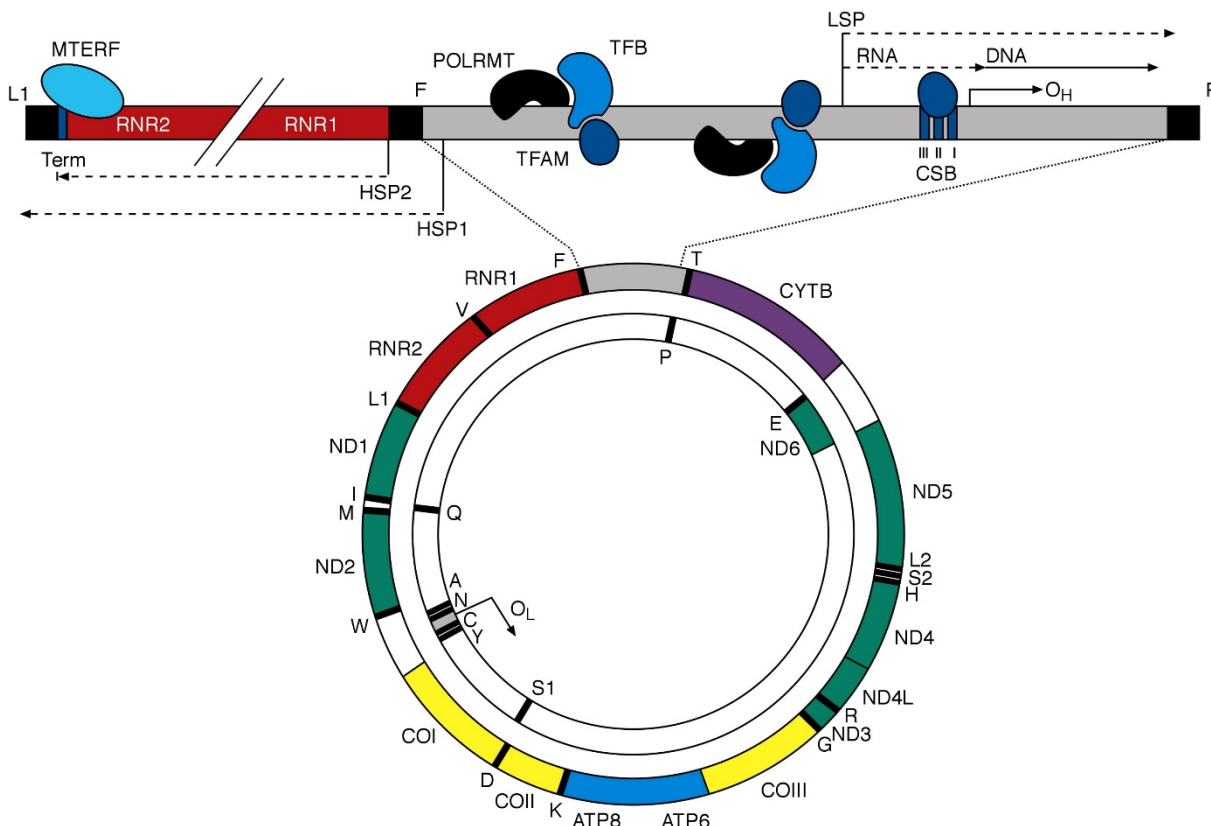
Joonis 1. Mitokondriaalne elektrontransportahel (Keane jt, 2011). Kompleksid I ja II (CI ja CII) transpordivad elektrone, mis saadakse NADH oksüdeerimisel NAD^+ -ks (CI) või FADH_2 oksüdeerimisel FAD-ks (CII) üle ubikinooni (Q), CIII, Cyt c (tsütokroom c) ja lõpuks üle CIV, mis omakorda kasutab elektrone O_2 konverteerimiseks veeks. Elektronide ülekandmisel pumpavad CI, III, ja IV prootoneid mitokondri maatriksist intermembraansesse ruumi (vertikaalsed jooned), mille tõttu moodustub H^+ -gradient. Seda gradienti kasutab ära ATP-süntaas (kompleks V) ATP sünteesimiseks ADP-st.

1.2 Mitokondriaalne DNA

Eukarüootsetel rakkudel esineb 2 kuni 3 genoomi. Imetajatel on lisaks nuklearsele genoomile mitokondriaalne genoom, kuid näiteks taimedel on esindatud ka kloroplastide genoom.

Imetajate mitokondriaalne DNA on ~16,6 kb suurune tsirkulaarne molekul, mis kodeerib järgmisi gene: kaks rRNA-d (*MT-RNR1*, *MT-RNR2*), 22 tRNA-d ning 13 hädavajalikku hingamisahela subühikut (NADH-dehüdrogenaasi geenid *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6*; koensüüm Q - tsütokroom c reduktaas/tsütokroom b geen *MT-CYB*; tsütokroom c oksüdaasi geenid *MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3*; ATP-süntaasi geenid *MT-ATP6*, *MT-ATP8*). Kokku kodeeritakse mtDNA pealt 37 geeni (vt joonis 3), mis moodustab vaid ~0,1% inimese geenide koguarvust (Holt jt, 2007).

Võrreldes tuuma DNA-ga puuduvad mitokondriaalses DNA-s intronid ning seega saadakse polütsistronsed transkriptid, mistõttu on mtDNA väga väike ja kompaktne. Selline suur hulk gene mahub sinna kattuvate geenide piirkondade esinemise tõttu.



Joonis 2. Inimese mitokondriaalne DNA. Diagrammil on skemaatiliselt kujutatud 16,6 kb suurune tsirkulaarne kaheaahelaline mitokondriaalne DNA, seejuures on suurendatud vaates imetaja D-ling (ingl D-loop) (replikatsiooni ja transkriptsiooni initsiatsiooniregioon) ning transkriptsiooni terminatsiooniregioonid. Sisemine ring tähistab L ahelat (ingl *light strand*) ning välimine ring H ahelat (ingl *heavy strand*). Inimese mtDNA kodeerib 2 mt-rRNAd (joonisel punane), 22 mt-tRNAd (mustad üksikute tähtedega jooned) ning 13 hädavajalikku hingamisahela komponenti: *ND1* kuni *ND4* ja *ND4L* (NADH dehüdrogenaasi geenid), kompleks I subühikud (roheline), *CYTB* (tsütokroom b geen), kompleks III subühik (lilla), *COI* kuni *COIII* (tsütokroom c oksüdaasi geenid), kompleks IV katalüütilised subühikud (kollane), ning *ATP6* ja *ATP8* (ATP-süntaasi geenid), kompleks V subühikud (sinine). Peamised genoomi mittekodeerivad alad (hall) kätkevad endas 1.1 kb D-lingu ja L-ahela replikatsiooni (originiti) alguspunkti (OL). H-ahela replikatsiooni origin on näidatud D-lingu sees (OH). (Tuppen jt, 2010)

1.3 Mitokondriaalsed nukleoidid ja mtNAP-id

Tüüpilises eukarüootses rakus on 1000 kuni 10 000 koopiat mtDNA-d. Mitokondriaalsed nukleoidid on mtDNA-valk kompleksid, mida peetakse ühtlasi mtDNA päritavaks üksuseks, sisaldades enamasti 1 kuni 2 mtDNA molekuli. Kuid täpne valgulistele komponentide kooslus selles üksuses on siiani vähe defineeritud (Spelbrink, 2010).

Praeguseks on tuvastatud erinevate nukleoidide isoleerimismeetoditega suur hulk potentsiaalseid nukleoididega seotud valke, kuid pole selge, kas ka kõik need valgud on nukleoididega permanentselt seotud. Ilmne on see, et enamik neist valkudest, mis osalevad mtDNA replikatsioonis, transkriptsioonis ja reparatsioonis on mingil teatud momendil otseselt seoses mtDNA-ga (st moodustavad nukleoidi). (Hensen jt, 2014)

Kokkuvõtvalt on nimetatud kõik valgud, mis interakteeruvad otseselt mtDNA-ga või mtDNA-ga seotud valkudega, terminiga mitokondriaalsete nukleoididega assotsieerunud valgud (ingl *mitochondrial nucleoid associated proteins*, mtNAPs), mis põhineb vastavalt kas biokeemilisel nukleoidi isoleerimisel ja valkude identifitseerimisel või mõnel muul, otsesemal mtDNA-ga seotuse demonstreerimisel (Hensen jt, 2014).

1.3.1 mtDNA replikatsioon, transkriptsioon ja reparatsioon

Imetajate mitokondriaalse DNA replikatsioon on väga spetsiifiline protsess, mis nõuab paljude replikatsioonifaktorite kooskõlastatud tööd, kuid neist täielikku ja lõplikku ülevaadet pole seni suudetud anda. mtDNA replikatsioonil toimub esmalt mitokondrite massi suurenemine, seejärel nukleoidid jagunevad või vabastavad mtDNA molekulid, et genereerida tütar nukleoidid. Seda on vaadeldud kasutades pildistamist teatud ajavahemiku jooksul (ingl *time-lapse imaging*) (Bereiter-Hahn jt, 1997; Iborra jt, 2004; Garrido jt, 2003; Rajala jt, 2014).

On teada, et minimaalne replisoom mitokondrites koosneb DNA helikaasist Twinkle (Spelbrink jt, 2001), DNA polümeraas γ (POLG) (Fridlender jt, 1972) ning üheaheelalist DNA-d siduvast valgust mtSSB (Hoke jt, 1990) (Falkenberg jt, 2007). Kuna imetajate mtDNA on tsirkulaarne, on vajalik ka mitokondriaalsete topoisomeraaside osalemine replikatsiooniprotsessis, et vähendada DNA torsionaalseid pingeid (Hensen jt, 2014). Praeguseks on teada üksainus imetajate mitokondriaalne topoisomeraas Top1mt (Zhang jt, 2001).

Transkriptsiooni masinavärk mitokondrites koosneb seni teadaolevalt mitokondriaalsest DNA sõltuvast RNA polümeraasist, DNA-d seondavast transkriptsioonifaktorist TFAM (Dairaghi

jt, 1995), mitokondriaalsest transkriptsioonifaktorist B2 (Falkenberg jt, 2002) ning mitokondriaalsest transkriptsiooni terminatsioonifaktorist (mTERF) (Kruse jt, 1989; Terziogue jt, 2013).

Senised uuringud on näidanud, et TFAM (ingl *mitochondrial transcription factor A*) taseme regulatsioon on oluline mtDNA koopiaarvu regulatsioonis, geeniekspressioonis ning ka nukleoidi pakkimisel (Pohjoismaki jt, 2006). TFAM funktsioneerib homodimeerinä (Kaufman jt, 2007) ning nii *in vitro* mõõtmised kui ka TFAM/mtDNA sadestamise andmed lubavad oletada, et tõenäoliselt toimub TFAM-dimeeri seondumine DNA-ga 35- kuni 40-aluspaarilise intervalliga (Takamatsu jt, 2002; Alam jt, 2003; Kaufman jt, 2007). Kasutades immuunofluorestsentsmeetodit kinnitati, et imetajate TFAM suurel määral kolokaliseerub mtDNA-ga *in situ* (Legros jt, 2004; Garrido jt, 2003; Alam jt, 2003; Rajala jt, 2014). Seega on TFAM-il imetajate mtNAP-idest lisaks transkriptsioonile oluline struktuurne roll mtDNA organiseerimisel nukleoididesse (Spelbrink, 2010). Analoogne funktsioon on näiteks tuumas histoonidel, mis pakivad nukleaarse DNA nukleosoomidesse.

Reparatsioonisüsteem omab mitokondrites olulist rolli mtDNA kaitsmises erinevate mutageenide eest (Hensen jt, 2014). Kui varem arvati, et mitokondrites puudub üldse DNA reparatsioon või on see väga rudimentaarne, siis praeguseks on teada, et mitokondrites on olemas üsnagi tõhusad reparatsiooniprotsessid: BER (ingl *base excision repair*) (Szczesny jt, 2008), SSBR (ingl *single-strand break repair*) (Kazak jt, 2012), MMR (ingl *mismatch repair*) (Mason jt, 2003) ning arvatavasti ka homoloogiline rekombinatsioon (Thyagarajan jt, 1996). Praeguseks on arvukalt teada erinevaid mitokondriaalseid reparatsioonifaktoreid, näiteks endonukleaas APE1 (Tomkinson jt, 1988), DNA ligaas III (Lakshminpathy jt, 1999), DNA glükosülaasid (Hu jt, 2005) ja mitmed teised. DNA reparatsioon mitokondrites sõltub suuresti tuuma DNA reparatsiooni masinavärgist, st kõik need reparatsioonirajad toimivad tuuma geenide poolt kodeeritud valkude abil, mis vajadusel transporditakse mitokondritesse (Kazak jt, 2012). Kui mtDNA kahjustused on parandamatud, toimub kas DNA, organelli või raku degradeerimine (Kazak jt, 2012). DNA-d ei pea ilmtingimata parandama, sest mitokondrites on tuhandeid koopiaid mtDNA-d (Robin jt, 1988). mtDNA degradeerimine on üsna tõhus meede, kuna mitokondrid ei suuda arvatavasti teatud tüüpi DNA kahjustustega toime tulla, näiteks UV-kiirguse poolt tekitatud purimidiini dimeerid ning mitmete kartsinogeenide tekitatud DNA liited (ingl *DNA lesions*) (Mita jt, 1988). Kuigi mitokondriaalne polümeraas γ on võimeline vältima tüüpi dimeere *in vitro* tingimustes pole teada, kas säherdune mehhanism leiab aset ka *in vivo* tingimustes (Kasiviswanathan jt, 2011). Mitokondrite degradeerimine leiab arvatavasti aset mitofaagia teel siis, kui eelnevad mehhanismid ei toimi

(Youle jt, 2011). Ees on veel palju tööd selgitamiseks detailselt kõiki erinevaid võimalusi DNA parandamiseks mitokondrites.

1.3.2 Mitokondrite segregatsioon ja nukleoidid

Lisaks replikatsioonis, transkriptsioonis ja reparatsioonis osalevatele valkudele näivad ka mitokondriaalsest segregatsiooniprotsessist osavõtvad valgud dünaamiliselt nukleoididega seotud olevat (Hensen jt, 2014). Näiteks mitofusiin 1 ja 2 on mitokondrite välismembraanis paiknevad GTP-aasid, mille funktsiooniks on nende organelide fuseerumine ning lisaks ER ja mitokondrite membraanide liitmise vahendamine (ER-mitokondrite kontaktpunktid) (Palmer jt, 2011; de Brito jt, 2008). Mitokondrite sisemembraanide fuseerumisel osaleb samuti GTP-aas - OPA1 (Hensen jt, 2014). Tõendid nende GTP-aaside kohta pärinevad katsetest, kus uuriti vastavate valkude puudumist (Chen jt, 2007). Mitofusiin 2 ja OPA1 on seostatud ka mitmete mitokondriaalsete haigustega nagu dominantse optilise atroofiaga, eksternaalse oftalmopleegiaga ja ataksiaga (Rouzier jt, 2012; Hudson jt, 2008; Amati-Bonneau jt, 2008). Ent nende valkude otsene seotus mitokondriaalsete nukleoididega on veel tõestamata (Hensen jt, 2014).

Lisaks mtDNA paljundamise ja DNA seostusvalkude organisatsiooni kirjeldamisele nukleoidides on oluline uurida ka nende dünaamikat. COS7 (*Cercopithecus aethiops kidney cells*) rakkude nukleoidide ja mitokondrite liikumise uurimine näitas sarnasust nii suunas kui kiiruses. See lubab oletada, et nukleoidide dünaamika sarnaneb mitokondriaalsele dünaamikale (Garrido jt, 2003). Lisaks on ka nukleoidile ja välismembraanile suunatud GFP näidanud sarnast dünaamikat membraanide kokkusulamisprotsessis (Legros jt, 2004).

1.4 Nukleoidide isoleerimine ja mtNAP-ide tuvastamine

Baastadmised mtDNA organisatsiooni kohta pärinevad eelkõige uuringutest ja katsetest pärmis *Saccharomyces cerevisiae*. Kuigi imetajate ja pagaripärmi mitokondrite geneetikas esineb palju sarnasusi, on neil siiski hulk selgeid erinevusi. Näiteks on erinevused mitokondrite genoomi suuruses, organisatsioonis ja koopiaarvus, mtDNA replikatsioonis ja reparatsioonis, mitokondrite dünaamikas ja valkudes (Spelbrink, 2010). Näiteks on pärmide mitokondriaalne DNA 75 kuni 80 kb (Chen jt, 2005), aga inimese mtDNA on 16,6 kb. Pärmides on mtDNA koopiaarv raku kohta palju madalam, umbes 50 kuni 100 koopiat (Osman jt, 2015), inimestel on koopiaarv varieeruvalt kuni kümneid tuhandeid raku kohta. Lisaks sisaldab pärmi mitokondriaalne DNA introneid, mis inimeste mtDNA-s puuduvad.

Inimese HeLa rakkude mitokondrite värvimine fluorestseeruvate värvidega (näiteks DAPI ja etiidiumbromiidiga) on andnud informatsiooni mtDNA lokalisatsiooni kohta imetajates (Sato jt, 1991). Teise lähenemisena on kasutatud mtDNA spetsiifiliseks detekteerimiseks FISH (ingl *Fluorescence in situ Hybridization*) analüüsi, mis kinnitab imetajate rakkudes mtDNA diskreetset lokalisatsiooni (Spelbrink jt, 2001; Margineantu jt, 2002).

Lisaks FISH analüüsile on imetajate mtDNA uuringute käigus kasutatud ka BrdU märgistamist. BrdU on uridiini derivaat ning struktuurne tümidiini analoog, mis lülitatakse rakutsükli sünteesifaasis DNA ahelasse tümidiini substituudina. Rakkudes saab BrdU inkorporeerimist detekteerida fluorestsentsmärgisega või ensüümiga seotud BrdU vastase antikehaga. Kuna enamasti kaasab DNA sünteesil oma koosseisu bromodesoksüuridiini, viitab see duplitseerunud mtDNA eksisteerimisele rakus (Iborra jt, 2004; Legros jt, 2004; Garrido jt, 2003). Seega on imetajate nukleoidid mtDNA replikatsioonisaadid (Iborra jt, 2004; Legros jt, 2004; Garrido jt, 2003; Meeusen jt, 2003).

1.4.1 mtDNA seostusvalgud

Mitokondrites paiknev nukleiinhape vajab rakus kaitset ning enamasti kaitsevad seda DNA seostusvalgud (ingl *DNA-binding proteins*), mis seonduvad DNA-ga spetsiifilisel viisil. DNA seostusvalkudest on identifitseeritud mitmetel imetajate ja mitteimetajate liikidel kaks kõrgelt ekspresseeritud valku - mtSSB ning TFAM (Barat jt, 1985; Van Tuyle jt, 1981; Mignotte jt, 1985; Mignotte jt, 1986; Hoke jt, 1990; Ghir jt, 1991). MtSSB (ingl *mitochondrial single stranded DNA-binding protein*) oletatav roll imetajate mtDNA-s on replikatsiooni vaheühendite stabiliseerimine ning D-lingu moodustamine (Spelbrink, 2010). Inimese rakukultuuris näidati selle esinemist nukleoidides immuunofluorestsentsiga (IF-ga) märgistatud endogeense valguga (Garrido jt, 2003). Hiljutistes isoleerimisprotsessides identifitseeriti mtSSB ka mass-spektromeetria abil ning näidati selle sadestumist mtDNA-ga HeLa rakkudes ning *Xenopus*'es (Bogenghagen jt, 2003; Wang jt, 2006; Bogenghagen jt, 2008).

Koos mtDNA-ga puhastuvad peale TFAM-i ja mtSSB välja ka muud valgud, näiteks mitokondriaalse DNA polümeraasi katalüütiline subühik POLG1 (Fridlender jt, 1972), mida IF-ga ei õnnestunud nukleoidides tuvastada (Garrido jt, 2003). Lisaks sellele ka POLG1 lisasubühik POLG2 (Spelbrink, 2010).

1.4.2 Mitokondriaalsed haigused

Imetajate mtDNA on ainuomaselt päritud emalt (st mitte-Mendellikult), kui toimub arvatav mtDNA genotüübi kiire selektsioon. Kuna isapoolne panus on kogu mtDNA populatsioonile

munarakus ebaoluline, on kõik rakud arenevas lootes ning täiskasvanu organismis tavaliselt ühe (muteerumata) mitokondriaalse genotüübiga, ehk tegemist on mtDNA klonaalse populatsiooniga (nimetatud ka homoplasmia, kuid homoplasmia võib olla ka sellisel juhul, kui mutantsed genoomid selektiivselt või juhuslikult segregeeruvad homogeenseteks kindlas rakus või koes). Pudelikaelaefekt (ingl *mtDNA bottleneck*) seletab ainult kaudselt, miks paljud mtDNA variandid, mis on ekspresseeritud emal väga madalal tasemel, saavad olla laialt levinud järglasel. Sellist situatsiooni, kus kaks või enam mitokondriaalset genotüüpi (mutantsed ja metsiktüüpi mtDNA molekulid) eksisteerivad koos, nimetatakse heteroplasmia. (Spelbrink, 2010)

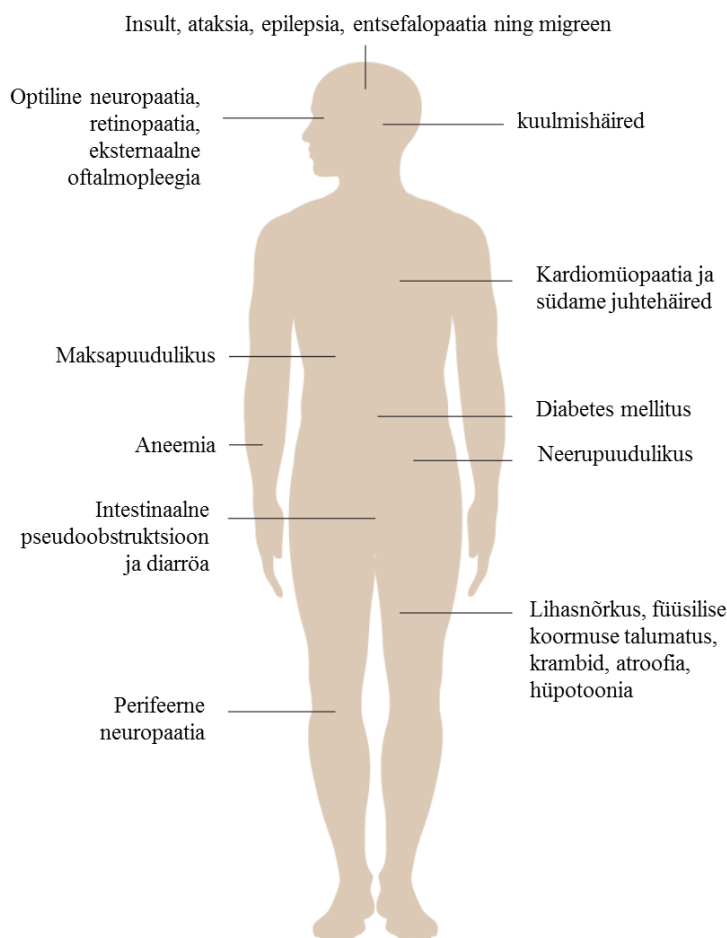
Paljud mitokondriaalsed haigused peegelduvad otseselt mutatsioonides mtDNA-s. Need haigused on enamasti kas sporaadilised ning emapoolset päritolu või siis autosomaalsed, kuid nad on põhjustatud mutatsioonidest tuumageenides, mis kodeerivad mtDNA säilitamiseks vajalikke valke. (Spelbrink, 2010)

Haiguste geneetika ja fenotüübiline avaldumine on väga keerukas kõrge mtDNA koopiaarvu tõttu rakus ja sugurakkude küpsemisel esineva geneetilise pudelikaelaefekti tõttu. Lisaks mängib rolli ka väheuuritud ja -mõistetud koespetsiifilisus ning mtDNA segregatsioon. (Spelbrink, 2010)

Postmitootilistes rakkudes on mtDNA replikatsioon pidev (Magnusson jt., 2003), kuid rakuline energia tootmine, mitokondriaalne ja rakuline kasv ning proliferatsioon peavad olema tasakaalustatud mtDNA replikatsiooni poolt (Spelbrink, 2010). Mitokondriaalse genoomi koopiaarv raku kohta paljunevas rakukultuuris on hoitud suhteliselt konstantsel tasemel (Spelbrink, 2010). Aga sõltuvalt koe- või rakutüübist on mtDNA koopiaarv varieeruv, olles kõrgeim energianõudlikumates kudedes ja munarakkudes, kus oletatav koopiaarv võib olla kuni 200 000 (Shoubridge, 2000; Moraes, 2001). Sadade kuni tuhandete mtDNA koopiade esinemine normaalses inimraku mitokondris seletab nii mitokondriaalsete haiguste paljusust kui ka seda, miks paljud tõsised mtDNA mutatsioonid on tolereeritud näiteks embrüogeneesi käigus või aina tihedamini hiljem elu jooksul (Spelbrink, 2010). Senikirjeldatud mtDNA-ga seotud valkude arv on üsna suur, kuid neid, millel on otsene mõju mtDNA koopiaarvule, on märksa vähem (Spelbrink, 2010). See on eelkõige tingitud valkudest, millel on mtDNA replikatsioonile katalüütiline mõju (Spelbrink, 2010). Sellest hoolimata on näidatud, et nukleoidi suurus ja koopiaarv nukleoidi kohta varieerub erinevalt kultiveeritud rakuliinides ja -tüüpides (Legros jt, 2004; Holt jt, 2007).

Praegu on kindel, et mitokondriaalsete haiguste vastu puudub ravi. Paljud haigused osutuvad letaalseks juba varases lapseas, vahetult peale sündimist, mõned haigused aga avalduvad

mingil hetkel elu jooksul, põhjustades sellisel juhul erinevaid sümptomeid (vt joonis 3), mis viivad suure tõenäosusega indiviidi surmani.



Joonis 3. Mitokondriaalsete haiguste fenotüübiline spekter, mis kujutab haiguste enamlevinud kliinilisi ilminguid (Vafai jt, 2012).

Seepärast on väga oluline uurida paralleelselt mtDNA-ga seotud valkude isoleerimise ning identifitseerimisega ka mtDNA säilitamises osalevate valkude rolli erinevate haiguste kujunemises ja kulus.

1.4.3 Probleemid nukleoproteiinkomplekside uurimisel

Erinevad meetodid, mida on kasutatud mitokondrite ja nukleoidide väljapuhastamiseks ning uurimiseks, on tuvastanud palju (sh veel potentsiaalseid) nukleoididega seotud valke. Üldiselt on nukleoidide väljapuhastamiseks seni kasutatud kahte peamist lähenemist. Esimese puhul on sihiks natiivsed „holo“ mtDNA-valk kompleksid ning teisel juhul juba konkreetselt huvipakkuv nukleoidiga seotud valk (Hensen jt, 2014).

Erinevad katsed on andnud erinevaid tulemusi. See näitab seda, et puudub konsensus mitokondrite ja nukleoidide isoleerimisstrateegiate ning analüüsimismeetodite vahel, sh

milline(sed) meetod(id) on efektiivseim(ad) tuvastamiseks nukleoididega seotud valke (Hensen jt, 2014).

Oluliseks probleemiks eelpoolmainitud katsete juures on eesmärk, mida konkreetselt uurida tahetakse. Kas uuringuobjektiks on pelgalt üks kindel valk, mis etendab mõnda olulist rolli replikatsioonis, geeniekspressioonis või mõnes muus protsessis, või tahetakse genereerida suurt hulka andmestikku, mis hõlmab sadu mitmetesse protsessidesse kaasatud valke.

On teada, et kõik nukleoidid ei osale teatud ajamomendil mtDNA replikatsioonis (Rajala jt, 2014). Lisaks on enamus valke, mis osalevad DNA replikatsioonis, transkriptsioonis ning reparatsioonis madala arvukusega (Hensen jt, 2014), või vaid põgusas interaktsioonis mtDNA-nukleoid struktuuridega ning sedagi ainult parasjagu replitseeruvates nukleoidides. Sellest tulenevalt on saanud takistuseks ka paljude mtNAP-ide alaesindatus isoleeritavas materjalis (Hensen jt, 2014). Praeguseks hästikirjeldatud valgud – helikaas Twinkle ja polümeraas γ (POLG) on madala arvukusega nukleoididega seotud valgud ning nende isoleerimine on olnud edukas peamiselt ristsidumise katsetes (Bogehagen jt, 2008).

Digitoniini (mitteioonne pehme detergent) tiitrimiskatsete (baseerub klassikalisel mitokondrite subfraktsioneerimisel) põhjal on selgunud, et paljud mitokondriaalsete nukleoididega assotsieerunud valgud asuvad nii membraanses kui maatriksi fraktsioonis (Rajala jt, 2014). Rajala jt kasutasid helikaas Twinkle põhist analüüsimist, sest vastav valk käitub membraanse valguna sõltumata mtDNA olemasolust (Rajala jt, 2014). Selgus, et esineb vähemalt kaks mtDNA-valk komplekside kogumit, mida saab eraldada vastavalt nende lahustuvusele (Rajala jt, 2014). Nendeks on membraanseotud ja lahustumatu ning lahustuv nukleoidide kogum, kusjuures helikaas Twinkle on membraaniga seotud mtDNA replikatsiooni masinavärgi põhiline komponent (Rajala jt, 2014). Kahe (või enama) nukleoidide kogumi esindatus mitokondrites muudab uute mtNAP-ide isoleerimise ja identifitseerimise veelgi keerulisemaks.

Suureks katsumuseks nukleoidide isoleerimisstrateegiates, mille puhul tahetakse tuvastada uusi mtDNA säilitamises ja geeniekspressioonis osalevaid valke, on saanud ka mittespetsiifiline valguline „saastus“ (Hensen jt, 2014). Üheks võimaluseks, kuidas seda probleemi lahendada, on kasutada palju rangemaid nukleoidide väljapuhastamisstrateegiaid. Kasutusele on võetud formaldehüüdiga ristsidumine (Bogehagen jt, 2008), mille järgselt on võimalik rakendada ka rangemaid nukleoidide puhastamismeetodeid ilma, et kaotataks seejuures oluliselt nõrgalt seonduvaid valke. Formaldehüüdiga ristsidumist on varasemalt ja

edukalt kasutatud pärmi nukleoidide koosluse uurimiseks (Kaufman jt, 2000). Inimrakkudes on õnnestunud vastava meetodiga identifitseerida hulk alaesindatud valke (Hensen jt, 2014).

Hiljuti on kasutatud ka rakkude ristsidumist formaldehüüdiga, et isoleerida mitokondriaalseid nukleoide (Rajala jt, 2015). Meetod kombineeriti immuunoafiinsus puhastamisega ning tandeemse mass-spektromeetrilise (MS/MS) analüüsiga, mis võimaldas identifitseerida nii juba hulka varasemalt identifitseeritud nukleoididega assotsieeruvaid valke kui ka uusi potentsiaalseid kandidaate (Rajala jt, 2015). Antud uuring ei kätke endas keerulist mitokondrite isoleerimist rakkudest ning komplitseeritud nukleoidide rikastamist, lisaks sellele võimaldab see meetod teostada ka märkevaba kvantifitseerimist MS-ga (Rajala jt, 2015).

Kuna nukleoidid on tõenäoliselt väga dünaamilised struktuurid ning paljud nukleoididega assotsieerunud valgud vaid põgusalt nukleoididega seotud, on väga olulised ka meetodid mitokondrite eraldamiseks rakkudest (Hensen jt, 2014). Kuna nukleoidid on seotud mitokondrite sisemembraaniga, on tähtsal kohal erinevat tüüpi detergendid, millega teostatakse mitokondrite lüüsimist, kuid seni on eri varianti detergendid süstemaatiliselt testimata (Hensen jt, 2014), st erinevad detergendid erinevates kontsentratsioonides on suuresti katsetamata.

Lisaks väljapuhastamisstrateegiatele on oluline osa ka analüüsimisel, milleks enamasti kasutatakse mass-spektromeetriat. Kuid ka MS kasutamisel on rida olulisi parameetreid, mis etendavad olulist rolli analüüsimises. Üha rohkem on vaja tundlikumaid ja kiiremaid modernseid spektromeetreid, mis tuvastaksid valke juba väga väikese koguse peptiidse materjali esinemisel.

Kvantitatiivseks analüüsimiseks on kasutatud ja kasutatakse ka edaspidi Western-blot analüüsi, mis annab ühest küljest odavama, teisest küljest ka teatud määral kiirema ülevaate väljapuhastamisskeemide efektiivsusest. Siiski on Western-blot analüüs kasulik vaid juhul, kui on teada sihtmärkvalk, mida uuritakse vastava antikehaga, seega uute valkude identifitseerimine vastava protseduuriga pole võimalik.

Võrreldes tervet rida väljapuhastamismeetodeid ja valkude analüüsimist on selge, et kõige laiapõhjalisema ja ülevaatlikuma nimekirja erinevatest nukleoididega seotud valkudest on seni andnud formaldehüüdiga ristsidumise katsed koos rangete isoleerimismeetoditega (Hensen jt, 2014). Formaldehüüd on suuruselt väike ning võimeline sisenema rakkudesse kõrge efektiivsuse ja kiirusega, seejuures ristsiduma valke ja isegi kindlustama põgusaid interaktsioone (Rajala jt, 2015). Sellegipoolest on seotud kahtluse alla mõningate valkude

otsene seotus just nukleoididega, kuna formaldehüüd toimib efektiivselt kui valk-valk ristsiduja ning vähem kui valk-nukleiinhape ristsiduja (Hensen jt, 2014).

Praegusel hetkel puudub üksmeel nukleoidide isoleerimise ja nendega seotud valkude identifitseerimise ning analüüsimise vahel (Hensen jt, 2014). Kuigi ristsidumise meetod on olnud väga paljulubav, võimaldades tuvastada põgusalt mtDNA-ga seonduvaid valke, kaasneb selle meetodiga potentsiaalselt suur ebaspetsiifiline „kontaminantide“ identifitseerimine. See tuleneb eelkõige nukleoidide vahetus läheduses paiknevatest valkudest, mis seejuures on nukleoididega vaid kaudselt seotud (Hensen jt, 2014). Lisaks ei ole formaldehüüdiga ristsidumise meetod kuigi spetsiifiline ja seejuures mõistlik natiivsete nukleoidide väljapuhastamise korral, sest ristsidumise korral tuleb formaldehüüdiga kaasa ka suur hulk keskmiselt või kõrgelt ekspresseeritud valke (valkude töötlemisel tekkivas peptiidides segus esineb vastavaid peptiide väga palju ning nende identifitseerimine on ka tõenäoline), samas kui madalalt ekspresseeritud valgud (nt Twinkle) jäävad enamasti tehnilistel põhjustel mass-spektromeetri poolt detekteerimata (Hensen jt, 2014). Mõningate ristsiduvate reagentide puhul on kasutatud lahendusena spetsiaalsete afiinsus või reporterrühmade inkorporeerimist suunatud rikastamiseks ja detekteerimiseks (Sutherland jt, 2008). Formaldehüüdiga ristsidumise strateegiate puhul vastavad seadistused hetkel puuduvad (Sutherland jt, 2008). Seega on tarvis meetodeid, mis võimaldaks nukleoidide natiivselt ja spetsiifiliselt välja puhastada.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Mitokondriaalsete DNA-valk komplekside, nimetatud nukleoidideks, uurimine on andnud väga palju informatsiooni erinevate valkude kohta, mis osalevad mtDNA organiseerimises kompaktsesse struktuuridesse, mtDNA paljundamises, genoomi segregatsioonis ning mitokondrite biogeneesis. Kuid mitokondriaalsed nukleoidid on siiski halvasti defineeritud struktuurid, mis kujutavad endast palju laiahaardelisemat funktsiooni ja kompositsiooni, kui seni täheldatud. Nendel nukleoididel ei ole mingit seost bakteriaalsete nukleodidega, mistõttu on termin „nukleoid“ mõneti vääriti mõistetud, sest pole kindlat piiri, alates millest saame rääkida nukleoididega seotud valkudest. Lisaks pole ainuõiget ja ühtset meetodit tuvastamiseks vastavaid valke.

Käesoleva töö eesmärgiks oli testida ja uurida mitokondriaalsete DNA-valk komplekside koosluse määramiseks sobivaid eraldamisskeeme, kasutades esmalt mitokondrite väljapuhastamiseks spetsiaalseid meetodeid ning uurida erinevate detergentide mõju mitokondriaalsete valkude kooslusele, kasutades esmajoones valkude analüüsimiseks Western-blot analüüsi. Kitsamalt oli eesmärkideks võrrelda omavahel kahte väljapuhastatud mitokondrite fraktsiooni: vahetult rakkudest eraldatud mitokondrid (I fraktsioon) ja sahharoosi gradiendil puhastatud mitokondrid, uurides seejuures võimalikke muutusi mitokondrites (sh nukleoidides) ning lisaks leida sobiv(ad) detergent(id) natiivsete nukleoidide isoleerimiseks.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1 Rakuliinid, sööde ja detergentid

Kõikides läbiviidud eksperimentides kasutati HEK293e rakuliini, mida kasvatati 37 °C juures 5% CO₂ tingimustes. HEK293e rakud ekspresseerivad stabiilselt Epstein Barri viiruse (EBV) modifitseeritud tuuma antigeeni 1 (EBNA1) ning on adheeruvad. Rakud kasvasid kõrge glükoosisisaldusega DMEM [GE Healthcare Dulbecco modifitseeritud Eagles meedium kõrge glükoosisisaldusega (4,5 g/l), naatriumpüruvaadiga ning stabiilse glutamiiniga] söötmel, kuhu oli lisatud 50 ml FBS seerumit (10% lõppkonts). Sööde sisaldas pH indikaatorit fenoolpunast, mis keskkonna leelistumisel muutub kollaseks ning hapestumisel tumepunaseks. Katseteks kasutatud rakke kasvatati 15 cm läbimõõduga tassidel ning enne katset saavutas kultuur konfluentsuse vähemalt 80%. Rakud kahestati (ingl *split*) katsele

eelneval päeval ning vahetati sööde. Rakuliini säilitamiseks ja propageerimiseks kasvatati rakke kahel 10 cm läbimõõduga tassil. Rakke splititi regulaarselt iga 3 kuni 4 päeva järel 1:10.

2.2.2 Mitokondrite eraldamine HEK293e rakkudest

Mitokondrite eraldamiseks kasutati avaldatud protokoll (Rajala jt, 2014), mis oli kohandatud Gaines ja Attardi (1984) avaldatud meetodile.

Vajalikud töölahused (vt Lisa 1) ja -vahendid asetati jääle jahtuma. 80%-lise konfluentsusega rakud suspendeeriti tassidelt ning koguti Greiner Bio-One 50 ml polüpropüleen reaktsioonituubidesse, asetati tsentrifuugi ning fuugiti 5 min 4°C ja 450 g juures rakud põhja. Seejärel eemaldati sööde, nipsutati rakud lahti, pesti 50 ml 1X PBS lahusega ja tsentrifuugiti samade parameetritega. Saadud rakkude pellet suspendeeriti 10 ml 0,1X homogeniseerimispuhvril, mis sisaldas proteaasi inhibiitorit PMSF lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM ning inkubeeriti jääl 6 min, et rakud saaksid piisavalt paisuda. Seejärel tõsteti suspensioon 15 cm klaas/teflon Elvehjem homogenisaatorisse ning rakud purustati 20 pöörleva vajutusega. Koheselt peale rakkude lõhastamist lisati homogenaadile 1100 µl 10X homogeniseerimispuhvrit, et kontsentratsioon oleks 1X, lisaks lisati juurde 2100 µl 1,2 M sorbitooli osmootsuse säilitamiseks ja stabiliseerimiseks. Homogeniseeritud raku suspensiooni tsentrifuugiti 5 min 1300 g 4°C juures. Supernatant tõsteti uude reaktsioonituubi ning tsentrifuugiti taaskord 5 min 1300 g 4°C juures. Supernatant tõsteti värskesse tuubi ning tsentrifuugiti 10 min 14 000 g 4°C juures. Pellet, mis sisaldas I fraktsiooni, suspendeeriti 500 µl 1X PBS lahuses.

2.2.3 Totaalse mitokondriaalse valgu hulga mõõtmine Bradford'i meetodil

Peale rakkudest mitokondrite eraldamist koostati BSA kaliiber ning mõõdeti totaalse mitokondriaalse valgu kontsentratsioon. Selleks pipeteeriti viide 1,5 ml reaktsioonituubi kaliibergraafiku tarbeks vajalikud BSA (algkontsentratsioon 1 mg/ml) kogused alates 0,125 µg/µl kuni 1 µg/µl. Kõigile proovidele lisati juurde võrdne kogus (4 µl) 1% Triton X-100 lahust ning ruumala viidi ddH₂O-ga (steriliseeritud deioniseeritud veega) 300 µl-ni. Valmistati ka nullproov (ingl *blank*), kuhu lisati 4 µl 1% Triton X-100 lahust ja 296 µl steriilset ddH₂O-d. Proovidele tehti kerge Vortex. Edasi võeti mitokondrite suspensioonist 20 µl proovi, tõsteti värskesse 1,5 ml reaktsioonituubi ning lüüsi 2 µl 10% Triton X-100 lahusega. Proovi inkubeeriti 5 min RT (toatemperatuuril) ning peale seda võeti lüüsimisproovist 4 µl kahte värskesse tuubi, lisati juurde steriilitud ddH₂O ruumalani 300 µl. Edasi pipeteeriti kõikidele proovidele 600 µl Bradford'i reagenti (vt Lisa 1), inkubeeriti proove 5 min RT ja mõõdeti

OD₆₀₀. Koostati programmis Microsoft Excel kaliibergraafik ning arvutati totaalse mitokondriaalse valgu hulk (μg valku 1 μl -s lahuses).

2.2.4 I fraktsiooni lüüsimine detergentidega

Mitokondrite lüüsimiseks oli vajalik teada totaalse mitokondriaalse valgu kontsentratsiooni, et lüüsimiseks võetav valgu kogus oleks iga proovi puhul võrdne. Lüüsimiseks võeti vastavalt 100 μg mitokondriaalset valku, mis pipeteeriti 6 erinevasse 1,5 ml reaktsioonituubi. Viiele proovile lisati detergentid (tabel 1) ning üks proov oli negatiivne kontroll. Lüüsimised teostati jääl ruumalas 100 μl . 10% SDS alglahust lisati 5 μl (lõppkontsentratsioon 0,5%), 10% Triton X-100 alglahust lisati 10 μl (lõppkontsentratsioon 1%), 10% Na-deoksükolaadi alglahust lisati 10 μl (lõppkontsentratsioon 1%), 20% DDM alglahust lisati 5 μl (lõppkontsentratsioon 1%) ja digitoniin lisati lüüsilahusele kaal/kaal suhte alusel. Digitoniini algkontsentratsioon oli 10 mg/ml, kogus arvutati suhte 1:2,5 põhjal, st 100 μg totaalse mitokondriaalse valgu kohta 250 μg digitoniini, ehk 100 μl lüüsilahuse kohta võeti 25 μl digitoniini alglahust. Lahuste ruumala viidi 100 μl -ni 1X PBS lahusega ning inkubeeriti jääl 10 min. Peale inkubeerimist tseentrifuugiti lüsaate 10 min 14 000 g 4°C juures ning eraldati pellet ja supernatant. Iga proovi supernatant tõsteti eraldi tuubi ning pellet suspendeeriti 100 μl -s 1X PBS-is. Seejärel alikvooditi igast proovist 20 μl DNA analüüsiks, ülejäänud 80 μl -le lisati juurde 5X SDS proovipuhver (vt Lisa 1) (lõppkontsentratsioon pidi olema lahuses 1X, ehk siis lisati 20 μl) ning keedeti 95°C juures 5 min. Igast proovist võeti seejärel 30 μl alikvoot 12% SDS-PAGE jaoks.

Tabel 1. Käesolevas töös kasutatud detergentid.

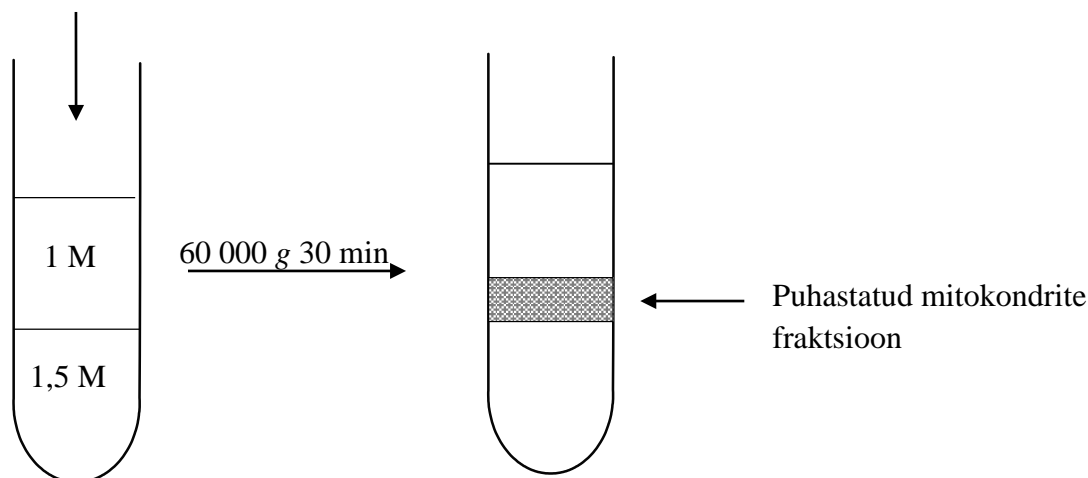
Detergent	Omadus	Kontsentratsioon
SDS	Anioonne	0,5% lüüsimisel
Na-deoksükolaat	Anioonne	1% lüüsimisel
Triton X-100	Mitteioonne	1% lüüsimisel
DDM	Mitteioonne	1% lüüsimisel
Digitoniin	Mitteioonne	1:2,5 suhtes valguga

2.2.5 Mitokondrite puhastamine sahharoosi gradiendiga

Organelide puhastamiseks suspensioonist kasutatakse enamasti lihtsat tihedusgradienti, näiteks sahharoosi gradienti. Sahharoosi gradient võib olla nii katkendlik (ingl *discontinuous*) või katketeta (ingl *continuous*), olenevalt sellest, mida tahetakse rakususpensioonist välja puhastada. Sahharoosi gradient on võrreldes näiteks iodiksanooli gradiendiga palju odavam ja kiirem, kuid sahharoosi gradiendi puuduseks on selle kõrge osmolaalsus, mille tõttu paljud puhastatavad organelid lähenevad limiteeriva tiheduseni.

I fraktsiooni puhastamiseks muudest tsütosoolsetest komponentidest (ingl *light mitochondrial fraction*) kasutati sahharoosi gradienti, mis koosnes 1,5 M ja 1 M sahharoosi lahustest (vt Lisa 1). Gradiendi valmistamiseks pipeteeriti kahte 2,2 ml TLS-55 (Beckman Coulter) ultratsentrifuugi tuubi 750 μ l 1,5 M sahharoosi lahust, selle peale 750 μ l 1 M sahharoosi lahust ning kõige peale I fraktsiooni suspensioon (vt joonis 5). Edasi tasakaalustati gradiendid, asetati kannukestesse ning kinnitati TLS-55 rootori külge. Tsentrifugimine teostati 60 000 g (25 200 rpm) 4°C 20 min. Seejuures kasutati fuugimist ilma pidurduseta. Peale ultratsentrifuugimist võeti tuubid ettevaatlikult kannudest välja ning pipeteeriti keskmine puhaste mitokondrite fraktsioon (umbes 500 μ l) puhtasse 1,5 ml eppendorfi, suspenderiti 1 ml-s 1X PBS-is ning tsentrifugiti põhja 5 min 14 000 g 4°C juures. Puhtad mitokondrid suspenderiti 100 μ l-s 1X PBS-is ning mõõdeti valgukontsentratsioon Bradford'i meetodiga. Jätkati puhaste mitokondrite lüüsimist sarnaselt I fraktsiooni lüüsimiseks ettenähtud eeskirjadele, et hiljem võrrelda omavahel produtseeritud tulemusi.

Kõige peale on
pipeteeritud mitokondrite
I fraktsioon



Joonis 4. Sahharoosi gradiendiga mitokondrite puhastamine. 1 M ja 1,5 M sahharoosi lahused. Halliga on märgistatud puhastatud mitokondrite fraktsioon.

2.2.6 12% SDS polüakrüülamiid geelelektroforees

Valkude elektroforeetiline separatsioon polüakrüülamiid geelidega võimaldab üsna lihtsal moel proovist eraldada valke nende suuruse alusel. Selleks töödeldakse valke tugeva anioonse denatureeriva detergendiga SDS, seda nii enne elektroforeesi kui foreesi ajal. Valgud omandavad negatiivse laengu ning liiguvad geelis elektrivälja toimetel katoodilt anoodi suunas. Kuna SDS denatureerib valgud ja valkude mass peegeldub nende ahelate pikkuses, sõltub sellest nende liikumise kiirus.

Käesolevas töös mitokondrite valgulise kompositsiooni uurimiseks peale detergentide lüüsi rakendati SDS-PAGE meetodit. Kasutati Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell aparatuuri, mis mahutas kokku 4 geelikassetti. Valmistati 12%-line SDS polüakrüülamiidgeel 1,5 mm speisseriga, mille separeeriv osa sisaldas 12% STOCK lahust, 10% NAPS lahust ja Tris/SDS lahust (vt Lisa 1). Separeerivast lahusest võeti alikvoot korgi valmistamiseks, mis polümeriseeriti TEMED lisamisega. Edasi valati separeeriv osa ning kontsentreeriv osa, mis sisaldas STACK lahust, 10% NAPS lahust ja TEMED-it. Kontsentreerivasse geeli asetati 15 hambaga kammid ning lasti polümeriseeruda. Geelikassetid asetati seejärel geelikambrisse ning valati peale 1X SDS valkude jooksutamispuhver (ingl *protein run buffer*). Eelnevalt keedetud proovid kanti geelile järjekorras marker, pellet, supernatant, suleti kamber ning geeli jooksutati umbes 2,5 kuni 3 h võimsusel 80 V, kuni proovid olid jõudnud geeli alumisest servast umbes 0,1 cm kaugusele. Geel eemaldati ettevaatlikult kassetist ning asetati ülekandeks 1X wet transfer puhvrise (vt Lisa 1), et vältida geeli kuivamist. Jätkati Western analüüsiga.

2.2.7 Western blotting

Western blotting on valkude analüüsi meetod, mis põhineb hulga valkude (peale SDS-PAGE valkude separeerimist) kandmisel tahkele membraanile, milleks enamasti on nitrotselluloos või PVDF (polüvinüülideenfluoriid) ning nende spetsiifilisel detekteerimisel peale membraanide töötlemist spetsiaalsete monoklonaalsete või polüklaalsete antikehadega. Ühtlasi kutsutakse meetodit ka immuunoblottimiseks. Huvipakkuv valk seob spetsiifilise primaarse antikeha, seejärel töödeldakse membraane sekundaarse antikehaga, mis on seotud mõne tuntud reporterensüümiga (nt HRP) ja võimaldab meid huvitava valgu visualiseerimist ensümaatilise reaktsiooniga ehk detekteerida reporterensüümi kemiluminesentsi.

Western blotting teostamiseks lõigati iga geeli jaoks valmis 1 membraan, 4 filterpaberit ja immutati need 1X wet transfer puhvrise (vt Lisa 1). Jätkati valkude ülekandega membraanile, milleks kasutati Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell aparatuuri. Selleks asetati katoodplaat esmalt

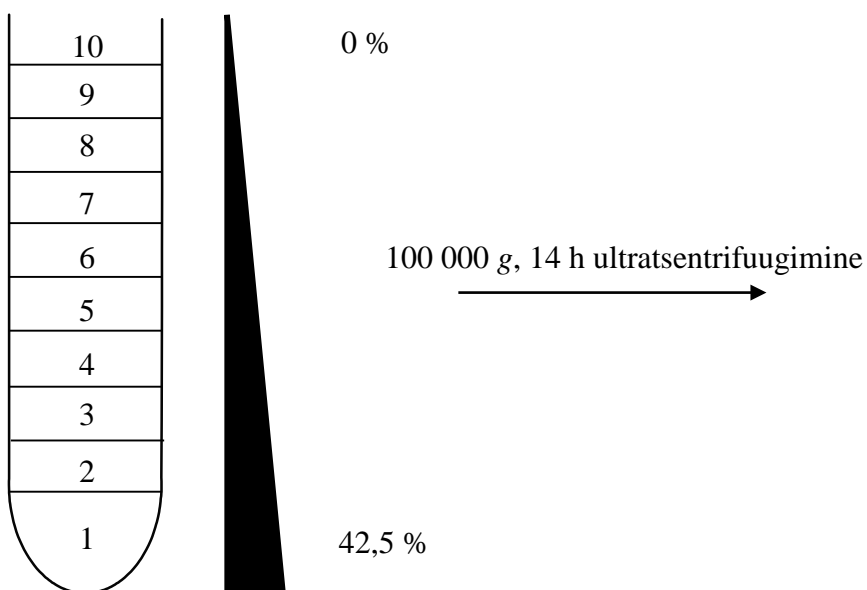
wet transfer puhvrise, asetati peale puhvris immutatud *foam pad*, selle peale asetati 2 3MM filterpaberit (õhumullid eemaldati rullimisega), seejärel pandi peale geel, geeli peale nitrotselluloos membraan, seejärel 2 3MM filterpaberit ning kõige peale teine *foam pad*. *Sandwich* suleti ning tõsteti blottimiskambrisse, kuhu lisati juurde 1X ülekandmispuhver, magnetsegajapulka, jahutuskanister ning blottimine teostati 1 h konstantse pinge juures 100 V. Peale ülekannet asetati membraan neljakandilisse Petri tassi ja alustati blokeerimisega, milleks kasutati 5% lõssilahust 1X TBST-s ja inkubeeriti loksutil 15-20 min, seda selleks, et blokeerida membraani ebaspetsiifilist valkude sidumist. Peale blokeerimist pesti membraani loksutil RT 3 korda (iga kord 5 min). Valmistati primaarse antikeha lahus, milleks esmalt oli COX II jäneses valmistatud polükloonaalne antikeha (vt Lisa 2). Antikeha lahjendus 1:10 000 tehti 3% BSA lahuses ruumalaga 15 ml. 3% BSA lahus oli valmistatud 1X TBST-s (w/v). Peale kolmekordset membraani pesu valati 1X TBST minema ning valati peale primaarse antikeha lahus, seejärel inkubeeriti membraani loksutil ON 4 °C juures. Primaarse antikeha inkubatsiooni järgselt pesti membraane 3 korda. Valmistati sekundaarse antikeha lahus, milleks oli anti-jänes antikeha (vt Lisa 2), millega oli seotud reporterensüüm HRP. Sekundaarse antikeha 1:10 000 lahjendusega lahus valmistati 5% lõssilahuses ning inkubeeriti membraani 1 h RT loksutil. Signaali detekteerimiseks kasutati kommertsiaalset Bio-Rad Clarity™ ECL Western Blotting Substrate kitti, mis sisaldas peroksiidi ja luminooli/võimendaja reagenti. Reagendid segati omavahel suhtes 1:1 koguruumalaga 1 ml. 1 ml ECL lahus pipeteeriti alusele ning asetati membraan lahusesse ja lasti seista 5 min RT. Alternatiivina kasutati detekteerimiseks standardmeetodit, st valmistati nii luminooli lahus kui võimendaja vastavalt etteantud retseptidele (vt Lisa 1) ning segati omavahel suhtes 1 ml luminooli:10 µl võimendajat. Signaal visualiseeriti pimikus ning andmed salvestati.

Peale COX II antikeha töötlust valmistati membraanid ette mtSSB ja TFAM signaalide detekteerimiseks vastavate antikehadega (vt Lisa 2). Kuna signaalid peale COX II antikeha visualiseerimist olid võrdlemisi tugevad, teostati järgnevate analüüside eel membraanide strippimine. Selleks kasutati Western strip puhvrit (vt Lisa 1), mis sisaldas 200 mM glütsiini ja 1% SDS lahust, pH viidi 2,3-ni HCl-ga. Membraane inkubeeriti strippimispuhvril toatemperatuuril loksutil 10 min või vastavalt vajadusele. Seejärel pesti membraane ohtra koguse 1X TBST pesupuhvriga. Strippimise edukust testiti sekundaarse antikeha inkubatsiooniga 1 h toatemperatuuril, peale mida detekteeriti signaalid. Kui protseduur oli edukas, alustati uue primaarse antikeha resondeerimisega, mida inkubeeriti kas üle öö 4°C juures loksutil või 1 h toatemperatuuril loksutil. Edasi toimiti vastavalt signaalide

detekteerimise eeskirjadele. Saadud radiograafid skaneeriti arvutisse ning tehti tulemuste analüüs.

2.2.8 Flotatsioon

Puhaste mitokondrite kompositsiooni analüüsimiseks teostati nende lüüsimine DDM-ga, millele järgnes ultratsentrifuugimine iodixanooli gradiendis. Selleks võeti 1000 µg mitokondriaalset valku värskesse reaktsioonituubi ning teostati lüüsimine 10% DDM lahusega (lõppkonts 1%). Lüüsilahus segati kergelt ning inkubeeriti jääl 10 min, peale lüüsimist teostati tsentrifuugimine 10 min 14 000 g 4 °C juures. Supernatant tõsteti uude tuubi ning pellet suspendeeriti üles võrdses ruumalas 1X PBS-is. Nii pelletile kui supernatandile lisati juurde 12,5 µl 10% Triton X-100 (lõppkontsentratsiooniga 0,5%) ja 460 µl iodixanooli lahust, et lõppkontsentratsioon oleks 42,5%. Pipeteeriti valmis iodixanooli gradiendi lahused (vt tabel 2), mis sisaldasid OptiPrep ja 1X TN puhvrit (vt Lisa 1). Ultratsentrifuugi tuubide (Beckman Coulter SW55Ti 4,5 ml ultratsentrifuugi tuubid) põhja lisati proovid, mille peale pipeteeriti ettevaatlikult gradiendi lahused (vt joonis 5). Teostati tsentrifuugimine 100 000 g (32 500 rpm) 4°C 14 h. Järgneval päeval pipeteeriti fraktsioonid 400 µl kaupa HPLC klaasviaalidesse, kusjuures pealmine fraktsioon tähistati numbriga 10. Kõige alumine fraktsioon (1) oli ruumalalt suurim. Peale fraktsioonide kogumist teostati alikvootimine edasiste analüüside tarvis, võttes 30 µl Western blot analüüsiks, 20 µl DNA analüüsimiseks ning 50 µl MS/MS jaoks. Ülejäänud kogused säilitati -80°C juures tulevasteks analüüsideks.



Joonis 5. Iodixanooli gradient. Numbrid 1 kuni 10 tähistavad iodixanooli protsentuaalset kontsentratsiooni erinevates fraktsioonides, kusjuures fraktsioon number 1 sisaldab enne

tseentrifugeerimise algust puhastatud mitokondrite lüüsilahust ning iodixanooli lõppkontsentratsioon on 42,5%. Tseentrifugeerimise käigus liiguvad valgud, membraanijäägid ning ka nukleoidid (ehk DNA-valk kompleksid) tiheduse järgi erinevatesse fraktsioonidesse.

Tabel 2. Iodixanol gradiendi pipeteerimisskeem kahe reaktsiooni kohta

% Iodixanol	µl OptiPrep	µl 1X TN puhver
40	670	330
37,5	630	470
35	580	420
32,5	540	460
30	500	500
27,5	460	540
25	420	580
20	330	670
0	0	1000

2.2.9 DNA analüüs (dot blot ja Southern hübridisatsioon)

DNA dot blot on meetod, mille käigus immobiliseeritakse fraktsioneerimata DNA nitrotselluloos või nailonmembraanile. Peale immobiliseerimist tehakse enamasti hübridisatsioonianalüüs, et määrata huvipakkuva sihtmärkjärjestuse kvantiteeti blotitud DNA proovides.

Käesolevas töös kasutati DNA dot blot meetodit I fraktsiooni ja puhastatud mitokondrite lüüsimisproovide ning DDM lüüsimise järgselt teostatud iodixanooli gradiendist saadud fraktsioonide DNA kvantitatiivseks määramiseks vastavalt etteantud protokollile.

DNA alikvootidele tehti 20X lahjendus (20 µl proovi + 380 µl 2X SSC puhvrit (vt Lisa 1)). Seejärel keedeti proove termoblokis 15 min 95°C juures. Edasi tõsteti proovid jääle, kus neid hoiti umbes 5 min. Seejärel tseentrifugeeriti kiiresti reaktsioonituubide korkidel olevad piisakesed põhja, et vältida DNA ahelat seondumist (*re-annealing*), seejuures kasutati madalaid pöördeid.

Valmistati ette Minifold I Dot-Blot System 96 Well aparatuur. Sinna vahele pandi 2 Whatman filterpaberit (katsid kõikide aukude aluse ala) ja nende peale nailonmembraan (nii suur, et kataks proovide jaoks vajalikud kannukeste read ja veel ühe rea ning ulatub nende ridade kogupikkuses servast servani). Membraan ja filterpaberid kasteti enne blotteri vahele panemist 2X SSC puhvriss märjaks. Membraanile märgiti nimi, kuupäev ja HEK293e. Seejärel pandi ettevaatlikult peale aukudega plaat ning kinnitati klambrid diagonaalis. Augud pesti läbi

400 µl (2x 200µl) 2X SSC-ga, seejuures jälgiti, et aukudesse ei jääks õhumulle. Aparatuur ühendati vaakumiga ning imeti puhver aukudest ära. Peale pesemist ühendati lahti voolik ja seejärel keerati kraan kinni. Kanti peale proovid (igat proovi 60 µl) ning tõmmati membraan vaakumiga kuivaks. Taaskord pesti 2X SSC puhvriga 2 korda. Masin võeti ettevaatlikult lahti ning membraan cross-link'iti UV-ga 24 sek 0,120 J/cm². Membraan asetati kile vahele ning jäeti -20°C juurde säilitamiseks ja edasisteks analüüsideks (hübriidisatsioon).

Edasi teostati radioaktiivne hübriidisatsioon. Alustati PCR reaktsiooniseгу valmistamisega, mis oli vajalik radioaktiivse märkega sondi sünteesimiseks. Selleks pipeteeriti 200 µl-sesse PCR tuubi kokku 20 µl reaktsiooniseгу: 0,3 µl Taq DNA polümeraasi, 2 µl 10X reaktsioonipuhvrit, 2 µl MgCl₂, 2 µl dNTP miinus dATP, 1 µl cyt b F praimerit, 1 µl cyt b R praimerit, 1 µ matriits DNA-d (CYT B), 7,7 µl ddH₂O-d ning 3 µl radioaktiivset isotoopi α-³²P-dATP. Iga tööetapi järel kontrolliti Geigeri-Mülleri loenduriga töövahendeid.

Edasi asetati PCR tuub koos valmis reaktsiooniseгuga PCR tsüklerisse ning valiti vastav programm (vt Lisa 3) ning teostati 20 amplifikatsioonitsükli. PCR reaktsiooni ajal valmistati ette hübriidisatsiooniahi, milles seati temperatuur 65°C peale ning sisse asetati vajalik arv hübriidisatsioonitorusid. Peale soojenemist võeti -20°C juurest nailonmembraanid, kuhu oli eelnevalt juba kovalentselt seotud DNA. Hübriidisatsioonitorusse valati 50 ml (eelnevalt samuti soojendatud) Church puhvrit (vt Lisa 1), seejärel rulliti ettevaatlikult kokku membraanid ning asetati torusse, kus membraanid lahti rullusid. Hübriidisatsioonitoru tõsteti tagasi 65°C ahju. Mõne aja pärast vahetati puhver, seejuures välditi membraanide kuivamist.

Peale PCR lõppemist alustati sünteesitud DNA sadestamisega. Selleks pipeteeriti 20 µl proovile 180 µl ddH₂O-d. Edasi lisati 20 µl 5 M NaCl lahust. Juurde pipeteeriti veel 220 µl isopropanooli, tehti vortex ning edasi tsentrifuugiti 10 min täispöoretel (14 000 g). Peale tsentrifuugimist eemaldati supernatant, pellet lahustati üles ddH₂O-s ning proov tõsteti 95°C termoblokki keema 5 minutiks. Peale keetmist asetati proov jääle vähemalt 3 minutiks. Vahetult enne proovi lisamist hübriidisatsioonitorusse tehti kiire tsentrifuugimine, pipeteeriti proov ettevaatlikult hübriidisatsioonipuhvrise torus ning jäeti 3 h hübriidiseeruma.

Hübriidisatsiooni ajal valmistati ette fosforekraan (Amersham Biosciences), mis tõesteti kustutusekraanile.

Membraanidele valati peale 50 ml Church pesupuhvrit (vt Lisa 1), pesti 10 min ning eemaldati vedelik. Pesuprotseduuri teostati 2 korda, peale mida võeti membraanid ettevaatlikult hübriidisatsioonitorust ning asetati filterpaberile kuivama. Kui membraanid olid kuivanud, asetati need kile vahele, tõsteti kassetti ning peale pandi fosforekraan. Kassett suleti

kindlalt ning fosforekraani eksponeeriti 12 h kuni 3 päeva. Peale eksponeerimist pildistati ekraani Typhoon fosfoimageriga ja andmed salvestati.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1 I fraktsiooni ja puhaste mitokondrite lüüsimised

Antud katsete eesmärgiks oli võrrelda omavahel kahe fraktsiooni erinevusi detergentidega lüüsimisel ning leida natiivsete nukleoidide puhastamiseks ja uurimiseks sobiv detergent. Mitokondrite lüüsimiseks kasutati I fraktsiooni ja sahharoosi gradiendiga puhastatud mitokondreid. Teostatud lüüsimiskatsed olid vajalikud testimaks I fraktsiooni ja puhastatud mitokondrite võimalikke muutusi enne puhaste mitokondrite edasist kasutamist valgukomplekside uurimiseks. Oluline on siinkohal märkida, et I fraktsiooni mitokondrid ei sobi edasisteks proteoomilisteks analüüsideks, kuna sisaldavad palju muid tsütosoolseid komponente (lüsosoomid, peroksisoomid *etc.*), mis tehnilistel põhjustel takistavad vähem ekspresseeritud valkude detekteerimist. Seega spetsiifiliste valgukomplekside väljapuhastamiseks mitokondritest ja nende uurimiseks on eelnevalt vaja teostada mitokondrite puhastamine sahharoosi gradiendiga.

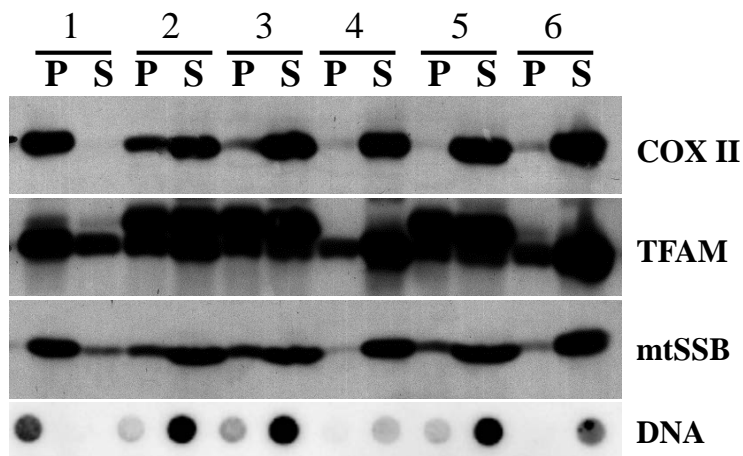
Katseteks valitud detergentideks olid digitoniin, Triton X-100, naatrium dodetsüülsulfaat, n-dodetsüül- β -D-maltoosid ning naatrium deoksükolaat (ülevaade detergentide ja katses kasutatud kontsentratsioonide kohta vt tabel 1). Digitoniin valiti antud katseteks eelkõige eelnevalt publitseeritud katseandmete ja -tulemuste alusel, st antud katsetes oli digitoniin pigem kontrolliks võrreldes teiste detergentidega. Digitoniin on pehme detergent, mis fraktsioneerib mitokondrite välismembraani ja sisemembraani. Suuremates kontsentratsioonides on digitoniin kasutusel OXPHOS komplekside väljapuhastamisel sisemembraanist (Schägger ja Pfeiffer, 2000). Triton X-100 on laialt kasutatud nõrk mitteioonine detergent, mis osaliselt solubiliseerib membraanivalke. Triton X-100 kasutati antud katsetes peamiselt sellepärast, et Triton X-100 sobib membraanide fraktsioneerimiseks, seejuures ei solubiliseeri Triton X-100 täielikult membraane, st antud detergentis lahustumatus fraktsioonis (pellet) asuvad mingil määral veel membraanivalgud. SDS on tugev anioone valke denatureeriv detergent, mis, nagu ka katsetega kinnitati, lüüsib efektiivselt sise- ja välismembraani ning lisaks solubiliseerib ja denatureerib ka nukleoididega seotud valgud. Antud katsetes oli SDS võetud kui väga tugev valkude denatureerija, seega andis SDS hea võrdluse teiste detergentidega lüüsimisel. DDM on SDS-ist pehmem detergent ning mittedenatureeriv, mis lüüsib efektiivselt küll sisemembraani, kuid antud detergent ei solubiliseeri täielikult nukleoididega seotud valke, sest mtSSB, TFAM asuvad nii

supernatandis kui pelletis (joonised 6 ja 7). DDM on lisaks varem kasutatud mitokondriaalsete OXPHOS superkomplekside solubiliseerimiseks (Schägger ja Pfeiffer, 2000; Schägger, 2001), millele tuginedes sobis DDM käesolevas töös edasi spetsiifiliste valkkomplekside väljapuhastamiseks. Naatrium deoksükolaat on sapisool ning seega mittesüntetiline (võrreldes teiste eelnevate detergentidega), mis solubiliseerib samuti mitokondriaalsete nukleoididega seotud valgud.

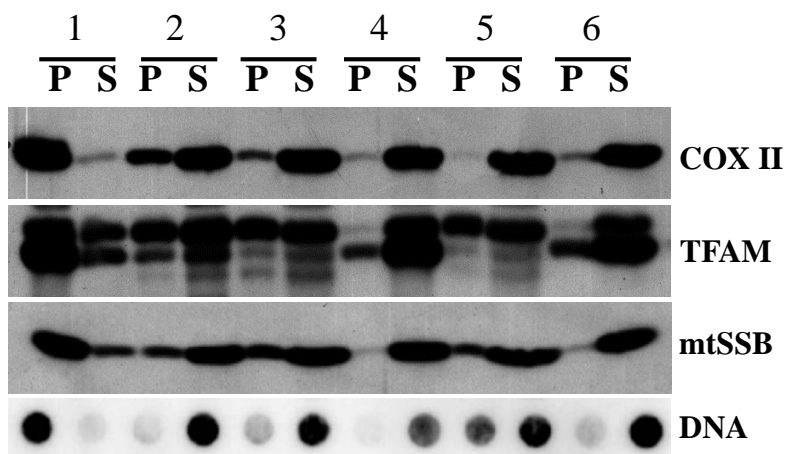
Naatrium deoksükolaat on antud töös oluline ka edasiste katsete jaoks, mis puudutab mitokondrite membraani mikrodomääni, ehk spetsiifilise nukleoidide ja membraanide vaheliste interaktsioonide uurimist. On teada, et mitokondrite membraan sisaldab väga vähe kolesterooli, st ainult 5% lipiididest sisemembraanis on kolesterool (Van Meer jt, 2008).

Spetsiifilisel fraktsioneerimisel digitoniiniga on leitud, et replitseeruvad nukleoidid on membraani osaga tugevasti seotud just nendes mitokondriaalse membraani piirkondades, kus paikneb ligi 50% sellest vähesest kolesteroolist. Kõrgemates kontsentratsioonides on digitoniinil võimalik kolesterooli sadestada, siinkohal tähendab see, et peale membraani fraktsioneerimise stabiliseerub digitoniin mitokondri sisemembraanis paiknevas kolesteroolirikkas mikrodomäänis. Triton X-100 ei sadesta ega solubiliseeri kolesterooli. Triton X-100 kasutatakse tavaliselt kolesterooli mikrodomääni iseloomustamiseks (vt viide Oliferenko jt, 1998). Kuna on näidatud, et naatrium deoksükolaat solubiliseerib kolesterooli (Matsuoka jt, 2002) on loogiline samm mikrodomääni lüüsimiseks kasutada naatrium deoksükolaati ja seejärel proteoomiliselt iseloomustada sisemembraanist vabastatud nukleoidid. (Gerhold jt, retsenseerimisel)

Valkude koosluste analüüsimiseks Western blotiga pärast lüüsimisi kasutati sisemembraani markervalku COX II (ETC valk), mitokondrite minimaalse replisoomi valku mtSSB ja mtDNA-ga seonduvat valku TFAM-i, viimasena analüüsiti mtDNA-d (vt eksperimentaalne osa). Lisaks on TFAM ja mtSSB mitokondriaalsete (replikatiivsete) nukleoididega seotud valgud ning seepärast sobivad analüüsimiseks. TFAM on eranditult praktiliselt alati kolokaliseeruv mtDNA-ga ning vastupidi.



Joonis 6. I fraktsiooni lüüsimine detergentidega ning Western analüüs antikehadega. 1 - negatiivne kontroll, 2 - digitoniin, 3 - Triton X-100, 4 - naatrium dodetsüülsulfaat, 5 - n-dodetsüül- β -D-maltosiid, 6 - naatrium deoksükolaat. Tulbad 1 kuni 6 tähistavad iga detergenti juures pelleti ja supernatandi fraktsioone, kusjuures vasakpoolne tulp on pellet ja parempoolne supernatant. TFAM - mitokondriaalne transkriptsioonifaktor, mtSSB - mitokondriaalne üheaahelalist DNA-d seondav valk, COX II - tsütokroom c oksüdaas II subühik.



Joonis 7. Puhaste mitokondrite lüüsimine detergentidega ning Western analüüs antikehadega. 1 - negatiivne kontroll, 2 - digitoniin, 3 - Triton X-100, 4 - naatrium dodetsüülsulfaat, 5 - n-dodetsüül- β -D-maltosiid, 6 - naatrium deoksükolaat. TFAM - mitokondriaalne transkriptsioonifaktor, mtSSB - mitokondriaalne üheaahelalist DNA-d seondav valk, COX II - tsütokroom c oksüdaas II subühik.

Tulemustest on näha, et suhtega 1:2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ (totaalne mitokondriaalne valk [μg]:digitoniin [μg]) lüüsitud I fraktsiooni mitokondrid sisaldavad pelletis veel sisemembraanis lokaliseeruvat tsütokroom c oksüdaas II subühikut (COX II) (joonis 6; COX II; 2. tulp). COX II paikneb antud juhul suuremas hulgas supernatandis kui pelletis (joonis 6, 2. tulp, P ja S), järelkult lisaks sisemembraani permeabiliseerimisele on alanud superkomplekside solubiliseerimine. Digitoniini lüüsi korral asub võrdlemisi suur hulk mtSSB ja TFAM pelletis, kus ka mtDNA on veel selgelt detekteeritud (joonis 6; 2. tulp), järelkult ei solubiliseeri digitoniin nukleoididega seotud valke. Sarnased tulemused on näha ka sahharoosi gradiendil puhastatud mitokondrite lüüsimisel digitoniiniga (joonis 7; 2. tulp).

Triton X-100 lüüsimisel (I fraktsioon ja puhastatud mitokondrid) asub mtDNA suuresti supernatandis (joonised 6 ja 7; mtDNA; 3. tulp; „Triton X-100“). mtNAP-id lokaliseerusid sarnaselt digitoniiniga nii pelletis kui supernatandis (joonis 6; TFAM, mtSSB; 3. tulp). Võrreldes digitoniiniga on COX II enam supernatandis kui pelletis nii I fraktsiooni kui ka sahharoosi gradiendiga puhastatud mitokondrite lüüsimisel (joonised 6 ja 7; COX II; 3. tulp).

SDS lüüsimise korral asuvad nii valgud TFAM, mtSSB kui ka mtDNA supernatandis (joonis 6; 4. tulp). Lisaks lüüsib SDS efektiivselt sisemembraani, kuna COX II asub praktiliselt täielikult supernatandis (joonis 6; 4. tulp „P ja S“). Samad tulemused on näha ka puhastatud mitokondrite fraktsiooni puhul (joonis 7; 4. tulp „P ja S“).

DDM puhul asub sisemembraani valk COX II nii I fraktsiooni mitokondrite (joonis 6; COX II; 5. tulp) kui ka puhastatud mitokondrite puhul (joonis 7; COX II; 5. tulp) suures hulgas supernatandis, kuid mtSSB ja TFAM asuvad võrdselt nii supernatandis kui pelletis (joonised 6 ja 7; TFAM, mtSSB; 5. tulp). mtDNA paikneb I fraktsiooni lüüsimisel DDM-ga sarnaselt digitoniiniga nii supernatandis kui ka pelletis (joonis 6; mtDNA; 5. tulp „P ja S“). Puhaste mitokondrite lüüsimisel asub mtDNA võrreldes digitoniiniga rohkem pelletis (joonis 7; mtDNA; 5. tulp).

Naatrium deoksükolaat solubiliseerib sarnaselt SDS-ga nukleoidiga seotud valgud TFAM ja mtSSB, mis asuvad nii I fraktsiooni lüüsimisel kui puhaste mitokondrite lüüsimisel suuremas enamuses supernatandis (joonis 1; TFAM, mtSSB; 6. tulp „S“). Lisaks asub mtDNA mõlema mitokondrite fraktsiooni lüüsimisel supernatandis (joonised 1 ja 2; mtDNA; 6. tulp „S“). Sisemembraani valk COX II asub naatrium deoksükolaadiga lüüsimisel supernatandis (joonised 1 ja 2; COX II; 6. tulp). Presenteeritud tulemusi võrreldi nii I fraktsiooni kui puhaste mitokondrite negatiivsete kontrollidega (joonised 1 ja 2; mõlemad 1. tulp „P ja S“), mille korral asuvad mtDNA ja uuritud valgud praktiliselt täielikult pelletis.

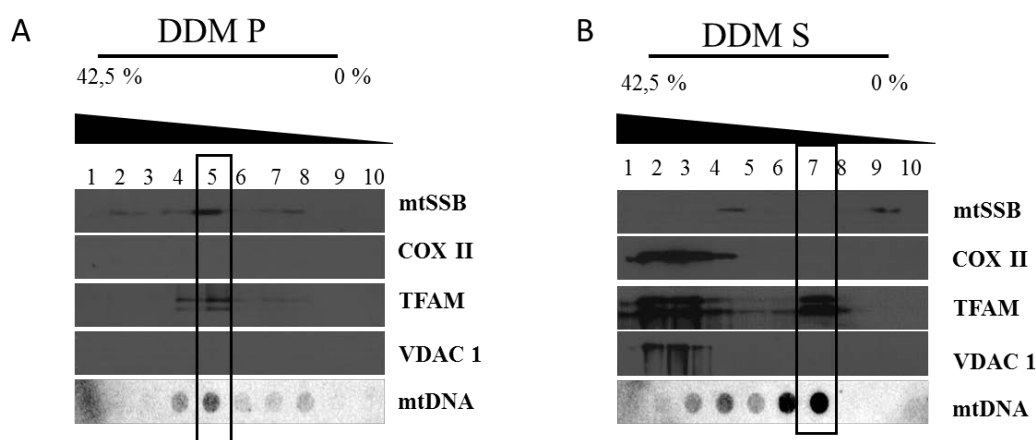
Tulemuste põhjal on selge, et I fraktsiooni ning puhastatud mitokondrite lüüsimise vahel puudusid olulised erinevused. See on oluline leid kuna, nagu enne mainitud, nukleoidide väljapuhastamisel flotatsiooni (iodiksanooli gradiendis) abil on ette nähtud, et mitokondrid läbivad enne lüüsimist sahharoosi gradiendi. Seni oli teadmata kas ja kuidas üks selline lisa puhastamise etapp mitokondriaalsetele membraanidele mõjub. Teiseks, natiivsete mitokondriaalsete nukleoidide väljapuhastamiseks sobivad eelkõige digitoniin, mida on varasemalt ka edukalt kasutatud (vt viide Rajala jt, 2014; Hensen jt, 2014) ning, nagu käesoleva töö käigus selgus, ka DDM. Antud detergentide puhul on näha, et mtDNA ning lisaks mitokondriaalsete nukleoididega seotud valgud (TFAM ja mtSSB) esinevad peale lüüsimist valdavalt nii pelletis kui ka supernatandis (joonised 1 ja 2; 2. ja 6. tulp). See toetab hiljutisi leidmisi, et imetajate mitokondrites esinevad erinevad nukleoidide klassid (Rajala jt, 2014). Järelikult oli paljulubav DDM-i abil lüüsitud mitokondrite analüüsimine iodiksanooli gradiendil.

2.3.1 Flotatsioon n-dodetsüül- β -D-maltosiidiga

Mitokondrite lüüsimistulemuste põhjal valiti DDM flotatsiooniks. Flotatsioon on väljapuhastatavate komponentide liikumine spetsiaalses tihedusgradiendis (antud juhul moodustab tihedusgradiendi mitteioonne iso-osmootne iodiksanool erinevate kontsentratsioonidega), kusjuures proov asub gradiendi erineva tihedusega astmete all, st tuubi põhjas. Proovi erinevad komponendid liiguvad tsentrifuugimisel massi alusel tihedusgradiendi kindlatesse fraktsioonidesse, mida on võimalik edasi analüüsida. Vastav meetod on välja töötatud eelkõige membraanide koosluse uurimiseks (Smart jt, 1995; Graham ja Billington, 1996; Graham jt, 1996; Oliferenko jt, 1999), kuid, nagu näha, töötab väga edukalt ka mitokondriaalsete nukleoidide fraktsioneerimiseks (Rajala jt, 2014). Käesolevaks katseks teostati esmalt sahharoosi gradiendil puhastatud mitokondrite lüüsimine ning eraldati supernatant ja pellet. Vastavad proovid viidi kõige kõrgema iodiksanooli kontsentratsioonini gradiendis, mille järel pipeteeriti ülejäänud gradiendi astmed nende proovide peale. Gradiendid tsentrifuugiti 100 000 g juures üle öö. DDM flotatsiooni tulemuste põhjal on näha pelletis fraktsioon (joonis 8-A; fraktsioon 5; tähistatud kastikesega), kus asuvad tõenäoliselt replikatiivsed mitokondriaalsed nukleoidid. On näha, et pelletis puudub sisemembraani valk COX II ning välismembraani markervalk VDAC 1 (mitokondriaalne poriin), mis on kooskõlas varasemate andmetega, et DDM on võimeline solubiliseerima mitokondriaalse membraani valgud (Schägger ja Pfeiffer 2000). Küll aga esineb pelleti V fraktsioonis mtDNA ning prominentelt mtDNA-valk kompleksidega assotsieerunud valgud mtSSB

(replitseeruvate nukleoidede markervalk) ja TFAM (TFAM lokaliseerub praktiliselt alati nukleoididega). Seega on mtDNA ja mtNAP-id liikunud ühtse kompleksina tihedusgradiendis ühte kindlasse fraktsiooni. Kuigi eeldatavasti pole replitseeruva nukleoidi fraktsioonis enamjaolt näha COX II ning VDAC1, on varasemate katsete käigus, mis kasutasid digitoniiniga lüüsitud mitokondreid, näidatud, et see spetsiifiline klass nukleoidide on väga tugevasti sisemembraaniga seotud ning paikneb teatud membraanivalgude lähedal. Praeguse töö käigus läbiviidud katsete puhul on järgmisena huvitav vaadata, kas ja mis ulatuses on spetsiifilised membraanivalgud veel näha kui mitokondrid on DDM-iga lüüsitud. Proteoomilised katsed, mis on antud hetkel teostamisel, peaksid sellele küsimusele vastama.

Lisaks on DDM flotatsiooni eelfraktsioneerimisest saadud supernatandis näha fraktsioon, kus puudub täielikult mtSSB ja teised valgud, kuid esineb TFAM ja mtDNA (joonis 8-B, fraktsioon 7 on tähistatud musta kastikesega). Alumistes fraktsioonides (1-4) on leida membraani markervalgud VDAC1 ja COX II, kuid mitte fraktsioonis 7, kus asub mtDNA ja TFAM. Esmalt näitab see, et DDM on tõepoolest membraanivalgud solubiliseerinud, aga lisaks ka seda, et teine klass nukleoidide, mis ei sisalda replisoomi valke liigub membraani markervalkudest sõltumatult.



Joonis 8. DDM (n-dodetsüül- β -D-maltosiidi) lüüsimise järgselt teostatud iodiksanooli gradient. A) Tegemist on peale eelfraktsioneerimist saadud pellet fraktsioonidega (1 kuni 10). Western-blot analüüsid kasutati mtSSB, TFAM, VDAC 1 ja COX II vastaseid antikehi detekteerimaks vastavate valkude esindatust tihedusgradiendi erinevates fraktsioonides (fraktsioonid vasakult lugedes 1 kuni 10, mille iodiksanooli kontsentratsioon on vastavalt 42,5% kuni 0%). mtDNA on näidatud spetsiifilise cytB-DNA prooviga. Replitseeruvate nukleoidide fraktsioon on tähistatud kastikesega. B) Tegemist on peale eelfraktsioneerimist saadud supernatandi fraktsioonidega. Western analüüsid kasutati mtSSB, TFAM, VDAC 1 ja COX II vastaseid antikehi detekteerimaks vastavate valkude esindatust tihedusgradiendi

erinevates fraktsioonides (fraktsioonid vasakult lugedes 1 kuni 10, mille iodiksanooli kontsentratsioon on vastavalt 42,5% kuni 0%). mtDNA on näidatud samuti cytB-DNA prooviga. Mittereplitseeruvate nukleoidide fraktsioon on näidatud musta kastikesega.

Käesoleva töö käigus produtseeritud iodiksanooli gradiendi fraktsioonide valgulist kooslust analüüsitakse antud hetkel LC-MS/MS abil. Kui varem oli näha, et COX II esines väga väikeses hulgas veel iodiksanooli gradiendi samas fraktsioonis, kus leiti ka replitseeruvad nukleoidid, siis antud juhul oli see DDM-iga lüüsitud mitokondrite puhul nähtamatu. Kuna COX II ei kuulu mtNAP-ide hulka, on praegused proteoomilised katsed väga paljulubavad näitamaks, kas väga spetsiifiliselt replitseeruvate nukleoidide koosseisus võib-olla uusi tundmatuid mtNAP-e, või mõlemaid.

3. KOKKUVÕTE

Praeguseks on publitseeritud suurel hulgal andmeid, mis on andnud üsnagi laiapõhjalise ülevaate mitokondriaalsetest DNA-valk struktuuridest, nende tõenäolisest kooslusest ning funktsioonist. Siiski leiab avaldatud tulemuste puhul ebakõlasid just puudulike isoleerimis- ja identifitseerimismeetodite vahel. Seepärast on väga oluline välja töötada vajalikud nukleoidide eraldamisskeemid, et paremini mõista ja uurida erinevate valkude lokalisatsiooni (k.a omavahelist) mitokondrites ning panna paika piir, alates millest on tegemist nukleoididega seotud valkudega ja mida tuleks lugeda „saastumuseks“. Ülimalt oluliseks on muutunud nukleoidide kompositsiooni uurimine mitokondriaalsete haiguste geneetikas, mis loodetavasti lähimas tulevikus aitab mitokondriaalseid defekte paremini ja efektiivsemalt diagnoosida ning võimalik, et ka ravida. Laiemas kontseptsioonis on mtDNA geneetika peamised eesmärgid olnud ja on ka edaspidi vajadus mõista mtDNA päritavust, somaatilist segregatsiooni ning mtDNA mutatsioonide koespetsiifilisuse efekte (Aanen jt, 2015).

Käesolevas töös testiti esmalt erinevate detergentide mõju mitokondrite väljapuhastamisele. Eesmärgiks oli leida natiivsete nukleoidide puhastamiseks sobiv detergent, mida edasi uurida. Eksperimentides kasutati mitokondrite lüüsimiseks kahte erinevat fraktsiooni: I fraktsioon ja sahharoosi gradiendiga puhastatud mitokondrid. Peale lüüsimist valiti sobiv detergent mitokondrite subfraktsioneerimiseks ja nukleoidide väljapuhastamiseks. Selleks oli DDM.

Antud katsed andsid paljulubavaid tulemusi edasisteks natiivsete mitokondriaalsete nukleoidide väljapuhastamiskatseteks. Katsete käigus selgus, et mitokondrite seis enne ja peale sahharoosi gradienti ei erine. Seda tõestati erinevate detergentidega lüüsimisel kasutades puhastamata ja puhastatud mitokondreid. Mistõttu on kinnitatud, et gradiendiga puhastatud mitokondrid sobivad edaspidisteks katseteks näiteks flotatsiooniks. Kuna DDM flotatsiooni tulemustest selgus, et pelleti fraktsioonides puudusid membraanivalgud, aga nukleoidid olid (Western'i piltide järgi otsustades) veel tõenäoliselt natiivselt olemas, otsustati analüüsida DDM 5. fraktsiooni LC-MS/MS-ga. Lisaks otsustati analüüsida veel üht DDM subfraktsioneerimisel saadud fraktsiooni, mis asus supernatandis ning mis tõenäoliselt sisaldab mittereplitseeruvat nukleoidi.

Edasiste katsete eesmärgiks on natiivsete mitokondriaalsete nukleoidide koosluste uurimine ja kirjeldamine.

Optimisation of Isolation Strategies to Determine the Composition of Mitochondrial DNA-Protein Complexes Termed Nucleoids

Koiti Aasumets

SUMMARY

Mitochondria are double-membrane-enclosed organelles of eukaryotic cells specialized for ATP synthesis via oxidative phosphorylation. Mammalian mitochondria possess their own circular DNA (mtDNA) that encodes for 37 genes, 13 of which are substantial subunits of the mitochondrial respiratory chain. The minimal replisome in mitochondria consists of the DNA helicase Twinkle, the single-strand binding protein mtSSB and polymerase γ (POLG). It is now clear that mtDNA is not a naked molecule in the mitochondrial matrix, but constitutes complexes with a variety of proteins. These mitochondrial mtDNA-protein complexes are termed mitochondrial nucleoids and all proteins that interact with nucleoids are summarized as mitochondrial nucleoid associated proteins (mtNAPs). Mitochondrial nucleoids are located at the mitochondrial inner membrane. To date, there is no comprehensive and conclusive list of all mtNAPs that would allow for a precise definition of the term nucleoid. This is partially due to difficulties arising from mitochondrial nucleoid purification methods and a lack of consensus between different purification strategies. The vast majority of mtNAP purification methods, which aimed at isolating mitochondrial nucleoids or proteins of interest, have identified many proteins of which it is still unclear how to classify these. It is therefore important to still improve methods for isolating mitochondria.

The aim of this work was to initially test the impact of different detergents on crude and sucrose-gradient purified mitochondria. Both crude and pure mitochondria were lysed with 5 different detergents: digitonin, Triton X-100, sodium dodecylsulfate, n-dodecyl- β -D-maltoside and sodium deoxycholate. The detergents used in these experiments were selected based on their properties and previously published data. The behaviour of characteristic marker proteins for nucleoids and mitochondrial membranes after lysis of purified mitochondria was analysed by Western blot and mtDNA was detected by Southern hybridization. Firstly there were no significant differences in the quantity of proteins and mtDNA between crude and purified mitochondrial lysis methods. Based on the obtained results DDM and digitonin were promising candidates for further investigation, i.e. for native nucleoid purification steps. Thus, DDM lysed pure mitochondria were fractionated into a lesser soluble pellet and a more soluble supernatant fraction. Thereafter both obtained lysate-

fractions were further subjected to iodixanol density gradient and ultracentrifuged for 14 hours at 100 000 g. In previously published experiments subfractionation and iodixanol density gradient purification with digitonin have been successfully conducted. The purification of DDM lysed pure mitochondria with iodixanol density gradient of the initial pellet fraction showed that mtDNA and mtNAPs co-localize in a single gradient-fraction and apparently form a complex. Moreover, respective fractions were tested for prevalent mitochondrial membrane marker proteins (inner membrane protein COX II and outer membrane protein VDAC 1) and no signals were detected with Western-blot analysis.

These results thus show that by using DDM for mitochondrial fractionation it is possible to purify intact mitochondrial nucleoids. Further investigation with DDM purification results is required, because the exact composition of these nucleoids is still unknown. The subsequent work is therefore currently focused on the analysis of DDM lysed samples with LC-MS/MS. Before long this is expected to make a significant contribution to the list of mtNAPs and to further improve the definition of the term „mitochondrial nucleoid“. These findings will produce relevant data to contribute to the elucidation of downstream consequences of mtNAP-malfunctioning that is likely to be linked to various mitochondrial diseases.

LISAD

Lisa 1 Töölahused

10X PBS

1,37 M NaCl

27 mM KCl

81 mM Na₂HPO₄

17,6 mM KH₂PO₄

ddH₂O lõppruumalani

10X homogeniseerimispuhver

400 mM Tris-HCl pH 7,8

250 mM NaCl

50 mM MgCl₂

ddH₂O lõppruumalani

5X SDS proovipuhver

250 mM Tris-HCl pH 6,8

50% glütserool

10% SDS

0,5% broomfenoolsinine

250 mM DTT

5X SDS valguforeesi puhver

142,15 g Glütsiin

35 g Tris alus

10g SDS

ddH₂O lõppruumalani

1 M sahharoos

6,8 g sahharoos (RNAasi vaba)

10 mM Tris-HCl pH 7,4

1 mM EDTA

1,5 M sahharoos

10,3 g sahharoos (RNAasi vaba)

10 mM Tris-HCl pH 7,4

1 mM EDTA

20X SSC

3 M NaCl

300 mM Trinaatriumtsitraat dihidraat

ddH₂O lõppruumalani

Church Buffer

0,25 M NaPi (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄) pH 7,2

1 mM EDTA pH 8,0

0,5 % (w/v) BSA

7% (w/v) SDS

Church-wash-buffer

40 mM NaPi (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄)

1 mM EDTA pH 8,0

5% (w/v) SDS

10X wet transfer puhver

0,25 M Tris alus

1,9 M Glütsiin

0,2 % SDS

ddH₂O lõppruumalani

1X wet transfer puhver lisaks 20 % CH₃OH

10X TBS

1,5 M NaCl

500 mM Tris, pH 7,5

ddH₂O up to final volume

STOCK lahus

30% AAm/BAAm (29:1)

ddH₂O

Tris/SDS lahus pH 8,8

1,5 M Tris-HCl puhver pH 8,8

10% SDS

STACK lahus

30% AAm/BAAm (29:1) lahust

10% SDS

1M Tris-HCl puhvrit pH 6,8

ddH₂O lõppruumalani

Bradford reaktiiv

60 mg CBB G250 50 ml 96% etanoolis

100 86% H₃PO₄

30 mg SDS

ddH₂O lõppruumalani

Western strip puhver

200 mM glütsiin pH 2,3

1% SDS

ddH₂O lõppruumalani

Luminool

1,5 M Tris pH 8,8

37 µl H₂O₂

22,5 mg 5-amino-2,3-dihüdro-1,4-ftalazinedioon 1 ml DMSO-s

ddH₂O lõppruumalani

Võimendaja (ECL) lahus

11 mg Parakumaarhape

10 ml DMSO

Lisa 2 Antikehad

Antikeha	Organism	Firma	Kataloogi nr
Anti-hiir (HRP)	Hobune	Vector Laboratories	PI-2000
Anti-küülik (HRP)	Kits	Vector Laboratories	PI-1000
Anti-SSBP1	Küülik	Sigma-Aldrich	HPA002866
Anti-TFAM	Küülik	Nordic Biosite	22586-1-AP
Anti-VDAC1	Hiir	Santa Cruz Biotechnology Inc.	sc-390996
Anti-COX II	Küülik	Abcam®	ab109739

Lisa 3 PCR programm

Tsükkel	Temperatuur °C	Aeg	
Alge denaturatsioon	95°C	3-5 min	
Denaturatsioon	95°C	30 sek	} 20 tsüklit
Praimerite seondumine	55°C	30 sek	
Elongatsioon	72°C	45 sek	
Hoidmine	10°C	∞	

ALLIKAD

- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N. and Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* 31: 1640–1645.
- Aanen, D. K., Spelbrink, J. N., Beekman, M. (2015). What cost mitochondria? The maintenance of functional mitochondrial DNA within and across generations. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 1-8.
- Amati-Bonneau, P., Valentino, M. L., Reynier, P., Gallardo, M. E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J. G., Carroccia, R., Iommarini, L., Labauge, P., Figarella-Branger, D., Marcorelles, P., Furby, A., Beauvais, K., Letournel, F., Liguori, R., La Morgia, C., Montagna, P., Liguori, M., Zanna, C., Rugolo, M., Cossarizza, A., Wissinger, B., Verny, C., Schwarzenbacher, R., Martin, M. A., Arenas, J. i. n., Ayuso, C., Garesse, R., Lenaers, G., Bonneau, D., Carelli, V. (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131: 338-351.
- Barat, M., Rickwood, D., Dufresne, C. and Mounolou, J. C. (1985). Characterization of DNA-protein complexes from the mitochondria of *Xenopus laevis* oocytes. *Exp. Cell Res.* 157: 207–217.
- Bereiter-Hahn, J. and VoØth, M. (1997). Distribution and dynamics of mitochondrial nucleoids in animal cells in culture. *Exp. Biol. Online* 1: 1–17.
- Bogenghagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L. and Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol. Cell Proteomics* 2: 1205–1216.
- Bogenghagen, D. F., Rousseau, D. and Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J. Biol. Chem.* 283: 3665–3675.
- Busch, K. B., Kowald, A., Spelbrink, J. N. (2014). Quality matters: how does mitochondrial network dynamics and quality control impact on mtDNA integrity? *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 1-12.
- Chen, H., McCaffery, J. M., Chan, D. C. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130: 548-562.
- Chen, X. J., Butow, R. A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Rev Genet* 6: 815-825.

- Dairaghi, D. J., Shadel, G. S. and Clayton, D. A. (1995). Addition of a 29 residue carboxylterminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J. Mol. Biol.* 249: 11-28.
- De Brito, O. M., Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605-610.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., Gustafsson, C. M. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. (2002). *Nat. Genet.* 31: 289-294.
- Falkenberg, M., Larsson, N. G., Gustafsson, C. M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 679-699.
- Fridlender, B., Fry, M., Bolden, A. and Weissbach, A. (1972). A new synthetic RNA dependent DNA polymerase from human tissue culture cells (HeLa-fibroblast-synthetic oligonucleotides-template-purified enzymes). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69: 452-455.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., Van Der Blik, A. M. and Spelbrink, J. N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol. Biol. Cell* 14: 1583–1596.
- Ghrir, R., Mignotte, B. and Gueride, M. (1991). Amino terminal sequence of the mitochondrial protein mtDBP-C: similarity with nonhistone chromosomal proteins HMG 1 and 2. *Biochimie* 73: 615–616.
- Graham, J. M., Billington, D. (1996). Iodixanol-a new density gradient medium for the dissection of the endosomal compartment. *Z. Gastroenterol.* 34: 76-78.
- Graham, J. M., Higgins, J. A., Gillot, T., Taylor, T., Wilkinson, J., Ford, T., Billington, D. (1996). A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generated gradients of Iodixanol. *Atherosclerosis* 124: 125-135.
- 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.
- Hoke, G. D., Pavco, P. A., Ledwith, B. J. and Van Tuyle, G. C. (1990). Structural and functional studies of the rat mitochondrial single strand DNA binding protein P16. *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 116–124.
- Hu, J., de Souza-Pinto, N. C., Haraguchi, K., Hogue, B. A., Jaruga, P., Greenberg, M. M., Dizdaroglu, M., Bohr, V. A. (2005). Repair of formamidopyrimidines in DNA

- involves different glycosylases: role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes. *J. Biol. Chem.* 280: 40544-40551.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E. L., Stewart, J. D., He, L., Schaefer, A. M., Griffiths, P. G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., McFarland, R., Turnbull, D. M., Chinnery, P. F., Taylor, R. W. (2008). Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131: 329-337.
- Holt, I. J., He, J., Mao, C. C., Boyd-Kirkup, J. D., Martinsson, P., Sembongi, H., Reyes, A. and Spelbrink, J. N. (2007). Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* 7: 311–321.
- Iborra, F. J., Kimura, H. and Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* 2: 9.
- Kasiviswanathan, R., Gustafson, M. A., Copeland, W. C., Meyer, J. N. (2011). Human mitochondrial DNA polymerase γ exhibits potential for bypass and mutagenesis at UV-induced cyclobutane thymine dimers. *J Biol Chem.* 287: 9222-9229.
- Kazak, L., Reyes, A. and Holt, I. J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13: 659–671.
- 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.
- Keane, P. C., Kurzava, M., Blain, P. G., Morris, C. M. (2011). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinson's disease* 2011: 1-18.
- Kruse, B., Narasimhan, N., Attardi, G. (1989). Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* 58: 391-397.
- Lakshmipathy, U., Campbell, C. (1999). The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3869-3876.
- Lan, L. (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101: 13738–13743.
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A. and Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* 117: 2653–2662.

- Magnusson, J., Orth, M., Lestienne, P. and Taanman, J. W. (2003). Replication of mitochondrial DNA occurs throughout the mitochondria of cultured human cells. *Exp. Cell Res.* 289: 133–142.
- Margineantu, D. H., Cox, W. G., Sundell, L., Sherwood, S. W., Beechem, J. M., and Capaldi, R. A. (2002). Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1: 425–435.
- Mason, P. A., Matheson, E. C., Hall, A. G., Lightowers, R. N. (2003). Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 31: 1052-1058.
- Meeusen, S. and Nunnari, J. (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J. Cell Biol.* 163: 503–510.
- Mignotte, B., Barat, M. and Mounolou, J. C. (1985). Characterization of a mitochondrial protein binding to single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 13: 1703–1716.
- Mignotte, B. and Barat, M. (1986). Characterization of a *Xenopus laevis* mitochondrial protein with a high affinity for supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res.* 14: 5969–5980.
- Mita, S., Monnat, R. J. Jr., Loeb, L. A. (1988). Resistance of HeLa cell mitochondrial DNA to mutagenesis by chemical carcinogens. *Cancer Res.* 48: 4578-4583.
- Moraes, C. T. (2001). What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet.* 17: 199–205.
- Newmeyer, D. D., Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112: 481-490.
- Oliferenko, S., Paiha, K., Harder, T., Gerke, V., Schwärzler, C., Schwarz, H., Beug, H., Günthert, U., Huber, L. A. (1999). Analysis of CD44-containing lipid rafts: recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 146: 843-854.
- Osman, C., Noriega, T. R., Okreglak, V., Fung, J. C., Walter, P. (2015). Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion. *PNAS* 112: 947-956.
- Palmer, C. S., Osellame, L. D., Stojanovski, D., Ryan, M. T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal* 23: 1534-1545.
- Pohjoismaki, J. L., Wanrooij, S., Hyvarinen, A. K., Goffart, S., Holt, I. J., Spelbrink, J. N. and 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 Res.* 34: 5815–5828.

- Rajala, N., Gerhold, J. M., Martinsson, P., Klymov, A. and Spelbrink, J. N. (2014). Replication factors transiently associate with mtDNA at the mitochondrial inner membrane to facilitate replication. *Nucleic Acid Res.* 42: 952-967.
- Rajala, N., Hensen, F., Wessels, H. J. C. T., Ives, D., Gloerich, J., Spelbrink, J. N. (2015). Whole cell formaldehyde cross-linking simplifies purification of mitochondrial nucleoids and associated proteins involved in mitochondrial gene expression. *Plos One* 10: 1-20.
- Robin, E. D., Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol.* 136: 507-513.
- Rouzier, C., Bannwarth, S., Chaussonot, A., Chevrollier, A., Verschueren, A., Bonello-Palot, N., Fragaki, K., Cano, A., Pouget, J., Pellissier, J. F., Procaccio, V., Chabrol, B., Paquis-Flucklinger, V. (2012). The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 135: 23-34.
- Satoh, M. and Kuroiwa, T. (1991). Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell Res.* 196: 137–140.
- Schägger, H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52: 119-128
- Schägger, H., Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19: 1777-1783.
- Shoubridge, E. A. (2000). Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum. Reprod.* 15: 229–234.
- Smart, E. J., Ying, Y-S., Mineo, C., Anderson, R. G. (1995). A detergent-free method for purifying calveolae membranes from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10104-10108.
- Spelbrink, J. N. (2010). Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. *IUBMB Life* 62: 19-32.
- Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G. M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H. T., Zeviani, M., Larsson, C. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* 28: 223-231.
- Szczesny, B., Tann, A. W., Longley, M. J., Copeland, W. C., Mitra, S. (2008) Long patch base excision repair in mammalian mitochondrial genomes. *J. Biol. Chem.* 283: 26349-26356.

- Sutherland, B. W., Toews, J., Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass-spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J. Mass Spectrom.* 43: 699-715.
- Zhang, H., Barcelo, J. M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Pommier, Y. (2001). Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 10608-10613.
- Takamatsu, C., Umeda, S., Ohsato, T., Ohno, T., Abe, Y., Fukuoh, A., Shinagawa, H., Hamasaki, N. and Kang, D. (2002). Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep.* 3: 451-456.
- Thyagarajan, B., Padua, R. A., Campbell, C. (1996). Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity. *J. Biol. Chem.* 271: 27536-27543.
- Tomkinson, A. E., Bonk, R. T., Linn, S. (1988). Mitochondrial endonuclease activities specific for apurinic/apyrimidinic sites in DNA from mouse cells. *J. Biol. Chem.* 263: 12532-12537.
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1797: 113-128.
- Vafai, S. B., Mootha, V. K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491: 374-383.
- Van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 112-124.
- Van Tuyle, G. C. and Pavco, P. A. (1981). Characterization of a rat liver mitochondrial DNA-protein complex. Replicative intermediates are protected against branch migrational loss. *J. Biol. Chem.* 256: 12772-12779.
- Vandecasteele, G., Szabadkai, G., Rizzuto, R. (2001). Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. *IUBMB Life* 52: 213-219.
- Wang, Y. and Bogenhagen, D. F. (2006). Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 281:25791-25802.
- Youle, R. J., Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 12: 9-14.

TÄNUAVALDUSED

Käesoleva töö autor tänab siiralt oma juhendajat Joachim Matthias Gerhold'i osutatud nõu ning suure abivalmiduse eest. Lisaks soovib autor tänada oma töögrupi liikmeid kaasabi ning meeldiva seltskonna eest.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Koit Aasumets (08.03.1993),

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

Mitokondriaalsete DNA- Valk komplekside (nukleoidide) koosluse määramiseks vajalike eraldamisskeemide optimeerimine,

mille juhendaja on Joachim Matthias Gerhold,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015