

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MAM valgu mitofusiin 2 mõju analüüs inimese mitokondriaalsetele nukleoididele

Bakalaureusetöö

12 EAP

Yuliya Basikhina

Juhendajad Koit Aasumets, MSc

Joachim Matthias Gerhold, PhD

TARTU 2018

MAM valgu mitofusiin 2 mõju analüüs inimese mitokondriaalsetele nukleoididele

Mitokondriaalne DNA (mtDNA) moodustab komplekse valkudega. Neid komplekse nimetatakse nukleoidideks. Esineb vähemalt 2 erineva valgulise kooslusega nukleoidide populatsiooni. Üks neist sisaldab replitseeruvaid nukleoide ning on mitokondri sisemembraaniga tugevamalt seotud. Need nukleoidid paiknevad MAM-struktuuride läheduses ning on näidatud, et MAM-id mängivad olulist rolli mtDNA säilitamise regulatsioonis. Käesolevas töös uuriti MAM valgu Mfn2 mõju nukleoididele ning MAM-struktuure moodustavatele valkudele. Mfn2 lühiajaline kadu põhjustas MAM-struktuuride vähenemist ning mtDNA koopiaarvu tõusu. Samuti esines nõrk mõju nukleoidi valkude ekspressiooni tasemele, mis võib tähendada, et Mfn2 vähenemine mõjutab nukleoidi stabiilsust.

Märksõnad: mitokondri, mitokondriaalne DNA, MAM, Mfn2

CERCS teaduseriala: P320 nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees; P340 membraanid

The analysis of MAM protein Mfn2 impact on human mitochondrial nucleoids

Mitochondrial DNA (mtDNA) forms complexes with proteins. These complexes are termed mitochondrial nucleoids. There are at least 2 subpopulations of nucleoids with distinct protein composition. One of the subsets contains replicating nucleoids that are more tightly associated with the mitochondrial inner membrane. Those nucleoids are located close to MAM structures, which are shown to impact mtDNA maintenance. The aim of this work was to analyze the impact of MAM protein Mfn2 on other MAM proteins and nucleoids. Short-term loss of Mfn2 caused a decrease in MAM proteins and an increase in mtDNA copy number. It also caused a slight change in expression of nucleoid proteins, which suggests that Mfn2 might have an impact on nucleoid stability.

Keywords: mitochondrion, mitochondrial DNA, MAM, Mfn2

CERCS research specialty: P320 synthesis of nucleic acids and proteins; P340 membranes

SISUKORD

Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	7
1. Kirjanduse ülevaade	8
1.1 Mitokonder.....	8
1.2 Mitokondriaalne DNA	9
1.2.1 MtDNA metabolism	10
1.3 Mitokondriaalsed nukleoidid	12
1.3.1 Nukleoidi moodustavad valgud ja mtNAP-id	13
1.3.2 Nukleoidide alampopulatsioonid.....	14
1.3.3 MtDNA pärandumine ja segregatsioon	14
1.3.4 MtDNA koopiaarv ja selle regulatsioon.....	15
1.4 MAM-struktuurid.....	16
1.5 Mitokondrite ja mtDNA dünaamika	17
1.6 Mitokondriaalsed haigused	20
2. Eksperimentaalosa	22
2.1 Töö eesmärgid.....	22
2.2 Materjalid ja meetodika	22
2.2.1 Rakuliin ja sööde	22

2.2.2	RNA interferents	23
2.2.3	Totaalse DNA eraldamine ja qPCR analüüs.....	23
2.2.4	Mitokondrite eraldamine ja lüüsimine.....	24
2.2.5	Western blotting	25
2.2.6	Dot blot ja hübridisatsioon	25
2.3	Tulemused.....	26
2.3.1	Twinkle <i>knockdown</i> 'i tulemusel langeb mtDNA koopiaarv märgatavalt	26
2.3.2	Lühiajaline Mfn2 <i>knockdown</i> mõjutab MAM-struktuure ning nukleoidi	27
2.3.3	Pikaajaline Mfn2 <i>knockdown</i> ei oma efekti MAM-idele.....	29
2.4	Arutelu	31
	Kokkuvõte	34
	Summary.....	35
	Tänuavaldused.....	37
	Kirjanduse loetelu.....	38
	Lisad	50
	Lisa 1 Töölahused.....	50
	Lisa 2 Praimerid	51
	Lisa 3 PCR programmid, reaktsioonisegu.....	51
	Lisa 4 Antikehad ja siRNA-d	51
	Lihtlitsents	54

KASUTATUD LÜHENDID

ATAD3 - ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3

APP – amüloidne eellasvalk

BER – aluse väljalõike reparatsioon

BSA – veise seerumalbumiin

CMT2A – Charcot-Marie-Tooth haigus tüüp 2A

COXII – tsütokroomi oksüdaasi subühik II

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagle's meedium

DMSO – dimetüülsulfoksiid

Drp1 – dünaaminseotud valk 1

DTT – ditiotreitol

ECL – võimendatud kemiluministsents

FACL4 - pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4

FBS – veise looteserum

Fis1 – mitokondriaalne fissiooni valk 1

Grp75 – glükoosi poolt reguleeritud valk 75kDa

HEK – inimese embrüonaalsed neerurakud

HRP – mädarõika peroksidaas

HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa

IP3R – inositol-1,4,5-trifosfaat retseptor

MAM – mitokondritega assotsieerunud ER-membraanid

MELAS – mitokondriaalne entsefalopaatia, laktatsidoos ning insuldilaadsed episoodid

MERRF - müoklooniline epilepsia narmendavate punaste lihaskiududega

Mff – mitokondriaalne fissioonifaktor

Mfn1/2 – mitofusiin 1/2

mtNAP – mitokondriaalsete nukleoididega assotsieerunud valk

mtSSB – mitokondriaalne üheaheelalise DNA-ga seonduv valk

OPA1 – optiline atroofia 1

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus

PEO – progresseeruv väline oftalmopleegia

POLRMT – mitokondriaalne RNA polümeraas

SDM – ahela väljatõrjumise mudel

SDS-PAGE – naatriumdodetsüülsulfaat-poliakrüülamiid geelelektroforees

SSC – naatriumkloriid naatriumtsitraat

TBST – Tris puhverdatud soolalahus Tween 20 lisandiga

TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A

TFB2M – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor B2

VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1

SISSEJUHATUS

Mitokondrid on kahe membraaniga ümbritsetud organellid, mis täidavad rakus mitut olulist funktsiooni. Need vastutavad rakule vajaliku energia ATP-ks konverteerimise eest. Lisaks osalevad mitokondrid näiteks kaltsiumi ionide transpordis ning nende kontsentratsiooni reguleerimises (Rizzuto *et al.*, 1998).

Mitokondrite normaalseks funktsioneerimiseks on oluline mitokondriaalse DNA (mtDNA) korrektne metabolism, kuna selle pealt on kodeeritud hingamisahela ensüümide subühikud, mis on vajalikud oksüdatiivse fosforüülimise läbiviimiseks. MtDNA tase rakus võib varieeruda sõltuvalt koetüübist ning raku metaboolsest seisundist. Mutatsioonid mtDNA-s või selle taseme langus võivad põhjustada erinevaid raskeid haigusi. Seetõttu on oluline saada teadmisi mehhanismidest, mis tagavad mtDNA säilitamise.

On teada, et mtDNA ei esine mitokondris paljalt, vaid moodustab komplekse valkudega. Neid nimetatakse nukleoidideks. Nukleoidi valgulist koostist on keeruline üksüheselt määrata, kuid on teada, et nukleoidi koosseisu kuuluvad mitmed mtDNA metabolismiga seotud valgud. Mitokondrites esineb vähemalt 2 eristatavat nukleoidide alampopulatsiooni (Rajala *et al.*, 2014). Üks neist sisaldab replikatiivseid valke ning on mitokondri sisemembraaniga tugevamalt assotsieerunud. Teine alampopulatsioon tõenäoliselt osaleb muudes protsessides. Replitseeruvad nukleoidid paiknevad mitokondrite ja ER-i membraanide kontaktide läheduses. Neid kontakte nimetatakse MAM-struktuurideks (ingl *mitochondria-associated ER-membranes*). MAM-struktuurid on erilised membraanide piirkonnad ning nende moodustamises osalevad mitmed spetsiifilised valgud. Kuna mtDNA replikatsioon toimub eelistatult just nendes piirkondades, on alust arvata, et MAM-struktuurid võivad mõjutada mtDNA metabolismi.

Antud töö eesmärkideks oli uurida, kas ja kuidas mõjutavad MAM-struktuurid mtDNA koopiaarvu ja nukleoidi valgulist kooslust, seejuures fookuses oli MAM valk mitofusiin 2 (Mfn2). Töö eksperimentaalosa oli teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mitokonder

Mitokonder on eukariootse raku organell, mis on ümbritsetud kahe membraaniga. Välismembraan eraldab mitokondri tsütosoolist ning sisaldab kanaleid ainete transpordiks. Sisemembraan on väiksema läbilaskvusega ning moodustab suurel hulgal kristasid, mis suurendavad selle pindala. Membraanide vahele jääb membraanidevaheline ruum. Mitokondri sisemist ruumi nimetatakse maatriksiks.

Endosümbioosi teooria järgi pärineb mitokonder alfaproteobakterilt (Yang *et al.*, 1985), kes on liitunud eukariootse raku eellasega endosümbioosi teel. Seda teooriat tõestab mitokondriaalse DNA olemasolu ning kaudselt ka mitmete mitokondriaalsete valkude bakteriaalne päritolu. Näiteks mitokondriaalne üheaahelalise DNA-ga seonduv valk (mtSSB, ingl *mitochondrial single-stranded DNA binding protein*) on sarnane *Escherichia coli* vastava funktsiooniga valgule (Tiranti *et al.*, 1993). Mõned teised valgud on tõenäoliselt pärit baktereid nakatavatelt viirustelt, näiteks mitokondriaalne DNA helikaas Twinkle on T7 faagi gp4 valgu homoloog (Spelbrink *et al.*, 2001).

Mitokondritel on palju olulisi funktsioone, neist põhiline on energia konverteerimine ATP-ks oksüdatiivse fosforüülimise teel. Selle jaoks on mitokondrite sisemembraanis olemas elektrontransportahela ensüümid, mis kannavad elektrone NADH-lt ja FADH₂-lt hapnikule, tekitades ATP sünteesiks vajaliku prootongradiendi. NADH-lt pärit elektronid kantakse üle kompleks I-le ning see pumpab prootoneid maatriksist membraanivahelisse ruumi. FADH₂-lt lähevad elektronid kompleks II-le. Kompleks I-lt ja II-lt liiguvad elektronid edasi ubikinoonile. Edasi lähevad elektronid kompleks III-le, seejuures toimub prootonite väljapumpamine. Seejärel kantakse elektrone tsütokroom c-le ning sellelt edasi tsütokroomi oksüdaasile, mis pumpab prootoneid välja ning redutseerib hapniku veeks. Prootonid liiguvad membraanivahelisest ruumist tagasi mitokondri maatriksisse läbi ATP-süntaasi kompleksi ning nende energiat kasutatakse ATP sünteesiks.

Lisaks sellele leiavad mitokondrites aset tsitraaditsükli reaktsioonid, rasvhapete β -oksidatsioon ning steroidhormoonide süntees. Mitokondrid osalevad ka kaltsiumi signalisatsioonis ning kaltsiumi ionide kontsentratsiooni regulatsioonis (Vandecasteele *et al.*, 2001; Rizzuto *et al.*, 1998; Csordás *et al.*, 2006). Samuti mängivad

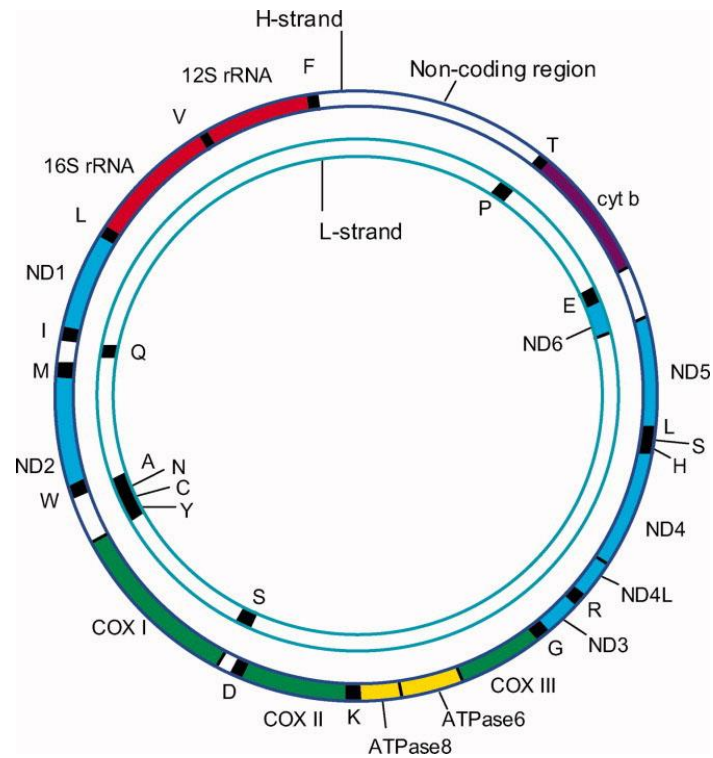
mitokondrid olulist rolli apoptoosis ehk programmeeritud raku surmas ning selle regulatsioonis (Kluck *et al.*, 1997).

1.2 Mitokondriaalne DNA

Inimese mitokondriaalne DNA (mtDNA) on kaheahelaline rõngasmolekul pikkusega umbes 16 500 aluspaari (Joonis 1). Ahelad erinevad omavahel nukleotiidses koostises poolest (Falkenberg *et al.*, 2007): guaniinirikamat ahelat nimetatakse raskeks ahelaks ning guaniinivaesemat kergeks ahelaks. Tüüpiliselt esineb mtDNA monomeersete rõngaste või dimeeridena (Clayton *et al.*, 1970), kuid on ka erandeid, näiteks südamelihaskoe mtDNA moodustab hargnenud multimeerseid struktuure (Pohjoismäki *et al.*, 2009). Ka hiirte puhul on näidatud, et erinevates kudedes esinevad erinevad mtDNA topoloogilised vormid (Herbers *et al.*, 2018).

Enamus mitokondriaalseid valke on kodeeritud tuuma genoomis ning neid transporditakse mitokondri vastavasse kompartmenti tsütosoolist tänu spetsiifilisele signaaljärjestusele (Horwich *et al.*, 1985). Inimese mitokondriaalses genoomis on vaid 37 geeni: 13 valku, mis on elektrontransportahela ensüümide subühikud, 22 tRNA geeni ning 2 rRNA geeni (Joonis 1). Lisaks esineb mtDNA-s suur, umbes 1000 aluspaari pikkune mittekodeeriv ala (NCR, ingl *non-coding region*), mis sisaldab ühesuunalist raske ahela replikatsiooni alguspunkti OriH (Yasukawa *et al.*, 2006), transkriptsiooni promootorjärjestusi (Chang ja Clayton, 1984) ning regulatoorseid alasid (Holt ja Reyes, 2012). Kerge ahela replikatsiooni alguspunkt OriL paikneb väljaspool NCR-i (Tapper ja Clayton, 1981).

NCR piirkonnas esineb kolmeahelaline ala, mida nimetatakse D-linguks (ingl *D-loop, displacement loop*) (Kasamatsu *et al.*, 1971). See moodustub, kui raske ahela süntees lõpeb enneaegselt ning tekib lühike, 650 aluspaari pikkune kolmas ahel ehk 7S DNA, mis hübridiseerub kerge ahelaga ja moodustabki lingu. D-lingu funktsioon ei ole teada.



Joonis 1. Inimese mitokondriaalse genoomi kaart. Joonisel on eraldi välja toodud kerge ahel (*L-strand*), raske ahel (*H-strand*) ning NCR (*non-coding region*). Inimese mtDNA-s on 37 geeni: 22 tRNA-d (tähistatud vastavate aminohapete ühetäheliste lühenditega), 2 rRNA-d (12S rRNA ja 16S rRNA) ja 13 valku (tsütokroom b, *cytb*; NADH dehüdrogenaasi subühikud, *ND1-4*, *ND4L*, *ND5-6*; tsütokroom c oksüdaasi subühikud, *COXI-III*; ATP süntaasi subühikud, *ATPase6*, *ATPase8*). (Spelbrink, 2010).

1.2.1 MtDNA metabolism

Mitokondriaalse hingamisahela normaalse funktsioneerimise jaoks on oluline korrektne mtDNA replikatsioon. See toimub kogu rakutsükli vältel, kuid kõige aktiivsem on see S-faasis (Sasaki *et al.*, 2017). On teada, et *in vitro* koosneb mtDNA replikatsiooniks vajalik minimaalne replisoom DNA polümeraasist γ , mitokondriaalsest DNA helikaasist Twinkle ja mtSSB-st ning täispika mtDNA genoomi sünteesiks on vajalikud kõik 3 komponenti (Korhonen *et al.*, 2004). Replikatsiooni algatamiseks on oluline Twinkle seondumine DNA-ga, see kutsub esile ka mtSSB seondumise (Rajala *et al.*, 2014). Twinkle on 5'-3' DNA helikaas ning selle aktiivsust stimuleerib mtSSB (Korhonen *et al.*, 2003).

In vivo osalevad replikatsioonis ka teised valgud. Replikatsiooni algatamiseks nii raske kui kerge ahela puhul on vajalik RNA praimer, mida sünteesib RNA polümeraas POLRMT (Chang ja Clayton, 1985; Wanrooij *et al.*, 2008; Fusté *et al.*, 2010). Praimereid eemaldav ensüüm RNase H1 (Ruhanen *et al.*, 2011) on replikatsiooniks absoluutselt vajalik

(Cerritelli *et al.*, 2003). Samuti on välja pakutud RNA praimerite eemaldamine nukleaaside Dna2 ja FEN1 poolt (Zheng *et al.*, 2008). DNA ligaas III parandab DNA katkeid, mis tekivad mahajäävas ahelas peale Okazaki fragmentide eemaldamist (Ruhanen *et al.*, 2011). Topoisomeraasid on vajalikud DNA superspiralisatsiooni vähendamiseks (Zhang *et al.*, 2014).

Imetajate puhul ei ole täpselt teada, millise mehhanismi järgi mtDNA replitseerub, ning replikatsiooni mehhanism on tõenäoliselt koespetsiifiline inimese (Pohjoismäki *et al.*, 2009) ja hiire puhul (Herbers *et al.*, 2018). Kirjeldamaks mtDNA replikatsiooni on välja pakutud mitu mudelit. Erinevates uuringutes mitme erineva rakuliini puhul on leitud replikatsiooni vaheühendeid, mis on iseloomulikud ühesuunalisele asümmeetrilisele replikatsioonile ahela väljatõrjumisega (ingl *SDM, strand-displacement model*) (Berk ja Clayton, 1974 ja Brown *et al.*, 2005), aga ka selliseid, mis viitavad kahesuunalisele sümmeetrilisele DNA sünteesile (Holt *et al.*, 2000 ja Bowmaker *et al.*, 2003). Lisaks on kirjeldatud ribonukleotiidide hübridiseerimist replikatsiooni käigus tekkiva üheaheelalise DNA-ga (ssDNA), mis kujutab endast veel ühte võimalikku replikatsiooni mehhanismi mitokondrites (Yasukawa *et al.*, 2006). Siiaamaani pole selge, milline nendest mudelistest kirjeldab paremini tegelikku mehhanismi ja mitu erinevat mehhanismi esineb mitokondrites.

Transkriptsioonis osalevad RNA polümeraas POLRMT ning transkriptsioonifaktorid TFAM (mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A, ingl *mitochondrial transcription factor A*) ja TFB2M (mitokondriaalne transkriptsioonifaktor B2, ingl *mitochondrial transcription factor B2*), mis on vajalikud transkriptsiooni initsiatsiooniks nii kerge kui raske ahela promooteri puhul (Posse *et al.*, 2014; Gaspari *et al.*, 2004; Litonin *et al.*, 2010). TFAM kuulub HMG valkude perekonda (Parisi ja Clayton, 1991) ja need valgud on võimelised siduma DNA-d ning muutma selle topoloogiat (Javaherian *et al.*, 1978). TFAM osaleb promooterjärjestuse äratundmises (Gaspari *et al.*, 2004) ja harutab selles piirkonnas DNA-d lahti (Shi *et al.*, 2012), soodustades transkriptsiooni toimumist. TFB2M on samuti vajalik promooteri lahtiharutamiseks (Sologub *et al.*, 2009). Kogu genoomilt sünteesitakse täispikka primaarset transkripti, mis ei sisalda introneid ning hiljem seda lõigatakse, et saada küpset mRNA-d, rRNA-d ja tRNA-d (Ojala *et al.*, 1981).

Kuigi pikalt arvati, et imetajate mitokondrites reparatsiooni ei toimu, on nüüd teada, et on olemas mitmed mtDNA reparatsiooni süsteemid. Seda tõestavad nii konkreetsed kirjeldatud

mehhanismid kui ka see, et mitokondritesse lokaliseeruvad mitmed reparatsiooni ensüümid (Liu *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Duxin *et al.*, 2009). Reparatsiooni rajad on vajalikud eelkõige selleks, et parandada reaktiivsete hapniku radikaalide poolt põhjustatud kahjustusi. Selliste kahjustuste puhul on oluliseks mehhanismiks aluse väljalõike reparatsioon ehk BER (ingl *base excision repair*), mis on kirjeldatud ka mtDNA puhul ning mille abil on võimalik parandada nii ühte (Stierum *et al.*, 1999) kui mitut nukleotiidi korraga (Liu *et al.*, 2008 ja Zheng *et al.*, 2008). Samuti toimub mitokondrites valepaardumise reparatsioon (ingl *mismatch repair*) (Mason *et al.*, 2003 ja de Souza-Pinto *et al.*, 2009). Nukleotiidi väljalõike reparatsiooni ehk NER-i pole mitokondrites siamaani kirjeldatud.

1.3 Mitokondriaalsed nukleoidid

Mitokondriaalne DNA esineb kompleksis valkudega ning neid komplekse nimetatakse nukleoidideks (Spelbrink, 2010). Sellised kompleksid on leitud lisaks imetajatele mitmetes teistes organismides ning kõige paremini on need kirjeldatud pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* (Spelbrink, 2010). Loomadest olid mitokondriaalsed nukleoidid esmakordselt kirjeldatud kannuskonna *Xenopus laevis* ootsüütides (Barat *et al.*, 1985).

Imetajate puhul on DAPI-ga värvimisel näidatud, et mtDNA ei ole jaotatud mitokondrite sees ühtlaselt, vaid moodustab diskreetseid üksusi (Satoh ja Kuroiwa, 1991) ning see oli kinnitatud kasutades ka immunotsütokeemilisi meetodeid (Iborra *et al.*, 2004 ja Legros *et al.*, 2004). Hiljem oli näidatud ka see, et mtDNA üksustega kolokaliseeruvad mitmed valgud. Esimesena oli nukleoidi valguna kirjeldatud mitokondriaalne DNA helikaas Twinkle (Spelbrink *et al.*, 2001), kusjuures see on tõenäoliselt üks valkudest, mille kaudu on nukleoidid seotud mitokondri sisemembraaniga (Rajala *et al.*, 2014), kuid mitte ainus. Nukleoidide põhiline komponent on TFAM, mis peaaegu alati kolokaliseerub mtDNA-ga (Garrido *et al.*, 2003) ning vabas vormis seda leidub vaid vähesel määral (Alam *et al.*, 2003). TFAM on lisaks promooterite äratundmisele võimeline siduma DNA-d ka mittespetsiifiliselt (Fisher ja Clayton, 1988). *In vitro* on see valk võimeline ilma lisavalkudeta kogu mtDNA ära pakkima (Kukat *et al.*, 2015). TFAM esineb mitokondrites homodimeerina ning painutab DNA-d, moodustades lingudega struktuure ja sidudes omavahel DNA ahelate erinevaid piirkondi (Kaufman *et al.*, 2007). TFAM on üks arvukamaid nukleoidi valke, näiteks inimese fibroblastide puhul esineb ~1000 TFAM molekuli ühe mtDNA molekuli kohta

(Kukat *et al.*, 2011). Samuti esinevad nukleoidide koosis mitmed replikatsiooniks vajalikud valgud, nagu näiteks mtSSB ja polümeraas γ (Garrido *et al.*, 2003).

Lisaks valkudele, mis on otseselt vajalikud mtDNA metabolismiks, on nukleoidide väljapuhastamisel leitud ka teiste funktsioonidega valgud, nagu näiteks tsütoskeleti valgud aktiin ja vimentiin (Wang ja Bogenhagen, 2006). On välja pakutud mudel, mille järgi nukleoidi südamikus paiknevad mtDNA-ga otseselt interakteeruvad valgud, mida on leitud ka rist-seotud nukleoidide koosis, ning perifeeriaase jäävad muud valgud, mis ei ole mtDNA-ga otseses kontaktis (Bogenhagen *et al.*, 2008).

Erinevaid meetodikaid kasutades on leitud, et imetajate puhul on nukleoidi läbimõõt keskmiselt ~70 nm (Iborra *et al.*, 2004 ja Kukat *et al.*, 2011). Kui arvestada mitokondriaalse genoomi suurust tähendab see, et mtDNA on pakitud väga kompaktselt, võrreldes näiteks tuuma DNA-ga (Bogenhagen, 2012).

1.3.1 Nukleoidi moodustavad valgud ja mtNAP-id

Mitokondriaalse nukleoidi täpset valgulist koostist on raske defineerida ning siiani puuduvad selged kriteeriumid otsustamiseks, kas valku saab pidada nukleoidi valguks või mitte. Selle peamine põhjus seisneb selles, et mitmed mtDNA metabolismi jaoks olulised valgud ei ole nukleoididega pidevalt seotud või on seotud vaid teatud osaga neist. Lisaks sellele nukleoidide väljapuhastamisel ja valgulise koostise uurimisel on sõltuvalt katsetingimustest võimalik teatud varieeruvus tulemustes, kuna mõned valgud ei pruugi jääda DNA-ga seotuks kõrge soola kontsentratsiooni või tugeva detergendiga töötamise puhul (Garrido *et al.*, 2003). Kasutusel on ka laiem mõiste mtNAP (ingl *mitochondrial nucleoid associated protein*), mis koondab enda alla kõiki nukleoididega interakteeruvaid valke, mis võivad olla nii otseselt mtDNA metabolismiga seotud kui omada ka teisi metaboolseid funktsioone (Hensen *et al.*, 2014). Samas ka mtNAP-ide iseloomustamisel ja isoleerimisel erinevate katsete tulemused varieeruvad, eelkõige erinevate meetodikate puhul, aga ka katsetingimustest ja rakuliinidest sõltuvalt (Hensen *et al.*, 2014). Täiendavaid raskusi valmistab see, et teatud valgud esinevad rakkudes vähesel määral. Seega ka mtNAP-ide täielikku nimekirja on raske koostada.

1.3.2 Nukleoidide alampopulatsioonid

Asjaolu, et nii polümeraas γ kui helikaas Twinkle on seotud vaid osade nukleoididega (Garrido *et al.*, 2003 ja Rajala *et al.*, 2014) viitab sellele, et teatud valkude seondumine võib olla dünaamiline ja toimuda siis, kui on vaja algatada mõnda protsessi, näiteks replikatsiooni. Samuti on teada, et replikatsiooni ei läbi samaaegselt kõik nukleoidid (Legros *et al.*, 2004). Sellest lähtuvalt on ilmselt olemas erineva valgulise koostisega nukleoidide klassid. Hiljem on leitud, et neid saab omavahel eraldada ning praeguseks on teada, et on võimalik eristada vähemalt kahte nukleoidide populatsiooni. Esimene neist on mitokondri sisemembraaniga tugevamalt seotud ning nende nukleoidide koosseisus on sellised valgud nagu Twinkle, polümeraas γ ja mtSSB. Need nukleoidid tõenäoliselt replitseeruvad. Teise populatsiooni nukleoidid ei ole membraaniga sama tugevalt seotud ja sisaldavad vähemal määral replikatsiooni läbiviivaid valke, millest saab järeldada, et need nukleoidid ei replitseeru, vaid osalevad teistes protsessides (Rajala *et al.*, 2014).

Replitseeruvate, Twinkle sisaldavate nukleoidide eripära seisneb selles, et need on seotud kolesteroolirikka membraanse mikrodomääniga, ning selle kaudu ka ER-iga (Gerhold *et al.*, 2015). Selle mikrodomääni struktuuri moodustamises osaleb valk ATAD3, mis on üks nukleoidi perifeersetest valkudest, ehk *in vivo* see ei seonu mtDNA-ga otseselt (Bogenhagen *et al.*, 2008), kuid on teada, et ilma selle valguta mikrodomääni ja nukleoidi struktuur häiruvad, samuti muutub kristade morfoloogia (Gerhold *et al.*, 2015).

1.3.3 MtDNA pärandumine ja segregatsioon

Imetajates, k.a inimeses, pärandub mtDNA emaliini pidi (Hutchison *et al.*, 1974 ja Giles *et al.*, 1980). Spermi mitokondreid lagundatakse peale viljastumist ootsüüdis proteolüütiliselt, kuna neid märgistatakse ubikvitiiniga sisemembraani valgu prohibitiini kaudu (Sutovsky *et al.*, 1999 ja Thompson *et al.*, 2003). Arvatakse, et selline pärandumisviis takistab kahjulike mtDNA mutatsioonide levikut organismides (Wallace, 2007). Tõenäoliselt samal põhjusel toimub ootsüütide arengu käigus nn mitokondriaalne pudelikael. Selle protsessi käigus väheneb mtDNA koopiaarv ning edasi pärandub vaid teatud väike hulk mtDNA genome.

Homoplasmiaks nimetatakse olukorda, kui raku või organismi tasemel esineb vaid ühte tüüpi mtDNA. Heteroplasmia puhul esineb rakus või organismis mitu erinevat mtDNA varianti, kas

mitme erineva haplotüübi pärandumise või somaatiliste mutatsioonide tõttu. Mitokondriaalse pudelikaela efekti tõttu heteroplasmia puhul päranduvad mutatsioonid teatud tõenäosusega, mis sõltub heteroplasmia tasemest emal ning konkreetsest mutatsioonist (Chinnery *et al.*, 1998). Heteroplasmia tase võib olla erinev ning enamasti mutatsioonid ei avaldu enne, kui muteeritud mtDNA genoomide protsent on piisavalt kõrge (Hayashi *et al.*, 1991).

1.3.4 MtDNA koopiaarv ja selle regulatsioon

Ühes rakus võib olenevalt koetüübist olla ~500-10000 mtDNA koopiat (Bogenhagen, 2012 ja Herbers *et al.*, 2018). Koopiaarv nukleoidi kohta sõltub samuti konkreetsest koest (Bogenhagen, 2012). Varasemalt oli näidatud, et ühes nukleoidis sisaldub 6-10 mtDNA genoomi koopiat (Iborra *et al.*, 2004), kuid uuemate super-resolutsioon mikroskoopia (ingl *super-resolution microscopy*) andmete järgi on tegelikult ühes nukleoidis vaid 1-2 mtDNA koopiat (Kukat *et al.*, 2011). Erinevus saadud tulemustes on tõenäoliselt seotud sellega, et varasemad andmed olid saadud kasutades konfokaalmikroskoopiat, mille puhul on lahutusvõime oluliselt väiksem ja seetõttu lähestikku paiknevaid nukleoide ei olnud võimalik eristada (Kukat *et al.*, 2011).

Koopiaarvu mõjutavad mitmed mitokondriaalsed valgud ning eriti olulist rolli mängivad mtNAP-id. Üks põhilisemaid valke, mille ekspressiooni tase on otseselt seotud mtDNA tasemega rakus, on Twinkle. Selle valgu üleekspressioonil mtDNA koopiaarv tõuseb märkimisväärselt ning ekspressiooni alla surumisel mtDNA tase langeb ligikaudu 50% võrra (Tyynismaa *et al.*, 2004). TFAM kui põhiline nukleoidi komponent ning transkriptsiooni aktivaator samuti reguleerib mtDNA koopiaarvu. TFAM tase otseselt mõjutab mtDNA taset: selle valgu ekspressiooni mahasurumisel mtDNA koopiaarv langeb (Ekstrand *et al.*, 2004) ning TFAM üleekspressiooni puhul mtDNA koopiaarv raku kohta kasvab 2,5 korda, samas nukleoidide morfoloogia ei muutu (Kukat *et al.*, 2015). ATAD3 ekspressiooni vaigistamisel langeb mtDNA koopiaarv raku kohta ning esineb vähem mtDNA multimeere (He *et al.*, 2007). Seega ATAD3 on tõenäoliselt üks valkudest, mille kaudu on omavahel ühendatud mtDNA molekulid ning selle kaudu võib olla reguleeritud nukleoidide moodustumine.

MtDNA koopiaarv nukleoidi kohta võib osutada oluliseks parameetrik mutatsioonide kontekstis. Somaatilisi mutatsioone saab komplementeerida metsik-genotüüpidega või

parandada rekombinatsiooni abil, ning nende protsesside toimumist võib mõjutada ühes kompleksis esinevate mtDNA molekulide arv. Lisaks siamaani pole selge, kuidas täpsemalt toimub mutantsete genotüüpide pärandumine, kuid on alust arvata, et see võib olla seotud sellega, kuidas mtDNA on organiseeritud kompleksidesse ning mitu mtDNA molekuli on tegelikult ühes päritavas ühikus (Bogenhagen, 2012).

1.4 MAM-struktuurid

Mitokondrid moodustavad kontakte ER-iga konkreetsetes piirkondades, mida nimetatakse MAM-ideks (ingl *mitochondria-associated ER-membranes*). Need kujutavad endast kindla valgulise ja lipiidse koostisega membraanide piirkondi, mis on vajalikud ühenduse loomiseks organelide vahel. MAM-idele on iseloomulik kõrge kolesterooli tase võrreldes teiste ER-i piirkondade või mitokondri membraaniga (Area-Gomez *et al.*, 2012). Seega MAM-id kujutavad endast lipiidseid mikrodomääne ning arvatakse, et kolesterooli kaudu on reguleeritud nende ühenduste loomine (Fujimoto *et al.*, 2012). Kõrge kolesterooli sisaldusega on ka mitokondrite sisemembraani mikrodomäänid, kuhu on kinnitunud replitseeruvad nukleoidid (Gerhold *et al.*, 2015), seega MAM-struktuurid on seotud ka mtDNA-ga.

MAM-idel on mitu raku jaoks olulist funktsiooni. Nende ühenduste kaudu toimub Ca^{2+} transport ER-ist mitokondrisse (Rizzuto *et al.*, 1998 ja Szabadkai *et al.*, 2006) ja selle transpordi regulatsioon (Csordás *et al.*, 2006). Tõenäoliselt MAM-id mängivad olulist rolli ka lipiidide metabolismis. MAM-ides paiknevad mitmed fosfolipiidide biosünteesiga seotud ensüümid, näiteks fosfatidüülseriini süntaas (Vance, 1990 ja Rusiñol *et al.*, 1994), mis tähendab, et need piirkonnad võivad olla otseselt seotud nende lipiidide sünteesiga. Sama kehtib ka kolesterooli puhul: MAM-ides on olemas kolesterooli sünteesi ensüümid ning need alad on väga kolesteroolirikad (Area-Gomez *et al.*, 2012). Samuti on välja pakutud ainete transpordiga seotud funktsioon. On võimalik, et MAM-struktuurid on sekretoorsete radade oluline osa (Rusiñol *et al.*, 1994). MAM-id osalevad ka fosfolipiidide transpordis ER-i ja mitokondrite vahel (Shiao *et al.*, 1995).

ER-i ja mitokondrite kontaktid võivad koosneda erinevatest valkude kompleksidest. Üks ühenduste tüüp on moodustatud mitofusiinide abil. Nende puhul mängib olulist rolli ER-is paiknev Mfn2. On näidatud, et see ühendab ER-i mitokondriga, moodustades komplekse mitokondriaalse Mfn1 või Mfn2-ga (de Brito ja Scorrano, 2008). Samas uuemate andmete

järgi Mfn2 tegelikult reguleerib ER-i ja mitokondrite vahelisi kontakte alla (Filadi *et al.*, 2015). Hetkel ei ole põhjalikku seletust nendele vastuolulistele tulemustele. Samuti on leitud selline ühenduste tüüp, mis koosneb mitokondri välismembraani valgu VDAC1 (ingl *voltage dependent anion-selective channel 1*), grp75 (ingl *glucose regulated protein 75*) ja ER-is paikneva inositol-1,4,5-trifosfaadi retseptori (IP₃R) kompleksist (Szabadkai *et al.*, 2006). Seda tüüpi ühendused osalevad Ca²⁺ transpordis mitokondrisse (Szabadkai *et al.*, 2006).

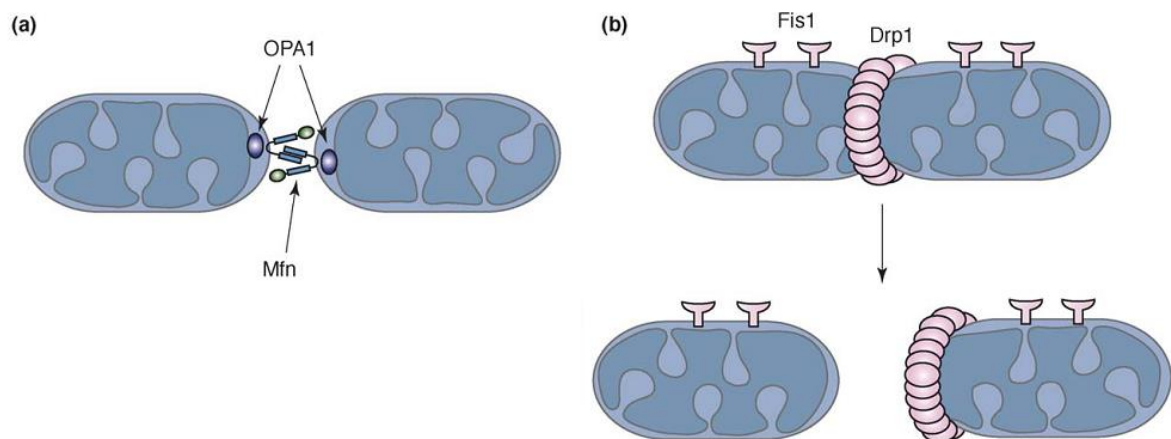
MAM-struktuuride olemasolu ning korrektne funktsioneerimine on oluline mitokondrite normaalse funktsioneerimise ja dünaamika säilitamiseks ning erinevate rakus toimuvate protsesside regulatsiooniks. ER-i struktuur mõjutab näiteks mtDNA replikatsiooni ja segregatsiooni mitokondrite vahel (Lewis *et al.*, 2016). Samuti osaleb ER mitokondrite jagunemises ja seega mõjutab mitokondriaalse võrgustiku morfoloogiat (Friedman *et al.*, 2011). Mutatsioonid valkudes, mis on MAM-ide jaoks iseloomulikud, põhjustavad muutusi raku metabolismis. Näiteks preseniliinide 1 ja 2 mutatsioonide puhul suureneb ER-i ja mitokondrite kontaktide ulatus ning lipiidide biosünteesi aktiivsus (Area-Gomez *et al.*, 2012). Samas on näidatud, et Mfn2 ekspressiooni allasurumine vastupidi vähendab lipiidide biosünteesi, mis tähendab, et need MAM-ide komponendid osalevad antud biosünteesi raja regulatsioonis (Area-Gomez *et al.*, 2012). ER ja mitokondrite vaheline kaugus mõjutab Ca²⁺ sissevoolu mitokondrisse, mis samuti võib kujutada endast olulist reguloorset mehhanismi (Csordás *et al.*, 2006).

1.5 Mitokondrite ja mtDNA dünaamika

Rakus moodustavad mitokondrid tubulaarse ehitusega dünaamilise võrgustiku (Rizzuto *et al.*, 1998). Mitokondrid saavad liikuda mööda mikrotuubuleid ja pidevalt muudavad oma kuju. Samuti on need võimelised jagunema ja kokku sulama. Nendes protsessides osalevad spetsiifilised valgud (Joonis 2). Mitokondrite jagunemises osalevad eelkõige Drp1 (ingl *dynammin-related protein 1*) (Smirnova *et al.*, 2001) ja Mff (ingl *mitochondrial fission factor*) (Gandre-Babbe ja van der Bliik, 2008). Jagunemiseks on vajalik Drp1 GTPaasne aktiivsus (Chang ja Blackstone, 2007). Teine oluline valk on välismembraanis paiknev Fis1 (James *et al.*, 2003). Jagunemiseks on vajalikud ka kontaktid ER-iga ning mitokondrite jagunemised toimuvad just nendes piirkondades (Friedman *et al.*, 2011 ja Lewis *et al.*, 2016). Nii Drp1 kui Mff lokaliseeruvad ER-kontaktide piirkondadesse

(Friedman *et al.*, 2011). Ei ole täpselt teada, kuidas ER osaleb mitokondrite jagunemises, kuid ühe mudeli järgi ER tuubulid keerduvad mitokondri ümber, põhjustades selle konstriktsiooni ja seejärel jagunemist (Friedman *et al.*, 2011).

Mitokondrite kokkusulamiseks peab toimuma nii sise- kui välismembraanide liitumine. Välismembraanide kokkusulamisel on olulised välismembraanis paiknevad mitofusiinid Mfn1 ja Mfn2 (Santel *et al.*, 2003; Eura *et al.*, 2003; Koshiba *et al.*, 2004). Kahe mitokondri kokkusulamiseks on vajalik, et mõlema membraanis oleksid mitofusiinid ning et nende vahel moodustuksid homo- või heterotüüpsed kompleksid (Koshiba *et al.*, 2004), kusjuures Mfn1 homodimeeride puhul on komplekside moodustumine kõige efektiivsem ja Mfn2 homodimeeride puhul kõige vähem efektiivne (Ishihara *et al.*, 2004), kuigi mõlemad homoloogid on antud protsessi toimumiseks vajalikud. Siiski fenotüübid, mida põhjustavad konkreetse homoloogi *knockout* (KO) või üleekspressioon on omavahel eristatavad (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Eura *et al.*, 2003), mis tähendab, et nendel valkudel on mõnevõrra erinevad funktsioonid. Võimalik, et need osalevad erinevates kokkusulamise etappides. Organellide kokkusulamise toimumiseks on vajalik GTP hüdrolüüs ning Mfn1 omab suuremat GTPaasset aktiivsust kui Mfn2 (Ishihara *et al.*, 2004). Sisemembraani GTPaas OPA1 vastutab sisemembraanide liitumise eest (Song *et al.*, 2009).



Joonis 2. Mitokondrite liitumises ja jagunemises osalevad valgud. (a) Mitokondrite liitumine. Välismembraanide kokkusulamiseks on vajalikud mitofusiinid ning sisemembraanide kokkusulamiseks OPA1. (b) Mitokondrite jagunemine. Kõige olulisemad valgud, mis osalevad selles protsessis, on Drp1 ja Fis1. Mfn – mitofusiin, OPA1 – optiline atroofia 1, Drp1 - dünamiinseotud valk 1, Fis1 - mitokondriaalne fissiooni valk 1. (Modifitseeritud Chen ja Chan, 2006 järgi)

Antud protsesside korrektne regulatsioon ning nendevaheline tasakaal on oluline mitokondrite omavahelise interaktsiooni toimumiseks ja normaalse funktsiooni säilitamiseks. Drp1 on oluline neuronite arengus ning hiirte puhul on selle KO embrüole letaalne (Ishihara *et al.*, 2009). OPA1 ekspressiooni allasurumine põhjustab mitokondrite fragmenteerumist ja respiratsiooni häireid (Chen *et al.*, 2005). Sarnaselt Mfn1 ja 2 puudumisel häirub samuti mitokondrite funktsioneerimine (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007; Sebastián *et al.*, 2012). Efektid avalduvad ka siis, kui puudub üks homoloogidest, kuid need valgud saavad teineteist osaliselt komplementeerida (Chen *et al.*, 2003 ja Chen *et al.*, 2007). Hiirte puhul on näidatud, et mitofusiinide KO põhjustab surma embrüo staadiumil (Chen *et al.*, 2003 ja Chen *et al.*, 2007). Lisaks on mitokondrite liitumine oluline väikeaju Purkinje rakkudes, kuna selle häirumisel Mfn2 KO tõttu hiirtel esinevad tugevad neuroloogilised häired, ebanormaalne mitokondrite morfoloogia ning respiratoorse funktsiooni kaotamine (Chen *et al.*, 2003 ja Chen *et al.*, 2007). Sarnane efekt esineb ka hiirte skeletilihastes (Chen *et al.*, 2010).

Mitokondriaalsed nukleoidid pole samuti staatilised, need on võimelised liikuma nii mitokondri sees kui ühest mitokondrist teisse (Legros *et al.*, 2004 ja Sasaki *et al.*, 2017). On näidatud, et Drp1 tihti paikneb nii ER-kontaktide (Friedman *et al.*, 2011) kui nukleoidide läheduses ning seega nendes piirkondades toimub mitokondrite jagunemine (Garrido *et al.*, 2003 ja Iborra *et al.*, 2004). Mitokondrite tippudes paiknevad just replitseeruvad nukleoidid, millest saab järeldada, et mitokondrite jagunemine ja mtDNA replikatsioon on ajaliselt ja ruumiliselt koordineeritud (Lewis *et al.*, 2016).

Kuna mtDNA ja mitokondrite dünaamika on tihedalt seotud, on alust arvata, et ebakorrektnel mitokondrite jagunemine või liitumine võib mõjutada ka mtDNA stabiilsust ja segregatsiooni mitokondrite vahel. Hiirte puhul on näidatud, et mitokondrite kokkusulamise täielikul puudumisel esineb rohkesti mtDNA-d mittesisaldavaid mitokondreid (Chen *et al.*, 2007), mtDNA mutatsioonide taseme suurenemine ning mtDNA koopiaarvu langus (Chen *et al.*, 2010). Inimese puhul seos mitokondrite dünaamika ja mtDNA vahel vajab veel täiendavat põhjalikku uurimist.

1.6 Mitokondriaalsed haigused

Mitokondrite funktsioonide ja metabolismi uurimine on oluline muuhulgas sellepärast, et paljudel haigustel on olemas seos mitokondrite normaalse funktsiooni häirumisega. On olemas haigused, mis on põhjustatud mtDNA taseme langusest, mutatsioonidest mtDNA-s endas või selle metabolismiks olulistest ensüümides. Teatud mutatsioonid Twinkle kodeerivas geenis põhjustavad hulgaliselt mtDNA deletsioone ning selle tulemusena kujuneb välja progresseeruv eksternaalne oftalmopleegia (PEO) (Zeviani *et al.*, 1990), mille puhul esineb silmi liigutavate lihaste halvatus (Spelbrink *et al.*, 2001). Selliseid haigusi, nagu MELAS (ingl *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*) ja MERRF (ingl *myoclonic epilepsy with ragged red fibers*) põhjustavad spetsiifilised punktmutatsioonid tRNA geenides (Morales *et al.*, 1992 ja Shoffner *et al.*, 1990), mille tulemusena häirub valgusüntees mitokondris. See omakorda viib oksüdatiivse fosforüülimise defektideni.

Ka teiste mitokondriaalsete valkude mutatsioonid on seotud haiguslike seisunditega. Charcot-Marie-Tooth tüüp 2A (CMT2A) haiguse puhul on muteerunud Mfn2 (Züchner *et al.*, 2004 ja Verhoeven *et al.*, 2006) ja see põhjustab probleeme mitokondrite transpordiga mööda aksoneid ning mitokondrite agregeerumist (Baloh *et al.*, 2007 ja Misko *et al.*, 2010). Selle tulemuseks on aksonite degeneratsioon (Verhoeven *et al.*, 2006 ja Misko *et al.*, 2012). Lisaks on CMT2A patsientidel näidatud mtDNA koopiaarvu vähenemist ja sagedaseid deletsioone (Vielhaber *et al.*, 2013). Hiire mudelis on samuti näidatud Mfn2 oluline roll väikeaju normaalses arengus ning Purkinje rakkude funktsioneerimises (Chen *et al.*, 2007). OPA1 geeni mutatsioonid põhjustavad dominantset optilist atroofiat (Delettre *et al.*, 2000). Sellele on iseloomulikud nägemis- ja kuulmishäired, väline oftalmopleegia ning müopaatia, mida põhjustavad mtDNA deletsioonid (Hudson *et al.*, 2008).

Samuti on leitud, et mitokondrite funktsioneerimine on häirunud mitmete neurodegeneratiivsete haiguste puhul, nagu näiteks Alzheimeri tõbi, ALS ja Parkinsoni tõbi. Alzheimeri tõve puhul on olemas seos MAM-struktuuridega: Alzheimeri patsientidel on rohkem ulatuslikke kontakte ER-i ja mitokondrite vahel ning lipiidide biosüntees on aktiivsem (Area-Gomez *et al.*, 2012). Ka Parkinsoni tõve puhul muutub MAM-ide struktuur ja funktsioneerimine (Gautier *et al.*, 2016). Kuigi nendele haigustele on iseloomulikud teatud mitokondriaalsed defektid, ei ole teada, kas need defektid soodustavad haiguse arengut või on pigem selle tagajärjed.

Mitokondriaalsete haiguste vastu puudub efektiivne ravi ning kõik olemasolevad meetmed on suunatud sümptomite leevendamisele. Selle põhjuseks on nende haiguste heterogeensus, mõningate haiguste puhul koespetsiifilisus ning meie puudulikud teadmised normaalse mitokondriaalse metabolismi regulatsioonist. Seetõttu on oluline uurida molekulaarbioloogilisi mehhanisme, mis tagavad mitokondrite normaalset funktsioneerimist ning mtDNA korrektset replikatsiooni ja reparatsiooni.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Mitokondriaalsed nukleoidid, MAM-struktuurid ja mitokondrite dünaamika on omavahel tihedalt seotud. Replitseeruvad nukleoidid paiknevad ruumiliselt ER-kontaktide (Gerhold *et al.*, 2015) ning ka mitokondrite jagunemiskohtade läheduses (Lewis *et al.*, 2016). Seega tõenäoliselt MAM-struktuurid mängivad rolli nii mitokondrite dünaamika kui mtDNA replikatsiooni regulatsioonis. Samuti on näidatud, et mitokondrite dünaamika on oluline mtDNA stabiilsuse tagamiseks (Chen *et al.*, 2007 ja Chen *et al.*, 2010).

Mfn2 on valk, mis osaleb nii mitokondrite kokkusulamisest kui ER-iga ühenduste moodustamises. See on absoluutselt vajalik mitokondrite välismembraanide liitumiseks (Santel *et al.*, 2003; Eura *et al.*, 2003; Koshihara *et al.*, 2004) ning mõjutab ka MAM-struktuure (de Brito ja Scorrano, 2008), kuid selle roll mitokondriaalse võrgustiku ja seejuures mtDNA säilitamisel ei ole päris selge. Kuna on näidatud, et Mfn2 mutatsioonid põhjustavad ka mtDNA taseme langust ning deletsioone (Vielhaber *et al.*, 2012), on võimalik, et Mfn2 mõjutab ka mtDNA metabolismi ja nukleoidi stabiilsust, selle organisatsiooni ja valgulist kooslust.

Antud töö eesmärkideks oli uurida Mfn2 funktsiooni häirumise mõju nukleoidi valgulisele kooslusele, mtDNA koopiaarvule ja ühtlasi ka MAM-struktuuridele. Varasemalt on uuritud Mfn2 48h *knockdown*'i tingimustes ER-mitokondri kontaktide terviklikkust ning regulatsiooni (Filadi *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2016), ent mitte mõju nukleoididele. Seega antud töös oli uuritud, kuidas vastusena Mfn2 *knockdown*-ile (48h ja lisaks 72h) muutub nukleoidi valkude ja MAM-struktuuridele iseloomulike valkude ekspressioon ning kas ja kuidas see mõjutab mtDNA koopiaarvu. Koopiaarvu analüüsi kontrollimiseks oli teostatud helikaas Twinkle *knockdown*, mille puhul teadaolevalt koopiaarv väheneb ~50% võrra (Tyynismaa *et al.*, 2004).

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Rakuliin ja sööde

Katseteks kasutati inimese embrüonaalsete neerurakkude liini 293e (HEK293e). Need rakud ekspresseerivad neuronitele iseloomulikke markereid ning seega on sarnased närvikoele

(Shaw *et al.*, 2002). Rakkude kasvatamiseks kasutati DMEM söödet L-glutamiini ja kõrge glükoosisaldusega, kuhu oli lisatud FBS lõppkontsentratsiooniga 10%. Rakke kasvatati 10 cm läbimõõduga Petri tassidel 37°C ja 5% CO₂ juures.

2.2.2 RNA interferents

Twinkle või Mfn2 ekspressiooni vaigistamiseks kasutati siRNA vahendatud interferentsi. Kasutati Dharmacon transfektsiooni süsteemi ning tootjapoolset protokollit. Päev enne transfekkeerimist olid rakud külvatud sobiva lahjendusega. 24 tundi peale transfekkeerimist sööde aspireeriti tassilt ning vahetati värske vastu. Rakkude analüüsid teostati kas 48 või 72 tunni möödudes.

2.2.3 Totaalse DNA eraldamine ja qPCR analüüs

48 või 72 tunni möödudes rakud suspendeeriti söötmes, pipeteeriti rakuksuspensioon 50 ml tuubidesse ning fuugiti põhja 5 minutit 300 g juures. Sööde eemaldati ning rakud resuspendeeriti 1x PBS-is. Seejärel võeti välja 200 µl rakkude suspensiooni, tõsteti 1,5 ml tuubi ning fuugiti uuesti põhja 3 minutit 300 g juures. Supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti 300 µl lüüsipuhvril, kuhu lisati SDS (lõppkontsentratsioon 1%) ning RNase A (lõppkontsentratsioon 200 µg/ml). Seejärel proovid inkubeeriti 37°C juures 1 tund. Selle aja möödumisel lisati proovidele proteinaas K (lõppkontsentratsioon 500 µg/ml) ning inkubeeriti 37°C juures veel 1 tund. Seejärel proovid lahjendati, lisades 1 maht T₁₀E_{0,1} puhvrit. DNA eraldamiseks kasutati fenool-kloroformiga ekstraheerimist. Proovidele lisati 1 maht fenool-kloroformi, segati üle korgi kallutades ning lasti seista toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel proove tsentrifugeeriti 5 minutit 3000 g juures. Peale tsentrifugeerimist vesifaas pipeteeriti uude 1,5 ml tuubi. Seejärel DNA sadestamiseks lisati proovidele 2,5 mahtu 96% etanooli, segati ning jäeti sadenema üle öö -20°C juurde. Peale sadestamist proove tsentrifugeeriti 10 minutit 14 000 g juures. Supernatant eemaldati ning peale pipeteeriti 500 µl 80% etanooli DNA sademe pesemiseks. Proovid fuugiti 5 minutit 14 000 g juures. Supernatant eemaldati ning pellet resuspendeeriti 20 µl T₁₀E_{0,1} puhvril. DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks ja kvaliteedi hindamiseks kasutati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit.

qPCR-i kasutati mtDNA koopiaarvu suhtelise muutuse määramiseks. Sisemise referentsina kasutati koduhoidja geeni *APP* (ingl *amyloid precursor protein*) ning mtDNA markerina

tsütokroom b (*cytb*) geeni. Practionite järjestused on ära toodud Lisas 2. Kasutati HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) qPCRi segu (Solis Biodyne) ning reaktsioonisegu valmistati tootja protokoll järgi. Iga reaktsiooni jaoks võeti 25 ng DNA-d. 384 kannuga plaadile pipeteeriti 15 µl reaktsioonisegu ning 5 µl DNA-d, negatiivse kontrolli puhul 5 µl vett ning kaeti plaat kilega. Kasutati Applied Biosystems 7900 HT reaalaaja PCR-i masinat. PCR-i programm on ära toodud Lisas 3. Tulemuste analüüsimiseks kasutati $-\Delta\Delta C_t$ meetodit.

2.2.4 Mitokondrite eraldamine ja lüüsimine

Parallelselt DNA eraldamisega eraldati rakkudest mitokondrid. Selleks kasutati modifitseeritud Rajala *et al.*, 2014 protokoll. PBS-is suspendeeritud rakke tsentrifugeeriti 5 minutit 300 g juures, supernatant eemaldati, rakud suspendeeriti 0,1x homogeniseerimispuhvris ning jäeti paisuma jää peale 6 minutiks. Rakud purustati kasutades klaasist homogenisaatorit. Seejärel rakkudele lisati 10x homogeniseerimispuhvrit ning tsentrifugeeriti 5 minutit 1200 g juures, et sadestada purustatud rakkude komponente. Peale fuugimist supernatant tõsteti uude tuubi ning tsentrifugeeriti uuesti. Seejärel supernatant tõsteti uude tuubi ning tsentrifugeeriti 10 minutit 14 000 g juures, et saada kätte mitokondrite pellet. Supernatant eemaldati ning sadet suspendeeriti PBS-is.

Valgu kontsentratsiooni määramiseks kasutati Bradfordi meetodit (Thermo Fisher Scientific eeskirja järgi) ja Amersham Biosciences Ultrospec 10 spektrofotomeetrit. Saadud optilise tiheduse (OD_{600}) järgi määrati valgu kontsentratsioon, kasutades kaliibergraafikut. Võeti võrdses koguses valku lüüsimiseks ning pesuks PBS-iga. Mitokondrite lüüsimiseks kasutati digitoniini sellises kontsentratsioonis, et lüüsida ära mitokondri välismembraan ning et hakkaks lüüsima ka sisemembraan. See võimaldab eraldada teineteisest replitseeruvad, tugevamalt sisemembraaniga seotud nukleoidid ning mittereplitseeruvad nukleoidid (Rajala *et al.*, 2014). Sobiva digitoniin:valk suhte määramiseks viidi eelnevalt läbi titratsioonikatse. Lüüs teostati jääl 10 minutit, seejärel proove tsentrifugeeriti 10 minutit 14 000 g juures. Pellet ja supernatant eraldati, pellet resuspendeeriti PBS-is. Seejärel proovidele lisati SDS-i (lõppkontsentratsioon 1%) ning inkubeeriti 30 minutit toatemperatuuril. Peale seda igast proovist võeti välja alikvoodid DNA analüüsiks ning lahjendati neid 20 korda 2x SSC puhvriga. Ülejäänud proovile lisati 5x SDS laadimispuhvrit.

2.2.5 Western blotting

Valkude lahutamiseks kasutati SDS-PAGE geelelektroforeesi. Enne geelile kandmist proove keedeti 5 minutit 95°C juures. Geeli jooksutati Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell kambris. Foreesi teostati 1,5 tundi. Valkude edasiseks analüüsimiseks kasutati Western blot meetodit, mis kujutab endast valkude ülekannet geelilt membraankandjale. Blottimiseks kasutati märgülekannet nitrotselluloosmembraanile Bio-Rad Mini Trans-Blot® Cell süsteemis. Ülekannet teostati 100 V juures 1 tund. Peale ülekannet membraani inkubeeriti 20 minutit 5% lõssilahuses 1x TBST-s, vältimaks antikehade ebaspetsiifilist seondumist.

Valkude visualiseerimiseks esmalt inkubeeriti membraanid primaarsete antikehade lahuses BSA-s (veise seerumalbumiin, ingl *bovine serum albumin*) loksutil. Seejärel membraanid pesti 1x TBST lahusega 30 minutit ning peale pandi HRP-ga (mädarõika peroksidaas, ingl *horseradish peroxidase*) konjugeeritud sekundaarsete antikehade lahused 5% lõssis, mida hoiti peal 1 tund toatemperatuuril loksutil. Seejärel membraane pesti uuesti 1x TBST lahusega 30 minutit. Ilmutamiseks kasutati Bio-Rad Clarity™ Western ECL Substrate reagente. Luminooli ning peroksiidi lahused segati kokku suhtes 1:1, membraani inkubeeriti lahuses 5 minutit pimedas ning seejärel pildistati LI-COR masinaga (Odyssey® Fc Imaging System LI-COR Biosciences). Alternatiivina kasutati 1 membraani kohta 1 ml luminoolilahust ning 10 µl võimendajat, inkubeeriti 30 sekundit ning pildistati LI-COR masinaga.

2.2.6 Dot blot ja hübriidatsioon

Dot blot meetodit kasutati mtDNA jaotuvuse analüüsimiseks. Selleks DNA-d kanti üle nailonmembraanile. Ülekandeks kasutati Bio-Rad Bio-Dot® aparati. Enne ülekannet proovid keedeti 15 minutit 95°C juures, seejärel asetati 2-3 minutiks jääle. Aparati asetati 2 Whatman filterpaberit ning nende peale nailonmembraani. Membraan pesti 2x SSC-ga 2 korda, seejärel imeti puhvrit ära vaakumpumba abil ning kanti kannudesse DNA proovid. Proovid imeti ära vaakumpumbaga ja membraan pesti veel 2 korda. DNA immobiliseerimiseks membraani ristseoti UV-ga 24 sek 0,120 J/cm².

Hübriidatsiooniks vajalikku radioaktiivset märget sünteesiti *cytb* geeni matriitsi põhjal, lisades PCR-i segusse α-³²P-CTP. PCR-i programm ning reaktsioonisegu koostis on ära toodud Lisas 3. PCR-i produkt sadestati isopropanooliga, tehti vortex ning tsentrifuugiti 10 min 14 000 g juures. 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.

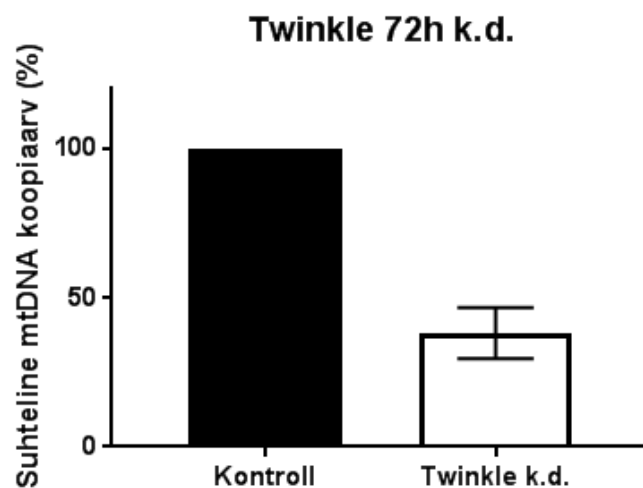
Hübridisatsiooniks asetati membraani DNA proovidega hübridisatsioonitorusse, lisati 50 ml Church puhvrit ning teostati eelhübridisatsiooni 15 minutit 65°C juures, et vähendada ebaspetsiifilist seondumist. Seejärel puhvrit vahetati ning lisati sisse radioaktiivne mäрге. Membraan hübridiseeriti vähemalt 3 tundi 65°C juures. Seejärel membraan pesti 50 ml Church wash puhvriga 10 minutit 2 korda. Seejärel membraanid kuivatati, asetati need kile vahele, tõsteti kassetti ning peale pandi fosforekraan. Fosforekraani eksponeeriti 12 h kuni 3 päeva. Peale eksponeerimist pildistati ekraani GE Healthcare Amersham Typhoon Phosporimager masinaga. Kvantifitseerimiseks kasutati ImageQuant tarkvara.

2.3 Tulemused

Antud katsetes analüüsiti Mfn2 vähenemise mõju mitokondriaalsete nukleoidide populatsioonidele ning MAM-struktuuridele, mtDNA jaotuvusele erinevate fraktsioonide vahel ning mtDNA koopiaarvule. Western blot meetodil analüüsiti PBS-iga pestud ning digitoniiniga lüüsitud mitokondrite puhul pellet ja supernatandi fraktsioone (vt pkt 2.2.4). Detekteeriti nukleoidi valke TFAM, Twinkle ja mtSSB ning MAM-struktuuridele iseloomulikke valke VDAC1, Mfn2 ja FAACL4, lisaks Mfn2 72-tunnise allasurumise puhul detekteeriti ka Mfn1. Sisemembraanis paikneva COXII ja maatriksi valgu HSP60 järgi hinnati mitokondrite lüüsumist. Dot blot meetodil analüüsiti mtDNA jaotuvust pellet ja supernatant fraktsioonide vahel, mis peegeldab replitseeruvate ja mittereplitseeruvate nukleoidide populatsioonide osakaalu. Kvantitatiivse PCR-iga hinnati mtDNA koopiaarvu muutust võrreldes kontrollidega.

2.3.1 Twinkle *knockdown*'i tulemusel langeb mtDNA koopiaarv märgatavalt

Twinkle on mitokondri sisemembraaniga seotud valk, mis on replitseeruvate nukleoidide komponent, seega selle valgu taseme vähenemine mõjutab ka mtDNA koopiaarvu. Käesolevas töös koopiaarvu analüüs teostati 72 tunni järgselt. Twinkle vähenemise tulemusena mtDNA koopiaarv langes keskmiselt 65% võrra (Joonis 3).

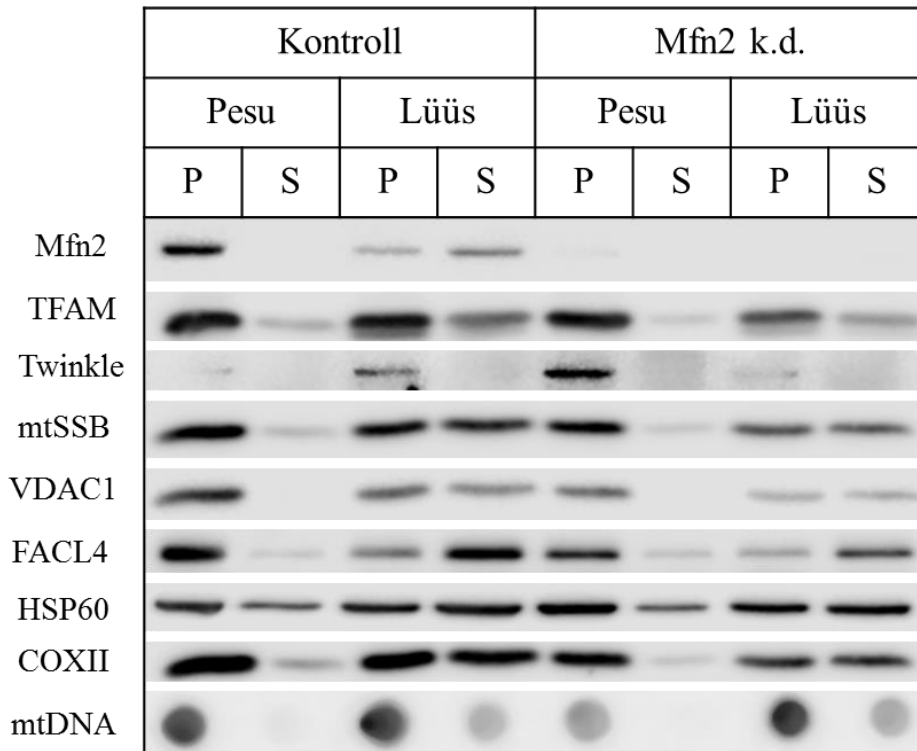


Joonis 3. Suhteline mtDNA koopiaarvu langus Twinkle *knockdown*'i puhul võrreldes kontrolliga. Graafikul on ära toodud standardviga.

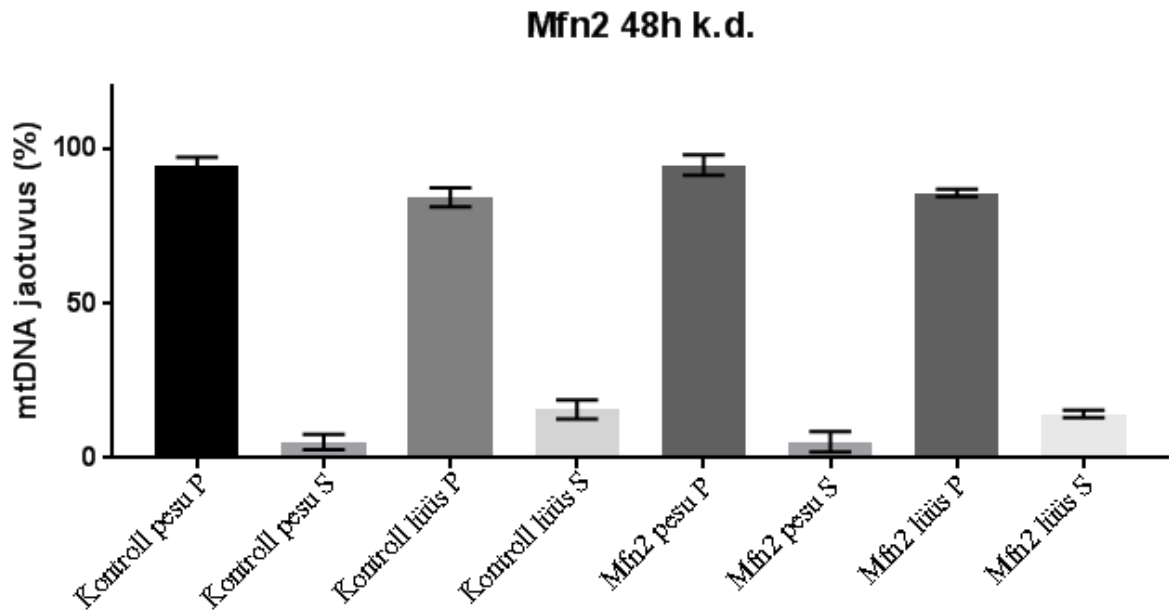
2.3.2 Lühiajaline Mfn2 *knockdown* mõjutab MAM-struktuure ning nukleoidi

Mfn2 48-tunnise *knockdown*'i puhul väheneb nii MAM markeri VDAC1 kui ER markeri FACL4 ekspressioon (Joonis 4). See näitab, et MAM-struktuuride moodustamine või stabiilsus on häiritud. Samuti muutub nukleoidi valkude ekspressioon. TFAM ja mtSSB ekspressioon nõrgalt väheneb, Twinkle puhul on näha aga ekspressiooni tugevnemist pestud mitokondrite pellet fraktsioonis võrreldes kontrolliga. Tõenäoliselt Mfn2 vähenemine mõjutab nukleoidi stabiilsust või organisatsiooni, lisaks on võimalik, et hakkab toimuma intensiivsem replikatsioon, sest antud protsessis osalevate valkude signaalid tugevnevad.

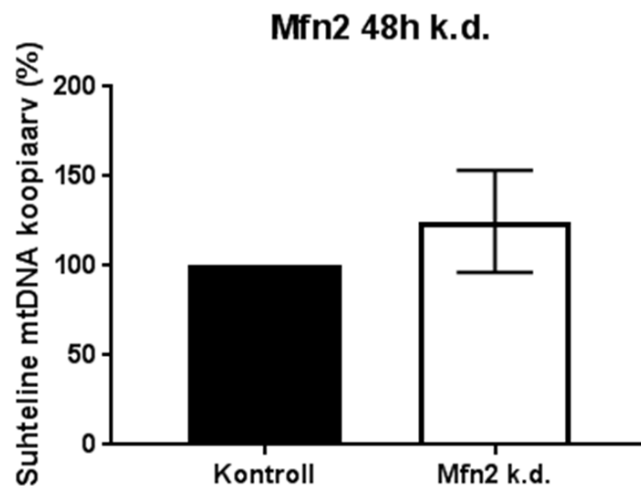
Mfn2 taseme vähenemine avaldab teatud mõju mtDNA-le, kuid efekt pole selge. MtDNA jaotuvus pellet ja supernatandi fraktsioonides Mfn2 lühiajalisel allasurumisel oluliselt ei muutu (Joonis 5). Seega ilmselt Mfn2 ei avalda mõju nukleoidide alampopulatsioonidele. Samas mtDNA koopiaarv keskmiselt suureneb 25% võrra (Joonis 6), mis võib tähendada, et replikatsioon intensiivistub, kuna tugevneb ka Twinkle signaal.



Joonis 4. Mfn2 48-tunnise *knockdown*'i mõju nukleoidi ja MAM valkudele. MAM valgud FACL4 ja VDAC1 selgelt nõrgenevad. TFAM ja mtSSB ekspressioon samuti väheneb, kuid mitte oluliselt. Twinkle ekspressioon suureneb. TFAM – mitokondriaalne transkriptsioofaktor A, mtSSB - mitokondriaalne üheaahelise DNA-ga seonduv valk, VDAC1 - pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1, FACL4 - pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4, Mfn2 – mitofusiin 2, HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa, COXII – tsütokroom oksüdaasi subühik II, mtDNA – mitokondriaalne DNA



Joonis 5. MtDNA jaotuvus 48-tunnise Mfn2 *knockdown*'i puhul. Võrreldes kontrolliga olulist muutust ei esine. Graafikul on ära toodud standardvead.

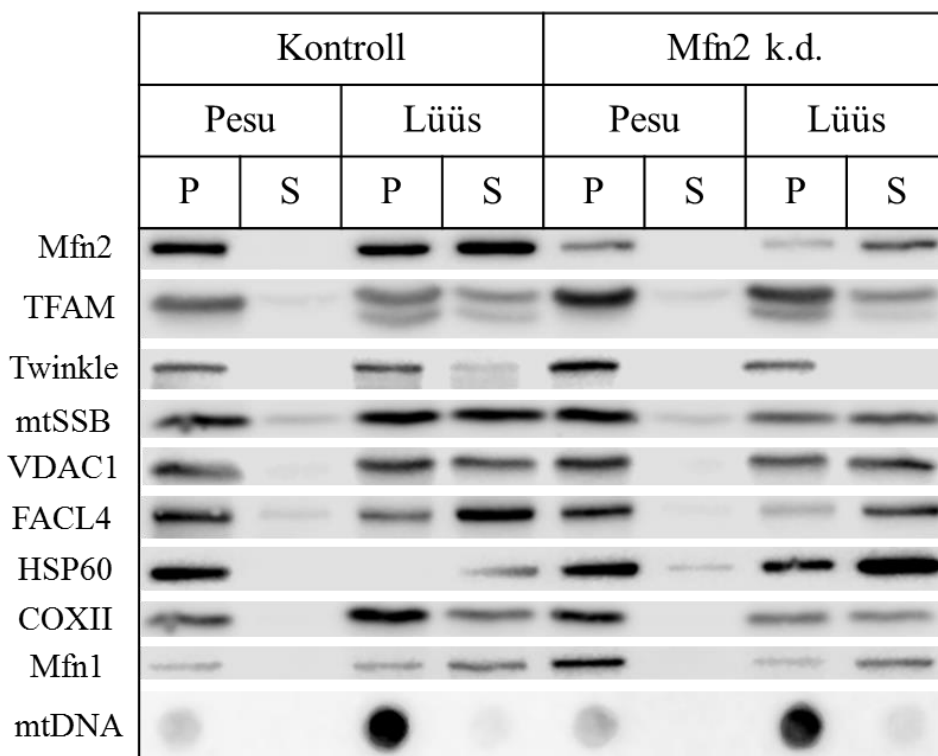


Joonis 6. MtDNA koopiaarvu suhteline muutus 48-tunnise Mfn2 *knockdown*'i puhul. On näha, et keskmiselt mtDNA koopiaarv suureneb. Graafikul on ära toodud standardviga.

2.3.3 Pikaajaline Mfn2 *knockdown* ei oma efekti MAM-idele

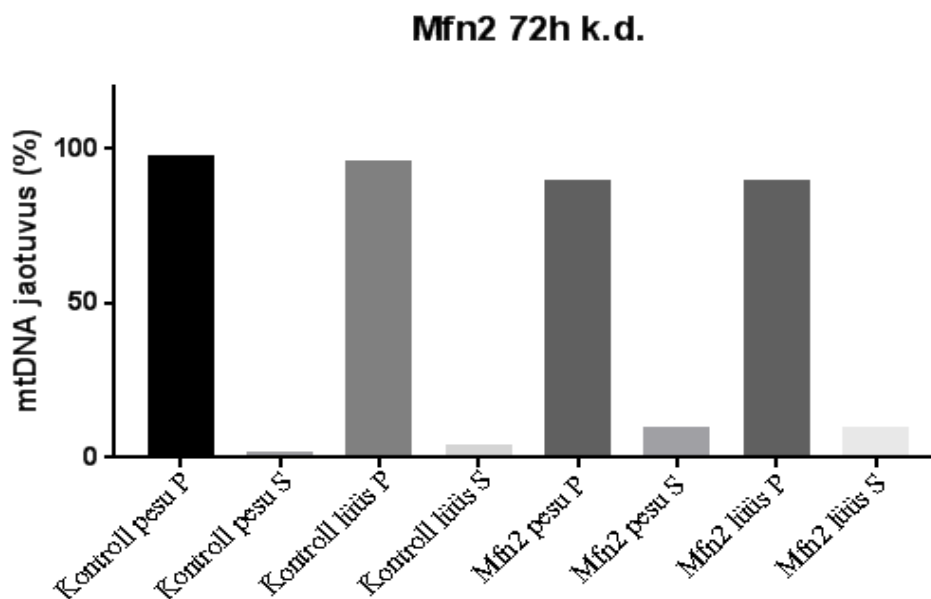
72-tunnine Mfn2 *knockdown* ei mõjuta enam MAM valkude ekspressiooni, kuna MAM markervalkude VDAC1 ja FACL4 signaalid on Mfn2 *knockdown*'i puhul sama tugevad kui kontrollides (Joonis 7), seega Mfn2 vähenemise efekt on tõenäoliselt vaid lühiajaline. Nukleoidi valkude ekspressioon aga mõnevõrra muutub. TFAM ja Twinkle tase tõuseb, samas mtSSB tase veidi langeb. Sarnaselt 48-tunnisele *knockdown*'ile esineb nõrk mõju

nukleoidile. Kuna varasemalt on näidatud, et Mfn2 ja Mfn1 omavad mõnevõrra kattuvaid funktsioone ning osaliselt komplementeerivad teineteist (Chen *et al.*, 2003), oli detekteeritud ka Mfn1, mille tase vastusena Mfn2 vähenemisele tõusis pestud mitokondrite pellet fraktsioonis. See tulemus on kooskõlas varasemalt publitseeritud andmetega (Leal *et al.*, 2016).

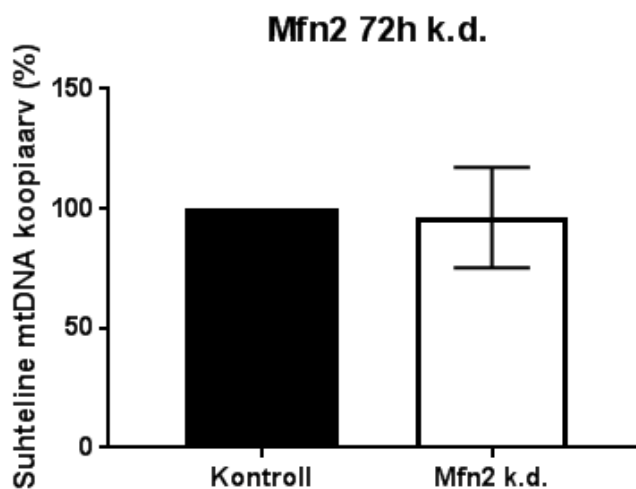


Joonis 7. Mfn2 72-tunnise *knockdown*'i mõju nukleoidi ja MAM-alkudele. VDAC1 ja FACL4 ekspressiooni tase ei muutu võrreldes kontrollidega. TFAM ja Twinkle ekspressioon suureneb ning mtSSB ekspressioon langeb. Mfn1 signaal pestud mitokondrite pellet fraktsioonis on Mfn2 *knockdown*'i puhul tugevam. TFAM – mitokondriaalne transkriptsioinfaktor A, mtSSB - mitokondriaalne üheahelalise DNA-ga seonduv valk, VDAC1 - pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1, FACL4 - pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4, Mfn2 – mitofusiin 2, HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa, COXII – tsütokroom oksüdaasi subühik II, mtDNA – mitokondriaalne DNA.

MtDNA jaotuvus 72-tunnise Mfn2 allasurumise puhul oluliselt ei muutu, kuna lüüsimise puhul pellet fraktsioonis esineva mtDNA osakaal on kontrolli ja *knockdown*'i puhul sarnane (Joonis 8). Seega ka pikemaajalise Mfn2 *knockdown*'i puhul ei ole suurt mõju nukleoidide erinevatele populatsioonidele. Jooniselt 9 on näha, et mtDNA koopiaarv sisuliselt ei muutu, seega mõju mtDNA-le on samuti pigem lühiajaline efekt.



Joonis 8. MtDNA jaotuvus 72-tunnise Mfn2 *knockdown*'i puhul. Sarnaselt lühiajalisele (48 tundi) Mfn2 allasurumisele ei ole mtDNA jaotuvus oluliselt mõjutatud, kuna liüsi puhul pellet ja supernatandi fraktsioonides esineva mtDNA osakaalud on kontrolli ja Mfn2 *knockdown*'i puhul sarnased.



Joonis 9. MtDNA koopiaarvu suhteline muutus Mfn2 72-tunnise *knockdown*'i puhul. On näha mtDNA koopiaarvu vähenemist, kuid muutus ei ole suur ja võib järeldada, et tegelikult mtDNA pole oluliselt mõjutatud. Graafikul on ära toodud standardviga.

2.4 Arutelu

Inimese replitseeruvad nukleoidid on seotud mitokondri sisemembraaniga ning paiknevad MAM-ide läheduses (Gerhold *et al.*, 2015). See annab alust arvata, et MAM-struktuurid ja

mtDNA metabolism võivad teineteist mõjutada. Pole teada, kuidas mõjutab näiteks mtDNA replikatsioon ning ka koopiaarv MAM-struktuuride moodustamist ja stabiilsust, kuid on leitud, et MAM-id on olulised mtDNA replikatsiooniks ning segregatsiooniks mitokondrite jagunemisel (Lewis *et al.*, 2016). Käesolevas töös uuriti MAM valgu Mfn2 mõju mitokondriaalsetele nukleoididele ning MAM-struktuuridele.

Koopiaarvu analüüsimise kontrollina kasutati Twinkle 72-tunnist *knockdown*'i. Twinkle on mitokondriaalne replikatiivne helikaas, mis on absoluutselt vajalik replikatsiooniks ning on nn minimaalse replisoomi osa (Korhonen *et al.*, 2004). Varasemalt on näidatud, et Twinkle allasurumine põhjustab mtDNA koopiaarvu langust ~50% võrra (Tynismaa *et al.*, 2004). Antud katsetes saadud tulemuse järgi Twinkle 72-tunnise *knockdown*'i puhul langes mtDNA koopiaarv keskmiselt 65% võrra (Joonis 3). Seega saadud tulemus on kooskõlas varasemalt avaldatud andmetega ning koopiaarvu analüüsimiseks kasutatud katseskeem on sobilik mtDNA koopiaarvu määramiseks.

Mfn2 mõju MAM-struktuuridele ning nukleoidile pole selge. Publitseeritud andmed on tihti vasturääkivad ning pole välistatud, et teatud efektid on rakuliini- või koespetsiifilised. Mfn2 mõju mtDNA-le on näidatud hiirtes, kus Mfn2 lühiajalisel puudumisel esineb mtDNA kadu (Chen *et al.*, 2010). MAM-struktuuride puhul on olemas andmeid selle kohta, et Mfn2 osaleb nende moodustamises (de Brito ja Scorrano, 2008), kuid on näidatud ka ER-kontaktide hulga suurenemist Mfn2 puudumisel (Filadi *et al.*, 2015). Seega selle valgu mõju vajab veel täiendavat uurimist.

Käesolevas töös teostati Mfn2 48- ja 72-tunnine *knockdown*. Antud katsetest järeldus, et Mfn2 puhul esineb teatud mõju nukleoidile. Lühiajalise *knockdown*'i puhul on näha TFAM ja mtSSB taseme langust ning Twinkle suurenemist (Joonis 4). Pikemaajaline efekt on aga selline, et TFAM ekspressiooni tase hoopis tõuseb, samal ajal kui Twinkle tase tõuseb ja mtSSB tase langeb sarnaselt lühiajalise *knockdown*'i puhul nähtud efektile (Joonis 7). Antud mõju on siiski nõrk ning pole selge, kuivõrd see tegelikult mõjutab nukleoidi stabiilsust. Kuna replitseeruvad nukleoidid on seotud MAM-idega (Gerhold *et al.*, 2015 ja Lewis *et al.*, 2016), ilmselt MAM-ide vähenemisel tekib vajadus intensiivsemaks replikatsiooniks. Seega on võimalik, et 48 tunni möödumisel toimub aktiivsem mtDNA replikatsioon kompenseerimaks MAM-ide vähenemist. Kuna 72 tunni möödumisel TFAM tase tõuseb, on võimalik, et mtDNA-d hakatakse aktiivsemalt nukleoididesse ära pakkima. Võrreldes kontrollidega

mtDNA jaotuvus Mfn2 vähenemisel oluliselt ei muutu nii 48- kui 72-tunnise allasurumise puhul (Joonised 5 ja 8). MtDNA koopiaarv tõuseb keskmiselt 25% võrra 48-tunnise Mfn2 *knockdown*'i puhul (Joonis 6), kuid edaspidi see efekt kaob ning mtDNA tase on sarnane kontrollrakkudele (Joonis 9). Võimalik, et 72 tunni möödudes hakkavad rakud taastuma ning Mfn2 kadu ei avalda enam nähtavat mõju. Nende efektide edasiseks uurimiseks on vajalikud täiendavad analüüsid ning erinevate meetodikate rakendamine. Üks võimalik viis uurida Mfn2 mõju edasi on mikroskoopia, mis võimaldaks jälgida muutusi nukleoidis ning mtDNA tasemes.

Samuti on näha, et Mfn2 mõjutab MAM-struktuure. 48-tunnise *knockdown*'i puhul on näha MAM valkude selget vähenemist (Joonis 4). Sellest saab järeldada, et Mfn2 on oluline MAM-struktuuride moodustamiseks ja/või nende stabiilsuse tagamiseks, nagu on varasemalt täheldatud. Kuid pikemaajalise *knockdown*'i puhul sellist efekti enam ei esine (Joonis 7). Kuna sama tendents esineb ka mtDNA koopiaarvu puhul, 72 tunni möödudes rakud tõenäoliselt taastuvad Mfn2 allasurumisest.

On teada, et Mfn1 ja Mfn2 on homoloogid, mis on võimelised üksteise funktsioone osaliselt komplementeerima (Chen *et al.*, 2003). 72-tunnise *knockdown*'i puhul oli detekteeritud ka Mfn1. Vastusena Mfn2 allasurumisele selle tase tõusis (Joonis 7). Lähtuvalt sellest võib Mfn1 suurenenud ekspressioon olla üks mehhanismidest, mis võimaldab Mfn2 kadu komplementeerida ning tänu sellele ei esine rakkudes enam neid efekte, mis olid nähtud 48 tunni möödudes. Samas Mfn1 mõju MAM-struktuuride moodustamisele või nende regulatsioonile ning mõju nukleoidile vajavad veel täiendavat uurimist. Selleks, et mõista Mfn1 rolli on vaja jälgida, kas Mfn1 tase muutub ka lühiajalise Mfn2 *knockdown*'i puhul. Samuti oleks huvitav jälgida käesolevas töös kasutatud süsteemis muutusi MAM-struktuurides ning nukleoidis juhul, kui mõlema homoloogi ekspressioon on alla surutud.

KOKKUVÕTE

Inimese mitokondrites esinevad DNA-valk kompleksid, mida nimetatakse nukleoidideks (Spelbrink, 2010). On olemas erinevad nukleoidide populatsioonid, mis osalevad erinevates protsessides. Replitseeruvad nukleoidid on tugevamalt seotud mitokondri sisemembraaniga (Rajala *et al.*, 2014), lisaks paiknevad need ER-mitokonder kontaktide (MAM-ide) läheduses (Gerhold *et al.*, 2015). On näidatud, et MAM-id mängivad rolli mtDNA replikatsioonis ning osalevad ka mtDNA segregatsioonis (Lewis *et al.*, 2016). Kuna mutatsioonid mtDNA-s põhjustavad haigusi, on oluline uurida mehhanisme, mis tagavad korrektse mtDNA replikatsiooni ja säilitamise.

Käesolevas töös uuriti MAM valgu Mfn2 mõju mitokondriaalsetele nukleoididele ning MAM-struktuuride moodustamisele 48- või 72-tunnise allasurumise puhul.

Mfn2 48-tunnisel vähenemisel esineb vähem MAM-struktuure, samas 72 tunni möödumisel ei ole enam olulist erinevust MAM valkudes võrreldes kontrollidega, seega antud efekt on vaid lühiajaline. Samuti Mfn2 taseme vähenemine avaldab teatud mõju nukleoidi stabiilsusele, kuna mõnevõrra muutub nukleoidi valkude ekspressioon, kuid see efekt on üsna nõrk. Mitokondriaalse DNA jaotuvus samuti oluliselt ei muutu ning seega Mfn2 ei mõjuta nukleoidide populatsioonide osakaalu rakus. MtDNA koopiaarv tõuseb 48-tunnise *knockdown*'i puhul, kuid efekt kaob 72 tunni möödumisel. Seega Mfn2 mõju replikatsioonile on lühiajaline ning 72 tunni möödudes hakkavad rakud taastuma.

Saadud tulemused näitavad, et Mfn2 mängib teatud rolli MAM-struktuuride moodustamises ja/või säilitamises. Samuti saab tulemustest järeldada, et MAM-struktuuridel on mõju mtDNA säilitamisele. Need tulemused vajavad kindlasti edasist uurimist ning selgitamist. See aitaks mõista mtDNA säilitamise mehhanisme ning nende regulatsiooni, mis omakorda aitaks kaasa mitokondriaalsete haiguste uurimisele.

The analysis of MAM protein mitofusin 2 impact on human mitochondrial nucleoids

Yuliya Basikhina

SUMMARY

Mitochondria are cellular organelles which have multiple vital functions, including oxidative phosphorylation, calcium homeostasis, steroid hormone synthesis etc. Mitochondria also have their own genome – mitochondrial DNA (mtDNA). Human mtDNA encodes electron transport chain proteins as well as rRNAs and tRNAs needed for mitochondrial protein synthesis. Mutations in mtDNA cause neurodegenerative diseases for which there is no cure.

Human mtDNA, similarly to many other organisms, forms complexes with proteins, termed nucleoids. It is now established that at least 2 subsets of nucleoids with different protein composition and functions exist. Nucleoids that are more tightly associated with the mitochondrial inner membrane contain proteins needed for mtDNA replication and thus are evidently the replicating nucleoids. Those nucleoids are associated with cholesterol-rich membrane areas and mitochondria-ER contacts, or MAM (mitochondria-associated ER-membranes). MAM have specific lipid and protein composition and are important for normal mitochondrial function. MAM play an important role in regulating mtDNA replication and segregation between divided mitochondria, but precise mechanisms of the interaction are not entirely known.

In this work, the impact of MAM protein Mfn2 on MAM formation/integrity and nucleoids in human cultured cells was analyzed. It was found that Mfn2 knockdown slightly impacts the expression of nucleoid proteins involved in mtDNA replication. It also reduces MAM protein expression levels, but the effect is short-term only. Mfn2 knockdown also causes an increase in mtDNA copy number, which is a short-term effect as well. It is possible that the decrease in MAM structures, which are important for replication, causes more intensive replication to compensate for the loss of those structures. Long-term loss of the effect might be caused by cells recovering from the loss of Mfn2.

The results obtained provide some additional insight into the role of MAM in mtDNA maintenance. To understand the underlying mechanisms, further research is needed.

Understanding those mechanisms may help us identify pathways responsible for development of mitochondrial disease and possibly find a way to alleviate the symptoms.

TÄNUAVALDUSED

Suurim tänu kuulub minu põhijuhendajale Koit Aasumetsale kannatliku õpetamise, abivalmiduse ning mõistva suhtumise eest. Samuti tänan kaasjuhendajat Joachim Matthias Gerholdi asjaliku nõu ja abi eest. Tänan ka kõiki laborikaaslasi, kes aitasid tuju üleval hoida ning löid meeldiva õhkkonna.

KIRJANDUSE LOETELU

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.

Area-Gomez, E., del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M.D., ... Schon, E.A. (2012). Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease: Upregulated function of MAM in AD. *EMBO J* 31: 4106–4123.

Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A., and Milbrandt, J. (2007). Altered Axonal Mitochondrial Transport in the Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth Disease from Mitofusin 2 Mutations. *J Neurosci* 27: 422–430.

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.

Berk, A.J., and Clayton, D.A. (1974). Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: Asynchronous replication of strands, segregation of circular daughter molecules, aspects of topology and turnover of an initiation sequence. *J Mol Biol* 86: 801–824.

Bogenghagen, D.F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1819: 914–920.

Bogenghagen, D.F., Rousseau, D., and Burke, S. (2008). The Layered Structure of Human Mitochondrial DNA Nucleoids. *J Biol Chem* 283: 3665–3675.

Bowmaker, M., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H.T., Huberman, J.A., and Holt, I.J. (2003). Mammalian Mitochondrial DNA Replicates Bidirectionally from an Initiation Zone. *J Biol Chem* 278: 50961–50969.

de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605–610.

- Brown, T.A., Cecconi, C., Tkachuk, A.N., Bustamante, C., and Clayton, D.A. (2005). Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev* 19: 2466–2476.
- Cerritelli, S.M., Frolova, E.G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P.E., and Crouch, R.J. (2003). Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in *Rnaseh1* null mice. *Molecular Cell* 11: 807–815.
- Chang, C.-R., and Blackstone, C. (2007). Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology. *J Biol Chem* 282: 21583–21587.
- Chang, D.D., and Clayton, D.A. (1984). Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell* 36: 635–643.
- Chang, D.D., and Clayton, D.A. (1985). Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 351–355.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2006). Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 18: 453–459.
- Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185–26192.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins *Mfn1* and *Mfn2* coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160: 189–200.
- Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2007). Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell* 130: 548–562.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations. *Cell* 141: 280–289.

- Chinnery, P.F., Howell, N., Lightowers, R.N., and Turnbull, D.M. (1998). MELAS and MERRF. The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. *Brain* 121: 1889–1894.
- Clayton, D.A., Davis, R.W., and Vinograd, J. (1970). Homology and structural relationships between the dimeric and monomeric circular forms of mitochondrial DNA from human leukemic leukocytes. *J Mol Biol* 47: 137–153.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* 174: 915–921.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.-M., ... Hamel, C.P. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin- related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nature Genet* 26: 207–210.
- Duxin, J.P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J.L., Spelbrink, J.N., and Stewart, S.A. (2009). Human Dna2 Is a Nuclear and Mitochondrial DNA Maintenance Protein. *Mol Cell Biol* 29: 4274–4282.
- Ekstrand, M.I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C.B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.G. (2004). Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 13: 935–944.
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., and Mihara, K. (2003). Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *J Biochem* 134: 333–344.
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Gustafsson, C.M. (2007). DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76: 679–699.
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., and Pizzo, P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E2174–E2181.

- Fisher, R.P., and Clayton, D.A. (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 8: 3496–3509.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334: 358–362.
- Fujimoto, M., Hayashi, T., and Su, T.-P. (2012). The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 635–639.
- Fusté, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I.J., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2010). Mitochondrial RNA Polymerase Is Needed for Activation of the Origin of Light-Strand DNA Replication. *Molecular Cell* 37: 67–78.
- Gandre-Babbe, S., and van der Blik, A.M. (2008). The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell* 19: 2402–2412.
- 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.
- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Gustafsson, C.M. (2004). The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *EMBO J* 23: 4606–4614.
- Gautier, C.A., Erpapazoglou, Z., Mouton-Liger, F., ... Corti, O. (2016). The endoplasmic reticulum-mitochondria interface is perturbed in PARK2 knockout mice and patients with PARK2 mutations. *Hum Mol Genet* 25: 2972–2984.
- Gerhold, J.M., Cansiz-Arda, Ş., Löhmus, M., Engberg, O., Reyes, A., van Rennes, H., Sanz, A., Holt, I.J., Cooper, H.M., and Spelbrink, J.N. (2015). Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure. *Scientific Reports* 5: 15292.

- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., and Wallace, D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 6715–6719.
- Hayashi, J., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y., and Nonaka, I. (1991). Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10614–10618.
- He, J., Mao, C.-C., Reyes, A., ... Holt, I.J. (2007). The AAA⁺ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol* 176: 141–146.
- Herbers, E., Kekäläinen, N.J., Hangan, A., Pohjoismäki, J.L., and Goffart, S. (2018). Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. *Mitochondrion*, doi: 10.1016/j.mito.2018.01.004
- 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.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000). Coupled Leading- and Lagging-Strand Synthesis of Mammalian Mitochondrial DNA. *Cell* 100: 515–524.
- Holt, I.J., and Reyes, A. (2012). Human Mitochondrial DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, doi: 10.1101/cshperspect.a012971
- Horwich, A.L., Kalousek, F., Mellman, I., and Rosenberg, L.E. (1985). A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *EMBO J* 4: 1129–1135.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., ... 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.
- Hutchison., C.A., Newbold, J.E., Potter, S.S., and Edgell, M.H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251: 536-538.

- Iborra, F.J., Kimura, H., and Cook, P.R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biology* 2: 9.
- Ishihara, N., Eura, Y., and Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117: 6535–6546.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., ... Mihara, K. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nature Cell Biol* 11: 958–966.
- James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., and Martinou, J.-C. (2003). hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. *J Biol Chem* 278: 36373–36379.
- Javaherian, K., Liu, J., and Wang, J. (1978). Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 change the DNA helical structure. *Science* 199: 1345–1346.
- Kasamatsu, H., Robberson, D.L., and Vinograd, J. (1971). A Novel Closed-Circular Mitochondrial DNA with Properties of a Replicating Intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2252–2257.
- 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.
- Koshihara, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science* 305: 858–862.
- Korhonen, J.A., Gaspari, M., and Falkenberg, M. (2003). TWINKLE Has 5'→3' DNA Helicase Activity and Is Specifically Stimulated by Mitochondrial Single-stranded DNA-binding Protein. *J Biol Chem* 278: 48627–48632.
- Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M., and Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J* 23: 2423–2429.

- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997). The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science* 275: 1132–1136.
- Kukat, C., Davies, K.M., Wurm, C.A., Spähr, H., Bonekamp, N.A., Köhl, I., Joos, F., Polosa, P.L., Park, C.B., and Posse, V. (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 11288–11293.
- Kukat, C., Wurm, C.A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13534–13539.
- Leal, N.S., Schreiner, B., Pinho, C.M., Filadi, R., Wiehager, B., Karlström, H., Pizzo, P., and Ankarcróna, M. (2016). Mitofusin-2 knockdown increases ER–mitochondria contact and decreases amyloid β -peptide production. *J Cell Mol Med* 20: 1686–1695.
- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A., and Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* 117: 2653–2662.
- Lewis, S.C., Uchiyama, L.F., and Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* 353: aaf5549.
- Litonin, D., Sologub, M., Shi, Y., Savkina, M., Anikin, M., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M., and Temiakov, D. (2010). Human Mitochondrial Transcription Revisited: Only TFAM And TFB2M Are Required For Transcription Of The Mitochondrial Genes In Vitro. *J Biol Chem* 285: 18129–18133.
- Liu, P., Qian, L., Sung, J.-S., de Souza-Pinto, N.C., Zheng, L., Bogenhagen, D.F., Bohr, V.A., Wilson, D.M., Shen, B., and Demple, B. (2008). Removal of Oxidative DNA Damage via FEN1-Dependent Long-Patch Base Excision Repair in Human Cell Mitochondria. *Mol Cell Biol* 28: 4975–4987.
- Mason, P.A., Matheson, E.C., Hall, A.G., and Lightowlers, R.N. (2003). Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res* 31: 1052–1058.

- Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J., and Baloh, R.H. (2010). Mitofusin 2 Is Necessary for Transport of Axonal Mitochondria and Interacts with the Miro/Milton Complex. *J Neurosci* 30: 4232–4240.
- Misko, A.L., Sasaki, Y., Tuck, E., Milbrandt, J., and Baloh, R.H. (2012). Mitofusin2 Mutations Disrupt Axonal Mitochondrial Positioning and Promote Axon Degeneration. *J Neurosci* 32: 4145–4155.
- Moraes, C.T., Ricci, E., Bonilla, E., DiMauro, S., and Schon, E.A. (1992). The Mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) Mutation in Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes (MELAS): Genetic, Biochemical, and Morphological Correlations in Skeletal Muscle. *Am J Hum Genet* 50: 934–949.
- Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290: 470-474.
- Parisi, M.A., and Clayton, D.A. (1991). Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252: 965–969.
- Pohjoismäki, J.L.O., Goffart, S., Tyynismaa, H., ... Jacobs, H.T. (2009). Human Heart Mitochondrial DNA Is Organized in Complex Catenated Networks Containing Abundant Four-way Junctions and Replication Forks. *J Biol Chem* 284: 21446–21457.
- Posse, V., Hoberg, E., Dierckx, A., Shahzad, S., Koolmeister, C., Larsson, N.G., Wilhelmsson, L.M., Hällberg, B.M., and Gustafsson, C.M. (2014). The amino terminal extension of mammalian mitochondrial RNA polymerase ensures promoter specific transcription initiation. *Nucleic Acids Res* 42: 3638–3647.
- 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 Acids Res* 42: 952–967.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses. *Science* 280: 1763-1766.

- Ruhanen, H., Ushakov, K., and Yasukawa, T. (2011). Involvement of DNA ligase III and ribonuclease H1 in mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Biochim. Biophys. Acta - Molecular Cell Research* 1813: 2000–2007.
- Rusiñol, A.E., Cui, Z., Chen, M.H., and Vance, J.E. (1994). A Unique Mitochondria-associated Membrane Fraction from Rat Liver Has a High Capacity for Lipid Synthesis and Contains Pre-Golgi Secretory Proteins Including Nascent Lipoproteins. *J Biol Chem* 269: 27494-27502.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J., and Fuller, T.M. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116: 2763–2774.
- Sasaki, T., Sato, Y., Higashiyama, T., and Sasaki, N. (2017). Live imaging reveals the dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Fucci2-HeLa cells. *Scientific Reports* 7: 11257, doi:10.1038/s41598-017-10843-8
- Satoh, M., and Kuroiwa, T. (1991). Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res.* 196: 137-40.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., ... Zorzano, A. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5523–5528.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16: 869–871.
- Shi, Y., Dierckx, A., Wanrooij, P.H., Wanrooij, S., Larsson, N.-G., Wilhelmsson, L.M., Falkenberg, M., and Gustafsson, C.M. (2012). Mammalian transcription factor A is a core component of the mitochondrial transcription machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16510–16515.
- Shiao, Y.-J., Lupo, G., and Vance, J.E. (1995). Evidence That Phosphatidylserine Is Imported Into Mitochondria via a Mitochondria-associated Membrane and That the Majority of

Mitochondrial Phosphatidylethanolamine is Derived from Decarboxylation of Phosphatidylserine. *J Biol Chem* 270: 11190-11198.

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M.S., Seibel, P., Ballinger, S.W., and Wallace, D.C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 61: 931–937.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell* 12: 2245–2256.

Sologub, M., Litonin, D., Anikin, M., Mustaev, A., and Temiakov, D. (2009). TFB2 Is a Transient Component of the Catalytic Site of the Human Mitochondrial RNA Polymerase. *Cell* 139: 934–944.

Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. (2009). Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Mol Biol Cell* 20: 3525–3532.

de Souza-Pinto, N.C., Mason, P.A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevnsner, T.V., Rasmussen, L.J., and Bohr, V.A. (2009). Novel DNA mismatch repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair* 8: 704–719.

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., ... 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. *Nature Genet* 28: 223-231.

Stierum, R.H., Dianov, G.L., and Bohr, V.A. (1999). Single-nucleotide patch base excision repair of uracil in DNA by mitochondrial protein extracts. *Nucleic Acids Res* 27: 3712–3719.

Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., and Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402: 371.

- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* 175: 901–911.
- Tapper, D.P., and Clayton, D.A. (1981). Mechanism of Replication of Human Mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 256: 5109-5115.
- Thompson, W.E., Ramalho-Santos, J., and Sutovsky, P. (2003). Ubiquitination of Prohibitin in Mammalian Sperm Mitochondria: Possible Roles in the Regulation of Mitochondrial Inheritance and Sperm Quality Control. *Biol Reprod* 69: 254–260.
- Tiranti, V., Rocchi, M., DiDonato, S., and Zeviani, M. (1993). Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB). *Gene* 126: 219-225.
- Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J.N., Holt, I.J., and Suomalainen, A. (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet* 13: 3219–3227.
- Vandecasteele, G., Szabadkai, G., and Rizzuto, R. (2001). Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. *IUBMB Life* 52: 213–219.
- Vance, J.E. (1990). Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria. *J Biol Chem* 265: 7248-7256.
- Verhoeven, K., Claeys, K.G., Züchner, S., ... Timmerman, V. (2006). MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129: 2093–2102.
- Vielhaber, S., Debska-Vielhaber, G., Peeva, V., ... Kunz, W.S. (2013). Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion. *Acta Neuropathol* 125: 245–256.
- Wallace, D.C. (2007). Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu Rev Biochem* 76: 781–821.

- 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.
- Wanrooij, S., Fuste, J.M., Farge, G., Shi, Y., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2008). Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11122-11127.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsen, G.J., and Woese, C.R. (1985). Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4443-4447.
- Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T.J., Yang, M.-Y., Bowmaker, M., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2006). Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J* 25: 5358–5371.
- Zeviani, M., Bresolin, N., Gellera, C., Bordini, A., Pannacci, M., Amati, P., Moggio, M., Servidei, S., Scarlato, G., and DiDonato, S. (1990). Nucleus-driven Multiple Large-Scale Deletions of the Human Mitochondrial Genome: A New Autosomal Dominant Disease. *Am J Hum Genet* 47: 904-914.
- Zhang, H., Zhang, Y.-W., Yasukawa, T., Dalla Rosa, I., Khiati, S., and Pommier, Y. (2014). Increased negative supercoiling of mtDNA in TOP1mt knockout mice and presence of topoisomerases II and II in vertebrate mitochondria. *Nucleic Acids Res* 42: 7259–7267.
- Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., ... Shen, B. (2008). Human DNA2 Is a Mitochondrial Nuclease/Helicase for Efficient Processing of DNA Replication and Repair Intermediates. *Mol Cell* 32: 325–336.
- Züchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., ... Vance, J.M. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature Genet* 36: 449–451.

LISAD

Lisa 1 Töölahused

Lüüsilahus:

20 mM Tris-HCl pH 7.5

25 mM EDTA pH 8.0

75 mM NaCl

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 foreesipuhver:

142,15 g Glütsiin

35 g Tris alus

10g SDS

ddH₂O lõppruumalani

10x wet transfer puhver:

0,25 M Tris alus

1,9 M Glütsiin

0,2 % SDS

ddH₂O lõppruumalani

1x wet transfer puhvril lisaks 20% CH₃OH

10x TBS:

1,5 M NaCl

500 mM Tris, pH 7,5

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

ECL võimendaja:

11 mg Parakumaarhape

10 ml DMSO

Church puhver: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 puhver:40 mM NaPi (NaH₂PO₄; Na₂HPO₄)

1 mM EDTA pH 8,0

5% (w/v) SDS

Lisa 2 Praimerid

APP forward: 5'-TTT TTG TGT GCT CTC CCA GGT CT-3'

APP reverse: 5'-TGG TCA CTG GTT GGT TGG C-3'

CYTB forward: 5'-GCC TGC CTG ATC CTC CAA AT-3'

CYTB reverse: 5'-AAG GTA GCG GAT GAT TCA GCC-3'

Lisa 3 PCR programmid, reaktsioonisegu

Tabel 1. qPCR programm.

Temperatuur	Aeg
95°C	12 minutit
95°C	15 sekundit
60°C	1 minut
95°C	15 sekundit
60°C	15 sekundit
95°C	15 sekundit

} 46 tsüklit

Tabel 2. Radioaktiivse PCR-i reaktsioonisegu.

ddH ₂ O	7,7 µl
10x PCR puhver	2 µl
MgCl ₂	2 µl
Taq polümeraas	0,3 µl
dNTP (-dCTP)	2 µl
α- ³² P-dCTP	3 µl
CYTB fw praimer	1 µl
CYTB rev praimer	1 µl
CYTB matriits	1 µl

Tabel 3. Radioaktiivse PCR-i programm.

Temperatuur	Aeg	
95°C	5 minutit	
95°C	30 sekundit	} 20 tsükliit
55°C	30 sekundit	
72°C	45 sekundit	
10°C	∞	

Lisa 4 Antikehad ja siRNA-d

Tabel 4. Töös kasutatud primaarantikehad.

Primaarantikeha	Tootja ja Cat N°	Antikeha allikas	Lahjendus
TFAM	Abcam ab119684	Hiir	1:10 000
Twinkle	Dr Anu Suomalainen Wartiovaara	Hiir	1:1000
VDAC1	Santa Cruz sc-390996	Hiir	1:1000

Primaarantikeha	Tootja ja Cat N°	Antikeha allikas	Lahjendus
mtSSB	Sigma HPA002866	Küülik	1:3000
HSP60	Santa Cruz sc-376240	Hiir	1:1000
Mitofusin 2	Santa Cruz sc-100560	Hiir	1:1000
Mitofusin 1	Santa Cruz sc-166644	Hiir	1:1000
MTCO2	ProteinTech 55070-1-AP	Küülik	1:5000
FACL4	Santa Cruz sc-271800	Hiir	1:1000

Tabel 5. Töös kasutatud sekundaarsed antikehad.

Sekundaarantikeha	Tootja ja Cat N°	Antikeha allikas	Lahjendus
anti-mouse IgG HRP	Vector Laboratories PI-2000	Hobune	1:10 000
anti-rabbit IgG HRP	Vector Laboratories PI-1000	Kits	1:10 000

Tabel 5. Töös kasutatud siRNA konstruktid.

siRNA	Tootja	Kataloogi N°
Twinkle (C10orf2)	Dharmacon™	M-017815-01-0020
MFN2	Dharmacon™	M-012961-00-0005

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Yuliya Basikhina (31.01.1996),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**MAM valgu mitofusiin 2 mõju analüüs inimese mitokondriaalsetele nukleoididele**“, mille juhendajad on Koit Aasumets ja 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 **31.12.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018