

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Mitokondriaalsete nukleoidide ja mitokondritega seotud ER-membraanide (MAM)  
koosmõju inimrakkudes**

Magistritöö

30 EAP

Koit Aasumets

Juhendaja dotsent Joachim Matthias Gerhold

TARTU 2017

## **Mitokondriaalsete nukleoidide ja mitokondritega seotud ER-membraanide (MAM) koosmõju inimrakkudes**

Mitokondriaalne DNA (mtDNA) moodustab rakkudes nukleoproteiinkomplekse, mida nimetatakse nukleoidideks. MtDNA säilitamine on raku elutegevuse seisukohalt oluline, kuna häired mtDNA-s põhjustavad haiguseid. Mitokondriaalsed nukleoidid assotsieeruvad mitokondri sisemembraaniga ning kolesteroolirikka mikrodomääniga, mis tõenäoliselt koordineerivad mtDNA säilitamist. Mitokondrid on kontaktis ER membraanidega (MAM), mille kaudu reguleeritakse arvatavasti ka mtDNA säilitamist/segregatsiooni. Käesolevas töös uuriti nukleoidide võimalikke mõjusid MAM-idele ning MAM-ide võimalikke mõjusid nukleoididele kasutades siRNA vahendatud *knockdown* meetodit. Selgus, et nukleoidi valk TFAM mõjutab selgelt nii nukleoidide kui MAM-struktuure. MAM-ide valk Mfn2 ei avaldanud tugevat mõju nukleoididele. Nukleoididega seotud ATAD3 mõjutas sarnaselt TFAM mahasurumisele MAM-struktuure.

Märksõnad: Mitokondri, nukleoid, MAM, mitokondriaalne DNA, TFAM, Twinkle.

CERCS teaduseriala: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees; P340 membraanid

## **The interplay between mitochondrial nucleoids and mitochondria associated ER-membranes (MAM) in human cultured cells**

Mitochondrial DNA (mtDNA) is organised into nucleoprotein complexes termed nucleoids. MtDNA maintenance is essential for the normal functioning of eucaryotic cells, and defects in mtDNA maintenance may contribute to the development of diseases of various kinds. Mitochondrial nucleoids associate with the inner mitochondrial membrane and with a microdomain rich in cholesterol that coordinates proper mtDNA replication. Mitochondria are in contact with ER membranes (MAM) that might contribute to the maintenance of the replication microdomain. The aim of the present work was to investigate possible impacts of nucleoid changes on MAM and *vice versa* applying siRNA mediated knockdown of relevant proteins. It was found that the nucleoid core component TFAM has a strong effect on both MAM structures and nucleoid organisation. Reduction of Mfn2, a MAM-component, showed no obvious impact on nucleoids. The structural nucleoid protein ATAD3 had a similar effect on MAM as the loss of TFAM.

Keywords: Mitochondria, nucleoids, MAM, mitochondrial DNA, TFAM, Twinkle.

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

# SISUKORD

LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	7
1. KIRJANDUS .....	8
1.1 Mitokonder.....	8
1.2 Mitokondrite funktsioon .....	8
1.3 Mitokondriaalne DNA ja nukleoidid .....	9
1.4 Mitokondriaalne dünaamika .....	13
1.4.1 Mitokondrite jagunemine .....	13
1.4.2 Mitokondrite ühinemine.....	15
1.4.3 Mitofaagia .....	16
1.5 ER-mitokonder kontakt – MAM.....	17
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	20
2.1 Töö eesmärk.....	20
2.2 Materjal ja meetoodika .....	20
2.2.1 Rakuliin ja meedium .....	20
2.2.2 RNA interferents .....	21
2.2.3 Mitokondrite eraldamine ja lüüsimine .....	21
2.2.4 Jodiksanooli gradiendid.....	22
2.2.5 Western blot ja Southern blot.....	22
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 Twinkle kadu ei põhjusta MAM-struktuuridele muutuseid .....	24
2.3.2 TFAM taseme langus varases faasis tugevdab MAM-struktuure .....	27
2.3.3 Mitofusiin 2 kadu mõjutab nõrgalt nukleoidide organisatsiooni .....	29
2.3.4 ATAD3 vähenemine põhjustab ka MAM-struktuuride vähenemist .....	32
2.3.5 ATAD3B üleekspressiooni efekt nukleoidi mikrodomäänile sarnaneb ATAD3A mahasurumisega .....	36
2.3.6 ATAD3B üleekspressioon põhjustab MAM-struktuuride häirumist .....	39

KOKKUVÕTE .....	43
SUMMARY .....	44
TÄNUAVALDUSED.....	46
KASUTATUD MATERJALID.....	47
LISAD .....	57
Lisa 1 Töös kasutatud lahused .....	57
Lisa 2 Antikehad ja siRNA konstruktid.....	58

## LÜHENDID

Akt1 – seriin/treoniin valgukinaas/AGC perekonna valgukinaas

AlkBh1 – Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutaraadi sõltuv dioksügenaas 1

ATAD3 – ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3

COXII – tsütokroom c oksüdaas II subühik

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagle's meedium

Drp1 – dünaamiinseotud valk 1

FACL4 – pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4

FASTKD2 – FAST kinaasi domääni sisaldav valk 2

FBS – veise looteseerum

Fis1 – mitokondriaalne fissiooni valk 1

Grp75 – 75kDa suurune glükoosi poolt reguleeritud valk

HEK293e – inimese embrüonaalsed neerurakud

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

HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa

IMM – mitokondri sisemembraan

IMS – intermembraanne ruum

INF1/2 – ingl *inverted formin-2*

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

MAM – mitokondritega assotsieerunud membraanid

MEF – hiire embrüonaalsed fibroblastid

Mff – mitokondriaalne fissioonifaktor

Mfn1/2 – mitofusiin 1/2

MiD49/50 – mitokondriaalse dünaamika valk 49/50

mLST8 – ingl *mammalian lethal with SEC13 protein 8*

mtNAP – mitokondriaalse nukleoidiga assotsieerunud valk

mtSSB – mitokondriaalne üheaahelalist DNA-d siduv valk

mTOR – ingl *mammalian target of rapamycin*

mTORC1/2 – mTOR kompleks 1/2

OMM – mitokondri välismembraan

OPA1 – optiline atroofia 1

OXPPOS – oksüdatiivne fosforüleerimine  
Parkin – E3 ubikvitiin-valk ligaas  
PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus  
PEO – progressiivne eksternaalne oftalmopleegia  
Pink1 – ingl *PTEN-induced putative kinase 1*  
PMSF - fenüülmetaansulfonüülfluoriid  
POLG – polümeraas  $\gamma$   
SDS-PAGE – naatrium dodetsüülsulfaat poliakrüülamiid geelektroforees  
SIN1 – stressi poolt aktiveeritud valgukinaasiga (SAPK) interakteeruv valk 1  
SSC – naatriumkloriid naatriumtsitraat  
TCA - trikarboksüülhape  
TBS – trispuhverdatud soolalahus  
TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A  
TN – Tris-NaCl  
TOM40 – välismembraani translokaas 40 kDa  
VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1

## SISSEJUHATUS

Mitokonder on arvukate biokeemiliste protsesside nagu oksüdatiivne fosforüleerimine, Krebs'i tsükkel, rasvhapete  $\beta$ -oksüdatsioon, kaltsiumi metabolism ning heemi biosüntees toimumiskohaks ning omab keskset rolli raku elus ja surmas.

Mitokondriaalne DNA on organiseeritud valkudega kompleksidesse, mida kutsutakse nukleoidideks. Mitokondriaalsed nukleoidid on seotud sisemembraaniga ning kolesteroolirikka membraanistruktuuriga (Gerhold jt, 2015). Raku elutegevuse seisukohalt on väga oluline korrektne mtDNA säilitamine (OXPHOS normaalseks toimimiseks) ja ka segregatsioon, kuna mitmed mtDNA-ga (ja seejuures nukleoididega) seotud defektid põhjustavad inimesel haiguseid.

Mitokondrid moodustavad retiikulumilaadseid struktuure, mis on omaette dünaamilised ehk mitokondrid läbivad pidevalt ja kooskõlastatult jagunemist ning ühinemist. Dünaamiline mitokondriaalne võrgustik vajab ka mtDNA segregatsiooni organiseerimist, ent seni pole täpselt teada, milliste mehhanismide kaudu nukleoidide jagunemine toimub. Nukleoidide segregatsioon on väga tõenäoliselt seotud mitokondriaalse jagunemisega, sest on leitud, et osa nukleoidide paiknevad mitokondrite jagunemiskohtade vahetus läheduses (Gerhold jt, 2015; Lewis jt, 2016).

Mitokondrid moodustavad ER-iga kontakte, mida kutsutakse mitokondritega seotud ER membraanideks (MAM-ideks) ning mis on olulised organellidevahelised signalseerimise ja transpordi kohad. Arvatavasti koordineerivad mikrodomään(id) ja/või MAM-id mtDNA säilitamist, kuid seni on vähe teada MAM-ide mõjust mitokondriaalsetele nukleoididele.

Käesoleva töö eesmärkideks oli uurida mitokondriaalsete nukleoidide mõju ER-mitokonder kontaktidele (MAM-idele) ning MAM struktuuride mõju nukleoididele. Antud tulemused võiksid olla abiks mitmete mitokondriaalsete haiguste kujunemise mehhanismide arusaamisele, mis on seotud mtDNA pakkimise ja segregatsiooniga, aga võib olla ka mõistmaks neurodegeneratiivseid haiguseid, mille korral MAM terviklikkuse häirumine rolli mängib.

# 1. KIRJANDUS

## 1.1 Mitokonder

Eukarüootse raku organel mitokonder on endosümbioosi hüpoteesi kohaselt otsene bakteriaalse endosümbiondi järeltulija, mis sai alguse evolutsiooni varases staadiumis tuuma sisaldavas peremeesrakus (Gray jt, 1999). Genoomi aspektist vaadatuna põlvneb mitokonder  $\alpha$ -proteobakterite (*Alphaproteobacteria*) hõimkonnast (Gray 2012).

Kui 19. sajandi teadlased avastasid valgusmikroskoobis graanulid (*chondria*) ning filamendid (*mito*) ei olnud nad üldse teadlikud vaadeldavast funktsionaalselt eristuvast struktuurist. Detailne morfoloogiline mitokondrite kirjeldus sai võimalikuks elektronmikroskoobi täiustamisega, kui kinnitati mitokondrite kaksikmembraani ja kristade olemasolu. Nüüdseks on antud organellide struktuur ja funktsioon üsna põhjalikult kirjeldatud. Mitokondrite suurus ning kuju on rakutüübiti üsna varieeruvad (tüüpiliselt hepatotsüütides ja fibroblastides on need 3-4  $\mu\text{m}$  pikad ja umbes 1  $\mu\text{m}$  diameetriga), samuti on varieeruvus ka kristade arvus ja struktuuris. Mitokondrite arv raku kohta on samuti väga varieeruv, nii võib neid olla erinevates rakutüüpides tuhandest (~800 hepatotsüüdis) enam kui saja tuhandeni (ootsüüdis). Samas on spermatoosoidides suhteliselt vähe mitokondreid (seevastu võivad need olla erakordselt suured) ning küpsetes erütrotsüütides puuduvad need üldse. (Scheffler, 2008)

Mitokondrid moodustavad umbes  $\frac{1}{4}$  tsütoplasma mahust. Mitokondrid ei ole staatilised, vaid nad liiguvad mööda tsütoskeletti, tehes läbi fusiooni ja fissiooni. Rakkude jagunemisel jagatakse mitokondrid enam vähem võrdselt tütarakkude vahel. Mitokondritel on välimine ja sisemine membraan (vastavalt OMM ja IMM) ning intermembraanne ruum (IMS). OMM on hästi läbilaskev sisaldades palju väikeseid poore. IMM on läbimatu enamikele väikestele molekulidele ja ioonidele võimaldades sedasi elektrokeemilise gradiendi hoidmist. IMM voltub lamellaarseteks struktuurideks – kristadeks, mis suurendavad selle pinda ja massi. On pakutud, et kolm neljandikku IMM massist on valk ning paljud neist valkudest on OXPHOS komponendid. Sisemine mitokondrite kompartment on maatriks, mis sisaldab TCA tsükli ning  $\beta$ -oksidatsiooni ensüüme. (McBride jt, 2006; Renard, 2012)

## 1.2 Mitokondrite funktsioon

Mitokondrid omavad kesksel rollil metabolismis, olles vastutavad energia konverteerimise eest vormi, mis on raku poolt otseselt kasutatav. Oksüdatiivse fosforüleerimise (OXPHOS) rada korjab energia toitainetest ning muundab selle ATP-ks.



Lisaks sellele osalevad mitokondrid rasvhapete oksüdatsioonis ning kontrollivad ka apoptoosi (Dimmer ja Scorrano, 2006; Naon ja Scorrano, 2014). Mitokondritel on kriitiline roll fosfolipiidide sünteesis, metaboliitide transpordis, rasvhapete  $\beta$ -oksüdatsioonis ja mitmetes teistes protsessides (Nunnari ja Suomalainen, 2012). Mitokondrid koopereerivad ka ER-iga, mis omakorda kontrollib kaltsiumi homöostaasi (Naon ja Scorrano, 2014).

Mitokondrites on metaboolsed protsessid jagatud eristuvate alam-kompartimentide vahel nii, et IMM ja OMM omavad iseloomulikke lipiidset ja valgulist koostist ning teostavad erinevaid funktsioone. Lipiidne koostis organellide membraanides on tugevalt reguleeritud. Enamiku membraani fosfolipiidide süntees eukariootides leiab aset ER membraanides ning need lipiidid jagatakse teistele organellidele. Kui organellide vaheline valkude transport on paremini mõistetud, siis lipiidide transport on üsnagi selgusetu. Arvatavasti käituvad just mitokondritega assotsieerunud membraanid (MAM) ER ja mitokondrite vahelise lipiidide transpordi vahendajatena. (Vance, 2014)

### **1.3 Mitokondriaalne DNA ja nukleoidid**

Mitokondritel on oma DNA (mtDNA). Imetajates on mtDNA ~16,6 kb suurune tsirkulaarne kaheaheelaline molekul. Üksikus rakus on mtDNA koopiate arv sõltuvalt rakutüübist sadu kuni tuhandeid (Busch jt, 2014). (Kasamatsu ja Vinograd, 1974; Garcia jt, 2017)

MtDNA molekulid on organiseeritud mtDNA-valkkompleksidesse - nukleoididesse (Spelbrink, 2010), mis assotsieeruvad mitokondri sisemembraaniga (Nass, 1969) (joonis 1).

Mitokondriaalne nukleoid koosneb mtDNA-st ning arvukatest mtDNA/nukleoidiga seotud valkudest, mis moodustavad makromolekulaarse struktuuri mtDNA organiseerimiseks ja segregatsiooniks (Spelbrink, 2010; Gilkerson jt, 2013). Oluline struktuurne erinevus nukleaarse kromatiini ja mitokondriaalse nukleoidi vahel on see, et mtDNA ei ole seotud histoonidega (Kucej ja Butow, 2007), vaid mtDNA pakitakse kompaktselt ja eksklusiivselt TFAM valgu (mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A) poolt. Nukleoidid on laias laastus sfäärilised umbes 100 nm diameetriga ning igäüks neist sisaldab vähemalt ühte mtDNA koopiat (Kühlbrandt, 2015). Tihedalt seotud mtDNA baasil on pakitud välja ka mitokondriaalse nukleoidi organisatsiooni mudel, mis kirjeldab sisemist tuumikregiooni (ingl *core region*), kus lokaliseeruvad mtDNA ja valgud (mtDNA-d pakkivad ning replitseerivad ja transkribeerivad valgud) ning välimine perifeerne regioon, mis sisaldab mtDNA-ga ajutiselt/kaudselt seonduvaid valke (Ambro jt, 2012; Dlaskova jt, 2015). Nende autorite andmete interpretatsiooni järgi leiavad mtDNA transkriptsioon ja replikatsioon aset tuumikregioonis.

Samas on Rajala jt, 2014 näidanud nii mikroskoopia kui biokeemiliste fraktsioneerimiste teel, et esineb vähemalt kaks selgelt eristuvat nukleoidide populatsiooni, mida iseloomustab mtDNA säilitusvalkude esinemine või puudumine (nt Twinkle). Seega on võimalik, et tuumikregiooni ning perifeerse regiooni definitsioon pigem peegeldab Rajala jt, 2014 hiljutisi leide.

Kuigi nukleoididel on oluline teatud määral liikumine näiteks segregatsiooni aspektist või OXPHOS komplekside kotranslatsioonilise assambleerimise (Fontanesi jt, 2006) seisukohast pole teada, kuidas kooskõlastatakse nukleoidide membraaniga seotust ja liikumist.

Nukleoidid, mis on aktiivselt seotud mtDNA sünteesiga, on seotud väikese osa ER-mitokondri kontaktidega, mis viib mitokondrite jagunemiseni (Gerhold jt, 2015; Kühlbrandt, 2015; Lewis jt, 2016). Biokeemiliste fraktsioneerimiste katsetega on seni näidatud vähemalt kahe mitokondriaalse nukleoidi populatsiooni olemasolu (sisemembraaniga seotud vähem lahustuv ning rohkem lahustuv fraktsioon), mis erinevad peamiselt valkude poolest (Rajala jt, 2014; Hensen jt, 2014).

Nukleoididega assotsieerunud valke (mtNAP-id; ingl „*nucleoid-associated-proteins*“) defineeritakse kui valke, mis kas ajutiselt või permanentselt seostuvad otseselt mtDNA-ga või teiste nukleoidi valkudega ning omavad olulist rolli mtDNA säilitamises (Spelbrink, 2010; Hensen jt, 2014). MtDNA transkriptsiooni ja replikatsiooni käigus toimub mitmete nukleoididega seotud valkude kaasamine, mis näitab mitokondriaalsete nukleoidide dünaamilist iseloomu, mistõttu on mtNAP-ide tuvastamine mõnevõrra keerulisem (Iborra jt, 2004).

Peale konserveerunud TFAM ning mtSSB valkude (Wang ja Bogenhagen, 2006; Kang ja Hamasaki, 2005) puudub konsensus, mis puudutab nukleoidi valgulise koostise defineerimist. Näiteks erineb nukleoidi koostis erinevuste tõttu katseks kasutatud rakutüüpides/koetüüpides (Hensen jt, 2014) ja erinevate interaktsioonide esinemise uurimiseks on kasutatud erinevaid biokeemilisi lähenemisi (Rajala jt, 2015).

Mitokondriaalsete nukleoidide valk TFAM on HMG-box domääne sisaldav valk, mis katab mtDNA-d ning vahendab selle tihedat pakkimist nukleoproteiinkompleksidesse nukleoididesse (Kanki jt, 2004; Kaufman jt, 2007). Üheski publitseeritud artiklis, mis on tegelenud nukleoidide väljapuhastamisega, pole näidatud, et TFAM või mtDNA esinevad eraldi. Pigem lokaliseeruvad mtDNA ja TFAM mitokondrites alati koos (vt ülevaadet Hensen jt, 2014), mistõttu võib TFAM'i nimetada kui kõige stabiilsemaks nukleoidi komponendiks.

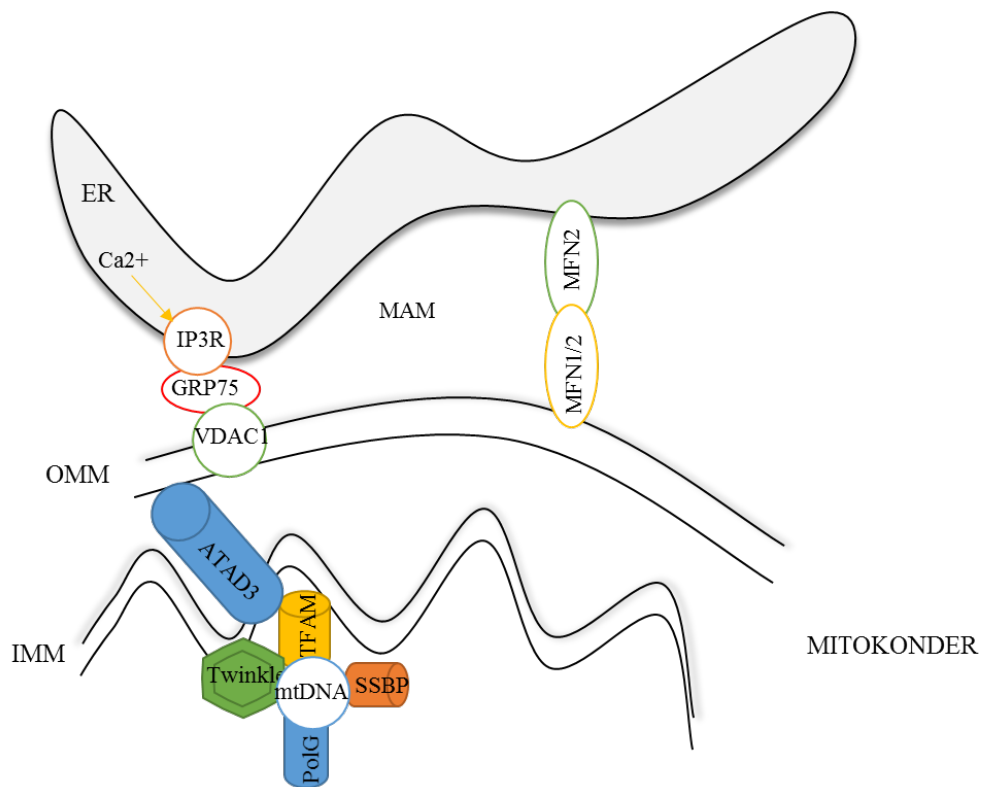
Twinkle on nukleoididega seotud valk, mis on mitokondriaalne helikaas ja võimeline lahti harutama mtDNA-d (Spelbrink jt, 2001). Kui varasemalt arvati, et Twinkle on mtDNA-

nukleoidi konstitutiivne ehk pidev komponent, siis tegelikult on Twinkle seotud ainult umbes 50% nukleoididega (olukord, kus Twinkle esineb stabiilselt (*steady-state*) koos mtDNA molekulidega) (Rajala jt, 2014). Twinkle on tugevasti membraaniga seotud mtDNA nn replikatsiooniplatvormi põhikomponent (Rajala jt, 2014).

ATAD3A ja vähemlevinud ATAD3B on paraloogid, mis moodustavad hetero-homoheksameere ning ulatuvad sisemembraanist välismembraani (Merle jt, Hubstenberger jt, 2010). ATAD3 interakteerub mtDNA D-linguga (He jt, 2007), lisaks moodustab ATAD3 otseseid kontakte mtDNA-ga ning on nukleoididega seotud valk, mis osaleb mitokondriaalsete nukleoidide ja mitokondriaalsete ribosoomide vaheliste ühenduste loomises (Bogenhagen jt, 2008; He jt, 2012).

Mitokondris määratakse nukleoidide asümmeetriline intratsellulaarne jaotumine mitokondriaalse jagunemise ja liitumise poolt, mis kindlustavad mtDNA jaotumise rakus (Iborra jt, 2004). Mitofusiinid (Mfn1 ja Mfn2) on suured dünaamiini-sarnased mitokondriaalsed jagunemisvalgud. Need valgud ankurdatakse mitokondri välismembraanile kahe transmembraanse domääni kaudu. Mitofusiinidel on GTPaasi domään, mis on vajalik GTP hüdrolüüsiks mitokondriaalse jagunemise protsessis (Santel jt, 2003; Santel ja Fuller, 2001). Mfn2 on muuhulgas seotud ka endoplasmaatilise retiikulumiga, olles ER-mitokondri kontaktide üheks moodustajaks (de Brito and Scorrano, 2008).

Kui eeldame seotust mtDNAGA, on nukleoididega assotsieerunud valkude nimekiri pikk. Näib siiski, et nukleoididega assotsieerunud valgud on peamiselt seotud mtDNA metabolismi erinevate etappidega. Samas pole sugugi kindel, kas kõik need on ka püsivalt mtDNAGA seotud, seejuures veelgi olulisem, kas tegu on otseste või kaudsete kontaktidega. Siinkohal vajab veel täpsustamist, kas ka mtDNA segregatsioonis ja mitokondrite dünaamikas olulised valgud, nagu Mfn1 ja Mfn2 ning Opa1 on ka nukleoidi (nukleoididega assotsieerunud valgud ehk mtNAP-id) valgud. Pole teada, et antud valgud oleksid seotud mtDNAGA. Valkude hulk, mis potentsiaalselt võiksid olla mtNAP-id on suur. Seega vajab mtNAP-ide defineerimine ja identifitseerimine uurimist. (Renard, 2012; Hensen jt, 2014; Rajala jt, 2015)



**Joonis 1.** Imetajate nukleoidi organisatsioon ning struktuur, seejuures on näidatud mitokondri sisemembraaniga seotud mtDNA nukleoid ning endoplasmaatiline retiikulum-mitokondri kontaktipunktide moodustumise kohad. Antud joonis illustreerib nukleoidi organisatsiooni imetajates ning nukleoidi organisatsiooni mitokondriaalse dünaamika kontekstis. ER-mitokondrite kontaktid võivad moodustuda Mfn2 vahendusel ER-membraanil ning Mfn1 ja/või Mfn2 vahendusel mitokondri membraanil. IMM-mitokondri sisemembraan, OMM-mitokondri välismembraan, ER-endoplasmaatiline retiikulum, Mfn1/2-mitofusiin 1/2, SSBP-üheahelalist DNA-d seondav valk, TFAM-mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A, POLG-polümeraas  $\gamma$ ; Twinkle-mitokondriaalne helikaas; ATAD3-ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3; VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; GRP75 – 75kDa suurune glükoosi poolt reguleeritud valk; IP3R – inositool-1,4,5-trifosfaat retseptor. Joonis on koostatud Phillips ja Voeltz, 2016; Spelbrink, 2010 artiklite põhjal.

Üks nukleoidi funktsioone on organiseerida mtDNA segregatsiooni dünaamilises mitokondriaalses võrgustikus. Kolesteroolirikas mikrodomään/MAM arvatavasti koordineerib, tihedas kontaktis ER-i ja tsütoskeletiga, mtDNA säilitamist (Spelbrink, 2010; Gerhold jt, 2015) ning mtDNA-valk komplekside jaotumist, ent nukleoidi molekulaarsed detailid vajavad selgitamist (Ishihara jt, 2015). On võimalik, et nukleoidi struktuur ja jaotumine muutuvad kindlate haigusseisundite korral, näiteks neurodegeneratiivsed ja metaboolsed haigused (Schapira, 2012). Nukleoidide põhjalik struktuuri ja segregatsiooni analüüsimine imetajates võiks selgitada siis mitokondriaalse dünaamika poolt kontrollitud patofüsioloogilisi rolle.

## 1.4 Mitokondriaalne dünaamika

Kui mitokondrite bioenergeetilisi funktsioone on uuritud juba aastaid, siis nende organellide dünaamiline iseloom on alles hiljuti võetud intensiivse uurimise alla (Mishra, 2016). Mitokondriaalne dünaamika on mitokondrite liikuva ehk dünaamilise iseloomu uurimine elusrakkudes. Dünaamilise iseloomu/käitumise alla käivad mitokondrite pidev ühinemine ja jagunemine, mis kontrollivad mitokondrite kuju, suurust, arvu ja (biokeemilist) aktiivsust ning nende pärandumist raku jagunemise käigus. Lisaks toimub pidevalt vigaste mitokondrite lagundamine spetsiaalse mehhanismi, mitofaagia, teel. Mitokondrid võivad interakteeruda omavahel ning teiste organellidega, nagu endoplasmaatilise retiikulumiga, millega spetsiifilisi kontaktsaite on hakatud nimetama mitokondritega assotsieerunud membraanideks (MAM). Antud organellidevahelistel kontaktidel on oluline roll mitokondrite jagunemisel, kuna märgivad ära koha, kus saab üldse alguse jagunemine (Friedman jt, 2011).

### 1.4.1 Mitokondrite jagunemine

Mitokondrite jagunemine (ingl *fission*) on kõrgelt konserveerunud protsess, mille käigus moodustuvad ühest mitokondrist uued subühikud mitokondriaalsest võrgustikust. Mitokondrite jagunemist vahendab dünaamiin-seotud valk Drp1 (vt joonis 2), mis on suur GTPaas ning mis ankurdatakse OMM-ile läbi retseptorvalkude (Mff, Fis1, MiD49/50). Mitokondritel assambleerub Drp1 ümber mitokondriaalse tuubuli ning ahendab seda GTP-sõltuval viisil. Hiljutise uuringu baasil pakuti välja uus mudel, mille kohaselt masinavärk, mis lokaliseerub ER-is, suunab aktiini polümeriseerumist, mis seejärel käitub platvormina Drp1 oligomeriseerumisele ja hüdroolüüsile mitokondriaalsetes ahenemissaitides (ingl *constriction sites*). (Prudent ja McBride, 2016)

Kui Drp1 retseptoritel on selge roll kaasamises, siis kuidas valitakse lõikekoht, on vähemõistatud. Arvatakse, et lõikekoht defineeritakse ER membraanide mähkimisega ümber mitokondrite enne Drp1 kaasamist. Enamus eeljagunemistfaktoreid (nii imetaja kui pärmirakkudes) kooslokaliseeruvad ER-mitokondri kontaktsaitides MAM-ides (k.a mtDNA, mis on oluline komponent replitseeruvates nukleoidides, markeerib ära jagunemiskoha ER-mitokondrite kontaktides (Lewis jt, 2016)). Üks ER mehhaaniline panus on aktiinifilamentide moodustamine, mis suunab esialgselt mitokondri membraanide paindumist. Varasemalt on näidatud, et ER-is resideeruv formiin INF2 vahendab aktiini polümeriseerumist, viies müosiin IIa mootori kaasamiseni, mis tõmbab aktiini filamente ja seeläbi suunab mitokondreid ahenema (Korobova jt, 2014; Korobova jt, 2013). Edasised uuringud on aina suurendanud aktiini rolli mitokondrite jagunemises näidates, et mitokondrite ankurdatud Spire1C seondub INF1-le ning

soodustab aktiini assambleerumist ja jagunemist (Manor jt, 2015). Lisaks eelpool mainitud valkudele on täheldatud kahe aktiini siduva valgu-kofiliini ning kortaktiini rolli aktiini vahendatud mitokondrite jagunemises. Üha suurenev faktorite arv on teinud täpse assambleerumise ning ahenemise mehhanismi mõistmise üsna keeruliseks.

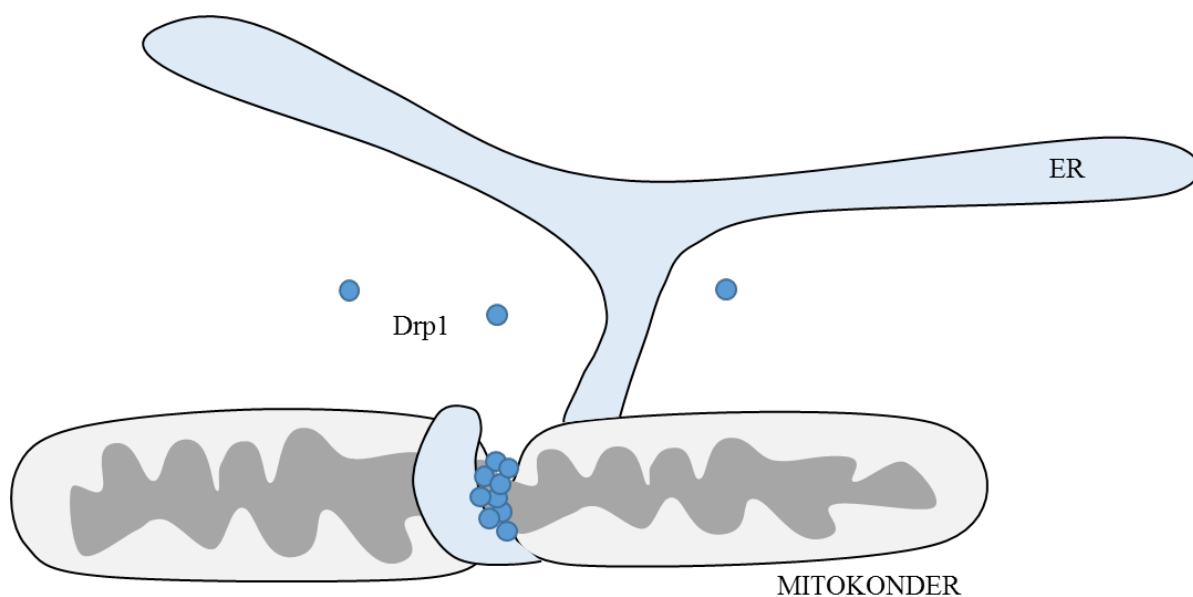
On pakutud välja, et Drp1 dimeerne ning oligomeerne vorm on pidevas tasakaalus mitokondrite ja tsütosooli vahel. Peale seni tundmata jagunemissignaali sulanduvad mitokondritega seotud punktid (Drp1 dimeersed ja oligomeersed erineva suurusega punktid) küpsesse Drp1 kompleksi, mis on võimeline lateraalselt liikuma mööda mitokondriaalset tuubulit. ER kontaktsaidid, kus on aset leidnud aktiini polümeriseerumine, võimendavad Drp1 küpsemist ning konversiooni oligomeersesse vormi. Hetkel on selge, et ainult väga vähesed Drp1 fookused/kohad viivad mitokondriaalse jagunemiseni. Neid kontakte, kus lõikamist ei toimu peetakse siiski samuti olulisteks, sest neil võib olla funktsionaalne roll ER ja mitokondrite vahelise metaboliitide voolu stabiliseerimises. (Ji jt, 2015)

Hästi tuntud jagunemise reguloorne mehhanism on seotud Drp1 fosforüleerimisega. Seni on identifitseeritud mitmeid fosforüleerimise saite ning kinaase. Fosforüleerimine võib seejuures kas aktiveerida või inhibeerida Drp1, ja seda kas otseselt või kaudselt (näiteks retseptorvalgu Mff fosforüleerimine AMP kinaasi poolt (Ducommun jt, 2015; Toyoma jt, 2016)). Drp1 regulatsioon on väga kompleksne (lisaks Drp1 tasemel reguleeritakse Drp1 retseptorvalke) ning identifitseeritud on mitmeid muid Drp1 post-translatsioonilisi modifikatsioone (näiteks S-nitrosüleerimine, SUMOüleerimine ja atsetüleerimine). On näidatud, et mitokondrite jagunemise defektid (kuid mitte fuseerumise defektid) põhjustavad muuhulgas muutunud nukleoidi struktuuri koekultuurirakkudes (Drp1 defektsetes rakkudes on nukleoidid agregeerunud), kuid selle funktsionaalne olulisus on ebaselge (Ban-Ishihara jt, 2013).

Praegu on jagunemise mehhanismid lõpuni selgitamata. Pole veel teada, kuidas oligomeriseerunud Drp1 laguneb peale lõikamist. Drp1 on lisaks kõigele ka tugevalt post-translatsiooniliselt modifitseeritud (alates fosforüleerimisest kuni SUMOüleerimiseni). (Elgass jt, 2013; Vincent jt, 2016)

Mitokondrite jagunemine on kriitiline protsess raku (ja terve organismi) normaalses füsioloogias. Peale morfoloogia mõjutamise on jagunemisel mitmeid muid funktsioone, k.a mitokondriaalse transpordi lihtsustamine, mitofaagia ning apoptoos. Kliinilistes uuringutes on inimestel kirjeldatud Drp1 muteerumisega näiteks mikrotsefaalia, neonataalne letaalsus (Waterham jt, 2007), refraktoorne epilepsia (Vanstone jt, 2015) ning neuromuskulaarse

düsfunksiooniga arenguhäiret on seostatud Drp1 retseptorvalgu Mff muteerumisega (Shamseldin jt, 2012).

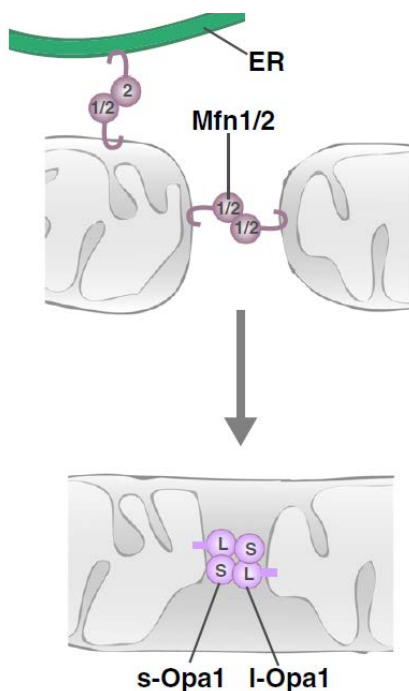


**Joonis 2.** Lihtsustatud skeem ER seotud mitokondrite ahenemisest. Kõigepealt ER tuubulid mähitakse ümber mitokondrite. Antud kohtades väheneb mitokondrite diameeter, see võimaldab seejärel GTPaasi DRP1 (ingl *dynamain-related protein*) oligomeeride assambleerumist, mis suunavad mitokondrite jagunemist mehhanokeemiliselt (GTP hüdrolüüs). (Modifitseeritud Westermann, 2011; Phillips ja Voeltz, 2016)

#### 1.4.2 Mitokondrite ühinemine

Mitokondriaalne fusioon (ingl *fusion*) on evolutsiooniliselt konserveerunud protsess, mis lihtsustatuna tähendab kahe organelli subühikute ühinemist. Imetajates on fusioon vahendatud dünamiini superperekonna kolme suure GTPaasi poolt: mitofusiin 1 (Mfn1), mitofusiin 2 (Mfn2) ning optiline atroofia 1 (Opa1) (vt joonis 3). Kuna mitokondrid on kahe membraaniga (OMM – välismembraan; IMM – sisemembraan), on fuseerumise protsess samuti kaheetapiline. Mfn1 ja Mfn2 on integraalsed OMM valgud, mis vahendavad OMM fuseerumist, OPA1 valgul on mitmeid isovorme, mis on seotud IMM-iga ning vahendavad selle fuseerumist. Kuna tasakaal ühinemise ja jagunemise vahel kontrollib mitokondriaalset morfoloogiat, põhjustab näiteks fuseerumise geenide deleteerimine tõsist mitokondriaalse võrgustiku fragmenteerumist ning takistab transporti mitokondrite vahel (Hermann jt, 1998; Chen jt, 2003; Chen jt, 2005). Tähelepanuväärselt on OPA1 vajalik ka mtDNA molekulide jaotumiseks nukleoidides ning nukleoidide segregatsiooniks mitokondriaalses võrgustikus (Elachouri jt, 2011; Yang jt, 2015), kuna protsessitud OPA1 seostub otseselt mitokondriaalsete nukleoididega (Elachouri jt, 2011). Inimesel põhjustavad mutatsioonid *Mfn2* geenis tüüp 2A Charcot–Marie–

Tooth haigust - perifeerset neuropaatiat, mis mõjutab pikki motoneuroneid ja sensoorseid neuroneid (Züchner jt, 2004). Mutatsioonid *Opa1* geenis põhjustavad dominantset optilist atroofiat, mis on reetina ganglionirakkude degenerereerumise põhjustatud nägemiskadu (Alexander jt, 2000; Delettre jt, 2000; Delettre jt, 2002). Fuseerumisprotsess on oluline OXPHOS aktiivsuseks ja seda eriti läbi mtDNA taseme reguleerimise (Mishra jt, 2014).



**Joonis 3.** Mitokondriaalse ühinemise molekulaarne mudel. Mitokondrite ühinemisel toimub välis- ja sisemembraani ühinemine arvatavasti kahes staadiumis. Esmalt OMM fuseerumine on vahendatud Mfn1/Mfn2 poolt. Kuna Mfn2 lokaliseerub lisaks ka ER-il ning osaleb ER-mitokondri kontaktide moodustumisel, on ER-mitokondri kontaktidel otsene ja/või reguleeriv roll mitokondrite ühinemisel. Järgnevalt toimub IMM fuseerumine, mis on vahendatud OPA1 valgu poolt. Protsessimata Opa1 (pikk Opa1; L) vormid on piisavad, et vahendada mitokondrite ühinemist, samas protsessitud vorm (lühike Opa1; S) korreleerub mitokondrite fragmenteerumisega ja võib omada rolli hoopis jagunemises. Arvatavasti aga on Opa1 lokalisatsioon ja olemasolu vajalik mitokondri jagunemise ja ühinemise tasakaalustamiseks. (Lackner, 2014)

### 1.4.3 Mitofaagia

Üleüldine mitokondri mass rakus on reguleeritud mitokondrite biogeneesi ning degradatsiooni kaudu, mis on omavahel tasakaalus (Mishra ja Chan, 2016). Mitofaagia on mitokondrite lagundamine raku degradatsioonisüsteemi - autofaagia raja kaudu. (Mishra ja Chan, 2016). Mitofaagiat on seni eelkõige uuritud rakukultuuris *in vitro*, mistõttu mitofaagia protsessi olulisus ja mehhanism *in vivo* vajab veel selgitamist (Mishra, 2016). Kõige paremini uuritud



mitofaagia rada on seotud *Pink1* ja *Parkin* geenidega. Mutatsioonid *Pink1* ja *Parkin* geenides põhjustavad Parkinsoni tõbe (Kitada jt, 1998; Valente jt, 2004). Sellega seoses arvatakse, et potentsiaalne Parkinsoni tõve vallandaja (ingl *trigger factor*) on just kahjustunud mitokondrite kuhjumine neuronites (Bender jt, 2006).

*Pink1* on mitokondris lokaliseeruv kinaas, mis normaalselt transporditakse ja degradeeritakse organellis endas. Kuna valgu import on sõltuv mitokondriaalsest membraanipotentsiaalst, põhjustab depolarisatsioon *Pink1* akumulereerumist OMM-il (Matsuda jt, 2010; Narendra jt, 2010). Akumuleerunud *Pink1* fosforüleerib arvukalt valke, k.a ubikvitiini, et kaasata ja aktiveerida E3 ligaas *Parkin* (Okatsu jt, 2015). Aktiveeritud *Parkin* põhjustab ulatuslikku OMM valkude ubikvitineerimist, mille degradeerimine 26S proteasoomi poolt (Chan jt, 2011; Sarraf jt, 2013) on vajalik mitokondri suunamiseks autofaagiliste membraanideni. *Pink1* depolariseerunud mitokondritel fosforüleerib ka *Mfn2*, mis omakorda seob *Parkin* soodustamaks mitofaagiat. On teada, et *Parkin* ubikvitineerimissubstraadiks on muuhulgas ka *Mfn2*, lisaks *Mfn2* puudumisel on häiritud *Pink1*-*Parkin* rada, mis on oluline mitofaagia kvaliteedikontroll. Seega käitub *Mfn2* kui *Parkin* mitokondriaalne retseptor. (Chen jt, 2013)

Häiretel *Parkin* seondumisel võib olla oluline seos pärilike neuropaatiate korral, mis on geneetiliselt seotud just *Mfn2* mutatsioonidega ning mida iseloomustab ebanormaalsete mitokondrite hulga suurenemine (Baloh jt, 2007).

## 1.5 ER-mitokonder kontakt – MAM

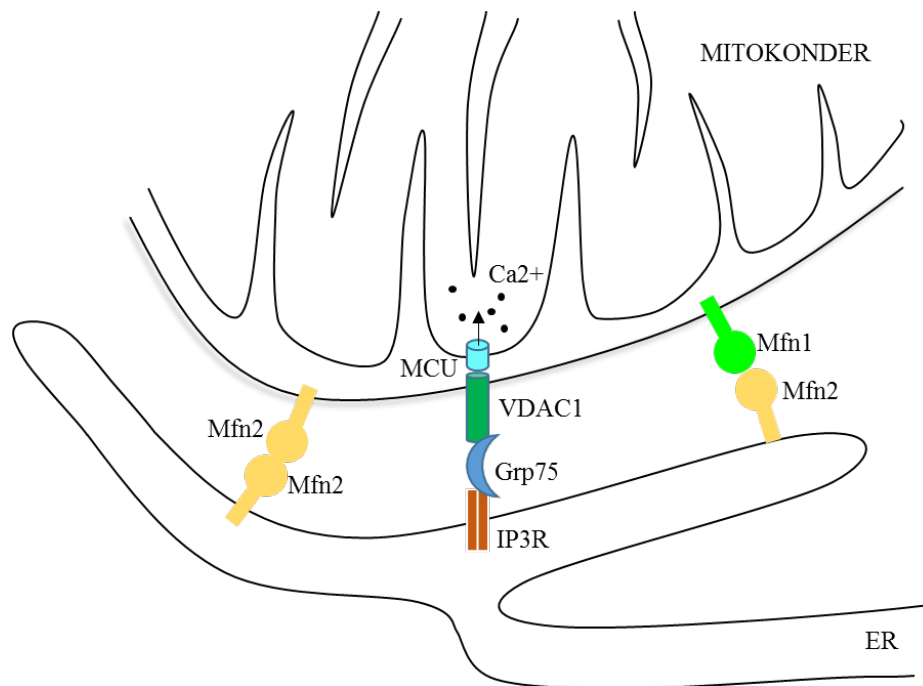
Mitokondritega assotsieerunud ER membraanid (MAM) on endoplasmaatilise retiikulumi alamdomään, mis moodustab kontakti mitokondri membraaniga. MAM-idel on eripärane proteoom ja spetsiifilised kontaktid tsütosooliga ning ER luumeni reguleerivate valkudega (Raturi ja Simmen, 2013). MAM struktuuridel on omalaadsed biokeemilised omadused ning funktsioonid. MAM funktsioonid varieeruvad alates lipiidide metabolismist ja kaltsiumi signaliseerimisest kuni inflamosoomi moodustumiseni. Nende funktsioonidega kooskõlas on MAM rikastunud lipiidide metabolismi ensüümidega ning kaltsiumi käsitlemisega seotud valkudega. Raku stressitingimustes (nt muutunud redoksolek) muutub MAM reguleerivate valkude koosseis ja seetõttu ka funktsioonid. Prominentselt koosneb see valkude kompleks ER šaperonidest ning oksidoreduktaasidest, mis ühendavad omavahel valgusünteesi ja voltumise ER-is mitokondriaalse metabolismiga. Mitokondritega seotud ER membraanid mahutavad ka neid masinavärgi osi, mis määravad mitokondri membraani dünaamikat ning ühendavad mitokondreid tsütoskeletile. (Hayashi jt, 2009; Raturi ja Simmen, 2013; Vance, 2014)

Lisaks sellele on arvatud, et MAM moduleerib glükoosi homöostaasi ning insuliini resistentsust (Sebastian jt, 2012; Vance, 2014), aga ka mõningaid viirusinfektsioone (Horner jt, 2011).

Praeguseks on imetajates tuvastatud kaks ER-mitokonder kontaktide (MAM-ide) moodustumise mehhanismi. Üks MAM ühendusi on IP3R-Grp75-VDAC1 kompleks (vt joonis 4), mis ühendab ER läbi IP3R ja edasi VDAC1 mitokondritega (Szabadkai jt, 2006). IP3R ja VDAC1 esinevad vastavalt mitokondriaalsetel membraanidel ning ER membraanidel on need kõrgelt rikastunud MAM-ides ning ühendatud füüsiliselt Grp75 kaudu (Behrends jt, 2010). IP3R ning VDAC1 on seotud MAM-idega ja on tsentraalsed ER-mitokonder kaltsiumi transpordi komponendid (Gincel jt, 2001; Rapizzi jt, 2002). Lisaks liigutab VDAC1 metaboliite nagu ATP mitokondritest välja (Vendelin jt, 2004).

MAM-ide tekke ja funktsioneerimise regulatsioon läbi IP3R-Grp75-VDAC1 ühenduse on seotud ka mTOR (ingl *mammalian target of rapamycin*) signaalsüsteemirajaga. mTOR on seriin/treoniin valgukinaas, mis koosneb kahest kompleksist – mTORC1 ja mTORC2. mTORC2 kompleks koosneb mTOR, rictor, SIN1 ning mLST8 valkudest. mTORC2 substraat on Akt1 kinaas, mis reguleerib mitmeid rakulisi protsesse, muuhulgas paikneb mTORC2 ka MAM-idel, kus Akt1 kinaasi kaudu kontrollitakse ka VDAC1, Grp75 ja IP3R fosforüleerimist. Sellega kontrollitakse MAM teket, Ca<sup>2+</sup> omastamist, mitokondriaalset bioenergeetikat ja muud. MAM-idel on mTORC2 kompleksis VDAC1-ga, mis on oluline mitokondriaalse ATP väljumiskanal, mis veelgi näitab, et MAM on oluline mTORC2 aktiivsuseks. (Betz jt, 2013; Betz ja Hall, 2013)

Teine võimalik MAM ühendus ER ja mitokondrite vahel identifitseeriti 2008. Mitofusiin 2 (Mfn 2) võib moodustada homodimeere, aga ka heterodimeere Mfn1-ga ühendamaks ER ja mitokondrit (de Brito ja Scorrano, 2008) (vt joonis 4). Ka mitofusiinide vahendatud MAM ühendus on seotud veel teadmata viisil mTORC2 kompleksi signaalseerimisega, kuna on leitud, et maksaspetsiifilise Mfn2 *knockout* (Sebastián jt, 2012) põhjustab väga sarnast fenotüüpi maksaspetsiifilise rictor *knockout*-iga (Hagiwara jt, 2012).



**Joonis 4.** MAM ühendused (a) MFN1/2-MFN2 ning (b) IP<sub>3</sub>R-Grp75-VDAC1, mis moodustavad silla mitokondri välismembraani ning ER membraani vahel. (a) GTPaas Mfn2 ER-il moodustab homo- või heterodimeere Mfn1 või Mfn2-ga mitokondril ning hoiab organelle tihedas kontaktis. (b) Mitokondri välismembraanis paikneb VDAC1 ning ER membraanis IP<sub>3</sub>R. Antud ühendused on olulised ER ja mitokondri vahelise kaltsiumi transpordi regulatsioonis. Näiteks ER vabanenud Ca<sup>2+</sup> liigub läbi VDAC1 kanalite mitokondri välismembraanis mitokondri maatriksisse. 75kDa suurune GRP valk funktsioneerib šaperonvalguna, ühendades IP<sub>3</sub>R VDAC1-ga. Mfn1/2 – mitofusiin 1/2; MCU – mitokondriaalne Ca<sup>2+</sup> - uniporter; VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1 (poriin); GRP75 – 75kDa suurune glükoosi poolt reguleeritud valk; IP<sub>3</sub>R – inositol-1,4,5-trifosfaat retseptor; ER - endoplasmaatiline retiikulum. (Modifitseeritud de Brito ja Scorrano, 2010; Phillips ja Voeltz, 2016)

Praeguseks on teada, et ER-mitokondri kontaktsait on vajalik intratsellulaarseks signaaliseerimise ja transpordi platvormiks. On teada, kuidas mõjutavad MAM mitokondrite dünaamikat, aga vähe on uuritud MAM-ide mõju mitokondriaalsetele nukleoididele ja nende jaotumisele dünaamilises mitokondriaalses võrgustikus (Lewis jt, 2016; Gerhold jt, 2015). Tulevaste katsete käigus on oluline näidata, kuidas kindlakstehtud mehhanismid teineteist mõjutavad, st kuidas mõjutavad mitokondriaalsed nukleoidid MAM-struktuure ning MAM-struktuurid nukleoidide.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärk

Imetajate mitokondrid on dünaamilised organellid, mis moodustavad rakus omalaadse võrgustiku. Mitokondrid moodustavad kontakte ER-iga spetsiaalsetes domäänides, mida nimetatakse MAM-ideks. MAM struktuurid on olulised mitokondriaalse võrgustiku ja seejuures ka mtDNA säilitamises. (Vance, 2014)

Käesoleva töö eesmärkideks oli uurida a) nukleoidide muutuste mõju MAM-struktuuridele ja b) MAM-struktuuride muutuste mõju nukleoididele.

Ülesanneteks oli:

- 1) Uurida mtDNA helikaasi Twinkle-i ja DNA-d siduva valgu TFAM-i kadu jälgides potentsiaalseid muutuseid MAM-markervalkudele (Mfn2, VDAC1, FAACL4).
- 2) Uurida struktuurse funktsiooniga ning mtDNA metabolismiga seotud valgu ATAD3 efekti MAM-struktuuridele.
- 3) Uurida MAM-moodustumises olulise valgu Mfn2-e potentsiaalset mõju nukleoididele.

### 2.2 Materjal ja meetodika

Käesolevas töös kasutatud lahuste retseptid on toodud ära Lisa 1-s.

#### 2.2.1 Rakuliin ja meedium

Antud uurimistöös kasutati HEK293e (Human Embryonic Kidney Cells) rakuliini. Tegu pole tüüpiliste neerurakkudega. Antud rakuliin sarnaneb rohkem neuronaalsete rakkudega, mistõttu on antud liin sobiv käesolevateks eksperimentideks (Shaw jt, 2002). Rakke kasvatati L-glutamiini, Na-püruvaadiga ning kõrge glükoosiga DMEM söötmes (Lonza) ilma antibiootikumideta, kuhu täiendavalt lisati 10% FBS (Capricorn). Kasvutingumused olid 5% CO<sub>2</sub> ja 37 °C.

ATAD3B üleskpresseerimiseks kasutati T-Rex-293-ATAD3B (Dr Helen M Cooper ja Louis van Enkevort) rakuliini, mida kasvatati selektiivmeediumis, mis sisaldas 100 µg/ml hügroümüsiin B ning 15 µg/ml blastitsidiin S (InvivoGen). Rakke töödeldi trüpsiiniga ning külvati 24h enne induktsiooni antibiootikumideta DMEM söötmesse, misjärel indutseeriti 10 ng/ml doksütsükliiniga 72h. Kasvutingumused olid samuti 5% CO<sub>2</sub> ja 37 °C.

### 2.2.2 RNA interferents

Mitokondriaalse dünaamika ja nukleoidi spetsiifiliste valkude puudumise efekti uurimiseks kasutati RNA interferentsi siRNA-dega.

Käesolevas töös rakendati HEK293e transfekteeerimiseks Dharmacon (GE Healthcare Dharmacon Inc) süsteemi tootjapoolsete juhistega. Töös kasutatud siRNA-d on toodud ära Lisa 2-s. Rakkude transfektsiooni tingimuste optimeerimise järgselt kasutati iga konkreetse valgu geeniekspressiooni mahasurumiseks kindlaid tingimusi.

Rakud külvati katsele eelneval päeval sobiva lahjendusega 10 cm tassile, seejärel suspendeeriti siRNA (GE Healthcare Dharmacon Inc) ning transfektsiooni reagent DharmaFECT1 (GE Healthcare Dharmacon Inc) seerumivabas DMEM söötmes. Peale inkubeerimist 5 minutit toatemperatuuril tõsteti segu ühte tuubi kokku ning inkubeeriti 20 minutit toatemperatuuril. Transfektsiooni alustamiseks tilgutati 2 ml transfektsiooni segu tassile ning jäeti 24h inkubaatorisse. Rakud analüüsiti 48h või 72h peale transfektsiooni algust.

### 2.2.3 Mitokondrite eraldamine ja lüüsimine

Mitokondrite eraldamine teostati modifitseeritud Rajala jt, 2014 publitseeritud protokoll järgi. Rakud koguti koekultuuri tassidelt, tsentrifuugiti põhja ja pesti seejärel 1X PBS-iga (vt Lisa 1). Rakkudele lisati 0.1X homogeniseerimispuhver (vt Lisa 1) 2,5 mM PMSF-iga (AppliChem BioChemica), seejärel, kasutades Elvehjem homogenisaatorit, purustati rakud 20 vajutusega. Suspensiooni tsentrifuugiti 5 min 1200g. Supernatant tõsteti uude tuubi ja tsentrifuugiti samade parameetritega. Mitokondrid tsentrifuugiti põhja 10 min 14 000g juures, eemaldati supernatant ning suspendeeriti külmas 1X PBS-is. Totaalse valgu kontsentratsioon tehti kindlaks Bradford meetodiga (Thermo Scientific™ Coomassie (Bradford) Assay Kit).

100 µg mitokondriaalsele valgule vastav maht mitokondreid võeti lüüsiks ning mittelüüsitud kontrolliks (nn *washed mitochondria*). Välismembraani lüüsimiseks kasutati digitoniini (mg valk/mg digitoniin). Kuna iga digitoniini preparaati on erinev, on esmalt oluline titreerida detergendi hulk valgu kohta (mg digitoniin/mg valk) jälgides mitokondrite eri kompartmentide markervalkude esinemist erinevatel detergendi kontsentratsioonidel. Kõik digitoniiniga lüüsimised teostati 10 minutit jääs, sellele järgnes tsentrifuugimine (Eppendorf 5430 R) 10 minutit 14 000g. Pellet ja supernatant eraldati, segati 10% SDS-iga, inkubeeriti 30 minutit ning fraktsioone analüüsiti Western ning Southern blot meetoditega.

#### 2.2.4 Jodiksanooli gradiendid

Metsiktüüpi, *knockdown* ning ATAD3B üleekspresseerivate rakkude mitokondriaalsete nukleoidide terviklikkuse ja koostise uurimiseks kasutati jodiksanooli gradienti (Rajala jt, 2014). Peale mitokondrite eraldamist rakkudest ja sellele järgnevat valgu kontsentratsiooni määramist lüüsi 1 mg valku suhtes 1:2 digitoniiniga (mg mitokondriaalne valk/mg digitoniin). Lüüsimine teostati 10 minutit jääl, seejärel tsentrifugiti lüsaate 10 minutit 14 000g juures. Pellet ja supernatant eraldati ning suspendeeriti 1X TN (vt Lisa 1) puhvrts, mis sisaldas 1% Triton X-100. Proovidele lisati juurde külm Optiprep™ (Axis-Shield PoC AS), tõsteti SW55 ultratsentrifuugi tuubide põhja ning peale formeeriti erinevate jodiksanooli kontsentratsioonidega tihedusgradient (40%-0%). Gradiende tsentrifugiti 100 000g juures 14h (Beckman Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge). Seejärel koguti fraktsioonid 400 µl kaupa ning analüüsiiti Western ning Southern blot meetoditega.

#### 2.2.5 Western blot ja Southern blot

Valkude analüüsimiseks kasutati immuunoblottimist. Valgud lahutati SDS-PAGE (naatrium dodetsüülsulfaat-poliakrüülamiid geelelektroforeesiga) (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell). Geelilt kanti valgud nitrotselluloos membraanile (GE Healthcare Amersham™ Protran™ 0,45 µm) (*wet transfer*). Membraanid blokeeriti 5% rasvavaba piimalahusega ja pesti 1X TBST-ga (vt Lisa 1). Membraane kasutati immuunoblottimiseks. Töös kasutatud antikehad on toodud Lisa 2-s.

MtDNA analüüsimiseks kasutati Southern blot meetodit radioaktiivse hübriidatsiooniga. MtDNA proovid lahjendati 20 korda 2X SSC puhvrtsiga (vt Lisa 1), keedeti 95°C juures 15 minutit (Biosan Thermo Block TDB-120) ning jahutati jääl. Proovid kanti nailonmembraanile (GE Healthcare Amersham Hybond™-N<sup>+</sup>) dot blotteriga (Bio-Rad Bio-Dot®), augud pesti 2X SSC-ga ning viimaks membraan ristseoti UV-ga 120 mJ/cm<sup>2</sup> (Herolab UV Crosslinker). Membraan eelhübriidiseeriti Church puhvrtsiga (vt Lisa 1) 15 minutit 65°C (Techne Roller-Blot Hybridizer HB-3D). Radioaktiivne mäрге sünteesiti PCR meetodiga (vt Tabel 1).

**Tabel 1.** Radioaktiivse hübridisatsiooni läbiviimiseks kasutatava märke sünteesimine PCR-iga.

<b>Komponent</b>	<b>Kogus</b>
10X PCR puhver	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
2 mM dNTP-dCTP	2 µl
1X cytb fov	1 µl
1X cytb rev	1 µl
Taq DNA pol	0,3 µl
<sup>α</sup> P-dCTP	3 µl
<i>CYTB</i> matriits	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	7,7 µl

Märge sadestati isopropanooliga ning lisati otse hübridisatsioonipuhvrise. Membraani hübridiseeriti 65°C 3h, pesti Chrch wash puhvriga (vt Lisa 1) 2 korda ning membraan jäeti fosforekraani vahele eksponeerima 12h (GE Healthcare Amersham Biosciences). Pildistamiseks kasutati Typhoon Phosphorimager masinat ning blotte analüüsiti kasutades programmi ImageQuant TL v2005.

## 2.3 Tulemused ja arutelu

Mitokondriaalsed DNA-valk kompleksid on assotsieeritud mitokondri sisemembraaniga. Üks nukleoidi funktsioone on organiseerida mtDNA segregatsiooni dünaamilises mitokondriaalses võrgustikus. Kolesteroolirikas mikrodomään arvatavasti koordineerib tihedas kontaktis ER-iga (MAM-iga) ja tsütoskeletiga mtDNA säilitamist (Spelbrink, 2010; Gerhold jt, 2015) ning mtDNA-valk komplekside jaotumist.

MtDNA säilitamine nukleoidides on kooskõlastatud mitokondriaalse replikatsiooni ja transkriptsiooni poolt. Lähtudes andmetest, mis viitavad sellele, et mtDNA replikatsioon sõltub nukleoidide lokaliseerimisest ER-mitokondri kontaktide vahetus läheduses, uuriti käesolevas töös nukleoidide koosseisu ning MAM-markervalkude muutuseid erinevate võtmevalkude – Twinkle, TFAM, Mfn2, ATAD3 manipuleerimisel *in vitro*. Käesolevas töös teostatud katsed on representatiivsed vähemalt kolmest kordusest.

### 2.3.1 Twinkle kadu ei põhjusta MAM-struktuuridele muutuseid

Nägemaks, mis toimub mitokondriaalsete nukleoidide struktuuriga MAM tekkes ning mtDNA säilitamises oluliste valkude vähenemisel, kasutati käesolevas töös RNAi meetodit (siRNA vahendatud interferentsi). Varasemalt on leitud, et Twinkle helikaasi konditsionaalne *knockout* hiires (skeleti- ja südamelihase spetsiifilised KO-d) põhjustab mtDNA depletsiooni, samas Twinkle üleekspressioon transgeensetes hiirtes suurendab mtDNA koopiaarvu (Milenkovic jt, 2013). Mitmed haigust põhjustavad mutatsioonid, k.a autosomaalne progressiivne eksternaalne oftalmopleegia (PEO), on kaardistatud Twinkle geenile (Suomalainen jt, 1997; Rajala jt, 2014). Twinkle helikaas soodustab lisaks ka nukleoidi kinnitumist membraanstruktuuridele, mis sisaldavad kõrges kontsentratsioonis kolesterooli, moodustades sellega ER-mitokondri ühenduste läheduses nn replikatsiooniplatvormi (Rajala jt, 2014; Gerhold jt, 2015).

Twinkle mõju uurimiseks transfekteeriti rakkudesse C10orf2-spetsiifiline siRNA ning inkubeeriti vastavalt kas 48h või 72h, saavutamaks sel viisil valkude tasemete vähenemise, samal ajal vältides mtDNA depletsiooni. Sellele järgnevalt eraldati nii kontroll kui *knockdown* rakkudest mitokondrid, mida kasutati analüüsimiseks. Esmalt teostati mitokondrite lüüsimine mitteioonse detergendiga digitoniiniga, kuna eelnevalt on kasutatud digitoniini mitokondrite väljapuhastamiseks, mitoplastide eraldamiseks (madalas kontsentratsioonis), OXPHOS komplekside eraldamiseks (väga kõrges kontsentratsioonis) (Rice ja Lindsay, 1997) ning lisaks ka mitokondriaalsete nukleoidide väljapuhastamiseks (Rajala jt, 2014; Gerhold jt, 2015). Madalate digitoniini kontsentratsioonide juures lüüsub eelkõige mitokondri välismembraan,



aga suuremate kontsentratsioonide juures hakkab ka sisemembraan lüüsuma ning vabanevad membraani- ja maatriksivalgud. Mitokondrite subfraksioneerimise testimiseks teostati digitoniini titreerimine valgu suhtes, kasutades erinevaid digitoniini kontsentratsioone (vt „Materjal ja meetodika“; Rajala jt, 2014).

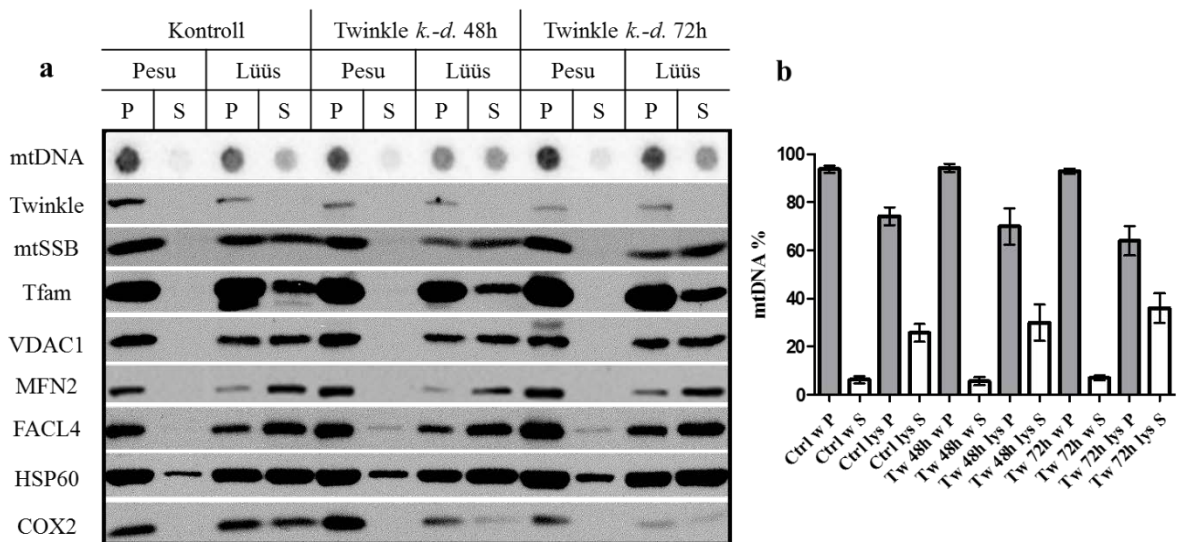
Mitokondrid lüüsi ja pesti jääl 10 min ning seejärel eraldati tsentrifuugimisega pellet ja supernatant. Pelleti ja supernatandi mtDNA jaotuvuse määramiseks ning valkude detekteerimiseks kasutati vastavalt Southern blot ja Western blot analüüsi. Lüüsimise hindamiseks määrati sisemembraani markervalgu COXII ning maatriksivalgu HSP60 esinemine pelletis ja supernatandis. Hinnati nukleoidi valkude Twinkle, mtSSB, TFAM ning MAM markervalgude – FAFL4 (ER), Mfn2 (OMM) ning VDACC1 (OMM) esinemist või puudumist. Iga lüüsitud proovi kõrvale on pandud mittelüüsitud, kuid sama kaua 1X PBS-is inkubeeritud mitokondrid kontrollimaks kas ja mis ulatuses on toimunud mitokondrite autolüüs.

Lähtudes hüpoteesist, et replikatiivsed nukleoidid kinnituvad sisemembraanis olevale mikrodomäänile ER-mitokondri kontaktsaitide läheduses (Gerhold jt, 2015; Lewis jt, 2016) sooviti uurida, kas Twinkle vähenemine, tingimustel, kus mtDNA ei ole veel kadunud, mõjutab MAM-struktuure.

Joonisel 5a on näha, et Twinkle mahasurumisel 48h ja 72h möödudes toimub Twinkle valgu signaali nõrgenemine. Lisaks hakkab mitokondri sisemembraani markervalgu COXII signaal vähenema. Twinkle vähenemisel toimub 48h ja 72h pärast mtSSB signaali nõrgenemine lüüsimisel pellet fraktsioonis võrreldes kontrolliga, kus lüüsimisel digitoniiniga jääb mtSSB enam pellet fraktsiooni.

MAM markeri FAFL4 signaal kontrollide ning Twinkle *knockdown*-ide puhul ei muutu. Mfn2 signaal 48h ja 72h *knockdown* korral jääb muutumatuks. Mitokondri välismembraani valgu VDACC1 signaalid jäävad kontrollidel ja *knockdown*-idel sarnaseks. (joonis 5a)

Joonisel 5b on näha, et kontrollrakkude lüüsimisel digitoniiniga jaotub mtDNA ~25% supernatandis („Ctrl lys S“) ja ~75% pellet fraktsioonis („Ctrl lys P“). Varasemalt on Rajala jt näidanud, et digitoniiniga lüüsimisel on mtDNA lahutuvus metsiktüüpi HEK rakkudes vastavalt ~70% pellet fraktsioonis ning ~30% supernatandi fraktsioonis (Rajala jt, 2014). Võrreldes kontrollidega on Twinkle *knockdown* puhul näha, et rakkude töötlemisel digitoniiniga väheneb mtDNA pellet fraktsioonis („Tw lys P“) ja suureneb supernatandi fraktsioonis („Tw lys S“), kuid tendents ei ole statistiliselt oluline.



**Joonis 5. Twinkle mahasurumine RNAi meetodil.** (a) Käesolev joonis illustreerib Western blot detektsioone ja on representatiivne tulemus neljast kordusest. Replikatsioonioluline mtSSB ei säili digitoniiniga lüüsimisel pellet fraktsioonis. mtDNA kodeeritud COXII signaalid nõrgenevad peale 48h ja 72h *knockdown*'i. Samas on näha, et MAM (marker)valkude tase ja jaotus pellet ning supernatandi fraktsioonide vahel jääb konstantseks, mis tähendab, et MAM struktuurid on endiselt stabiilsed. Iga lüüsitud proovi kõrvale on pandud mittelüüsitud, kuid sama kaua 1X PBS-is inkubeeritud mitokondrid. Geelile laetud proovide totaalne valgu sisaldus P+S on Bradford (vt Materjal ja meetodika) meetodi kohaselt samasugune. (b) mtDNA protsentuaalne lahutuvus Twinkle mahasurumisel. *Knockdown* korral on näha tendents, et mtDNA liigub lüüsitud proovide („lys P“ ja „lys S“) korral rohkem pelletist lahustuvasse fraktsiooni (supernatanti), võrreldes kontrollidega. Näidatud on mtDNA kvantifitseeritud andmed peale mtDNA detekteerimist Southern blot meetodil. Seejuures on toodud ära iga analüüsi puhul keskmine standardviga (SEM). Analüüs on tehtud 4 korduse baasil. mtDNA – mitokondriaalne DNA; mtSSB – mitokondriaalne üheaheelist DNA-d siduv valk; TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A; VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; MFN2 – mitofusiin 2; FACL4 – pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4; HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa; COXII – tsütokroom c oksüdaas subühik II. Tw – Twinkle; Ctrl – kontroll; P – pellet; S – supernatant; pesu – 1X PBS-iga pestud mitokondrid, mis on kontroll, et lüüsimiseks kasutatud mitokondrid on terved; lüüs – digitoniiniga lüüsitud mitokondrid; *k.-d.* – *knockdown* 48 tundi ja 72 tundi.

Antud tulemustest võib järeldada, et Twinkle kaotamisel esineb tendents mtDNA lahutuvuse osas, kus digitoniiniga lüüsimisel hakkab mtDNA vähenema pellet fraktsioonis ja suurenema seeläbi supernatandi fraktsioonis. Seega ei hoita mtDNA-d pellet fraktsioonis, kus on varasemalt tuvastatud Twinkle'it sisaldavad replitseeruvate nukleoidide populatsioonid.

Lisaks on varasemalt näidatud, et mtSSB ning Twinkle kolokaliseeruvad mitokondrites replitseeruvates nukleoidides (Rajala jt, 2014). Käesolevad tulemused kinnitavad antud vaadet, on näha, et mtSSB liigub digitoniiniga lüüsimisel rohkem lahustuvasse fraktsiooni ning pole

enam membraaniga seotud Twinkle-it sisaldavates replitseeruvates nukleoidides. See annab tunnistust replikatsiooni intensiivsuse alanemisest, kuna mtSSB-d kaasatakse replikatsioonipunktidesse vähemal määral.

Samal ajal on tehtud katsetest näha, et mitokondritega assotsieerunud membraanid (MAM struktuurid) ei kao (joonis 5a). MAM markeri FAFL4 (ER) signaal kontrollide ning Twinkle *knockdown*-ide mitokondritel ei kao. Mfn1 ja 2 vahendatud ühendus jääb Twinkle vähenemisel 72h pärast tõenäoliselt stabiilseks, lisaks ei vähene Mfn1 valgu signaal (andmed pole näidatud). Teine kontakt, mille oluline mitokondriaalne komponent on VDAC1 säilib samuti Twinkle'i kaotamisel 72h pärast. Seega selle ajaintervalli jooksul ei avalda Twinkle'i vähenemine olulist mõju MAM-idele.

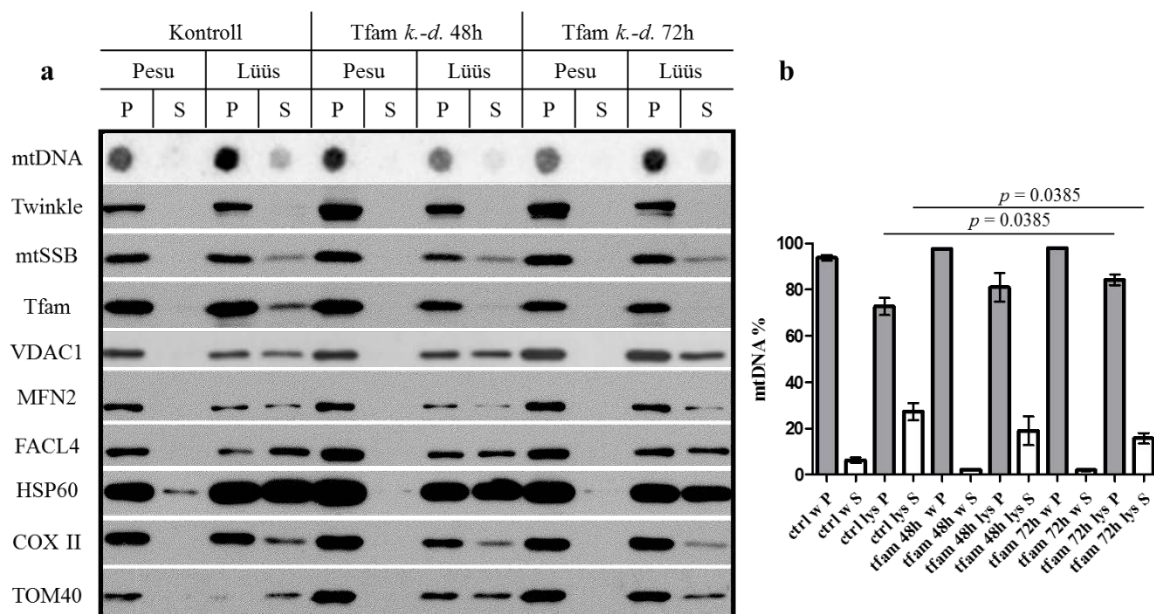
### **2.3.2 TFAM taseme langus varases faasis tugevdab MAM-struktuure**

On leitud, et mitokondriaalsete nukleoidide valk TFAM omab samuti olulist rolli mtDNA võrdses jaotamises ning segregeerimises koekultuurirakkudes (Kasashima jt, 2011). Näiteks on täheldatud suurenenud nukleoidide esinemist nii TFAM-*knockdown* kui TFAM üleekspressioonivates rakkudes (Kasashima jt, 2014). Pole selge, kas ja kuidas mõjutab TFAM tase ER-mitokondri kontaktide terviklikkust ja moodustumist. Antud töös uuriti, milline mõju on TFAM mahasurumisel mtDNA ning ER-mitokondri kontaktide säilimisele.

Nagu eelnevalt Twinkle puhul teostati ka TFAM *knockdown* 48h ja 72h ning analüüsiti digitoniiniga lüüsitud mitokondritel nii valkude signaale kui mtDNA jaotuvust samadel tingimustel. Ka antud juhul oli eesmärgiks valgutaseme langetamisel mtDNA säilimine (st ei tahetud saavutada mtDNA täielikku depletsiooni).

Joonisel 6a on näha, et TFAM kaotamisel 48h ja 72h möödudes jäävad mtSSB ning Twinkle valkude signaalid samaks. Sisemembraani markervalgu COXII puhul ei ole näha signaali muutust 2-3 päevaga, kui kaotame TFAM-i. Eeldatavasti peaks TFAM mahasurumisel kannatama transkriptsioon, ent nähtavasti seda varases *knockdown* faasis ei toimu. Ilmselt on TFAM kadu nii nõrk, et see ei mõjuta veel transkriptsiooni, aga näib, et mitokondrid üritavad algavat mtDNA kaotust kompenseerida replikatsiooni intensiivistumisega (mistõttu esineb rohkem mtDNA-d pellet fraktsioonis (joonis 6b)). See on vastupidine Twinkle *knockdown*'ile, mille korral mtDNA jäi muutumatuks ning COXII signaalid nõrgenesid, mis viitab sellele, et häirus transkriptsioon, kuigi eelduste kohaselt oleks pidanud hoopis replikatsioon häiruma. On näidatud, et Twinkle'it sisaldavad replitseeruvad nukleoidid jäävad pellet fraktsiooni ja järelkult Twinkle'it mittesisaldavad (ja hüpoteetiliselt transkriptsiooniliselt aktiivsed)

nukleoidid supernatandi fraktsiooni (Rajala jt, 2014). Seetõttu on loogiline järeldada, et langevate mtDNA koopiaarvude tingimustes on rohkem mtDNA-d seotud Twinkle valguga ning ei ole enam teistele nukleoidide populatsioonidele (ingl *nucleoid pools*) kättesaadav. Lisatoetuseks sellele nähtusele ja interpretatsioonile on, et mtSSB valgu signaalid ei muutu, olles tugevamad eelkõige pellet fraktsioonides, mistõttu saab toimuda replikatsioon mtDNA koopiaarvu languse kompenseerimiseks.



**Joonis 6. TFAM mahasurumine RNAi meetodil.** (a) Western blot analüüsi põhjal on näha, et TFAM avaldab kuni 3-päevase *knockdown* puhul eelkõige mõju MAM struktuuridele. Nii Mfn2, FACL4 kui ka VDAC1 signaalid tugevnevad pellet fraktsioonides. Geelile laetud proovide totaalne valgusisaldus P+S on Bradford meetodi (vt Materjal ja meetodika) kohaselt samasugune. (b) Näidatud on mtDNA kvantifitseeritud andmed peale mtDNA detekteerimist Southern blot meetodil. Seejuures on toodud ära iga analüüsi puhul keskmine standardviga (SEM). *Knockdown*'ide korral on näha, et mtDNA jääb lüüsimisel oluliselt rohkem pelletisse („Tfam 72h lys P“) ( $p = 0,0385$ ). mtDNA – mitokondriaalne DNA; mtSSB – mitokondriaalne üheaheelalist DNA-d siduv valk; TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A; VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; MFN2 – mitofusiin 2; FACL4 – pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4; HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa; COXII – tsütokroom c oksüdaas subühik II; TOM40 – välismembraani translokaas 40 kDa; Ctrl – kontroll; lys – digitoniini lüüs; w – ingl *wash* ehk pestud mitokondrid; P – pellet; S – supernatant; pesu – 1X PBS-iga pestud mitokondrid, mis on kontroll, et lüüsimiseks kasutatud mitokondrid on terved; lüüs – digitoniiniga lüüsitud mitokondrid; *k.-d.* – *knockdown* 48 tundi ja 72 tundi.

Twinkle'i kaotamise puhul puudub „ankur“, mille kaudu kinnituks mtDNA tugevasti sisemembraaniga. Seega hakkab rohkem mtDNA-d esinema supernatandi fraktsioonis, kuid pole selge, mis põhjustab COXII transkriptsiooni/translatsiooni langust (signaali nõrgenemine, vt joonis 5a), kuna Twinkle'il ei ole selget rolli transkriptsioonis. Küll aga on vähirakkude näite

abil täheldatud, et mtDNA koopiaarvud peavad langema alla kriitilise piiri, et põhjustada ka transkriptsiooni häirumist (Reznik jt, 2017). Selleks on vaja määrata absoluutsed koopiaarvud, mis on kavas järgmisena, ent antud töö raames ei olnud see prioriteediks.

VDAC1 signaal tugevneb pellet fraktsioonides nähtavalt 72h TFAM *knockdown* korral. 48h möödudes hakkab Mfn2 signaal samuti tugevnema, kusjuures selge muutus on näha 72h möödumisel, kus Mfn2 jääb lüüsimisel prominentset pellet fraktsiooni (joonis 6a). Lisaks MAM markervalgu FACL4, mis asub ER membraanidel, signaalid tugevnevad alates 48h möödudes lüüsimisel pellet fraktsioonis. 72h möödumisel TFAM *knockdown*'ist asub enam FACL4 pelletis kui supernatandis.

Niisiis on 3 päeva möödumisel TFAM mahasurumisest näha, et mtDNA-d jääb peale digitoniini lüüsi oluliselt rohkem pellet fraktsiooni (joonis 6b). On näidatud, et Twinkle sisaldavad replitseeruvad nukleoidid jäävad pellet fraktsiooni (Rajala jt, 2014), mistõttu on loogiline järeldada, et rohkem mtDNA-d on seotud Twinkle valguga. Lisaks mtSSB valgu signaalid ei muutu, olles tugevamad eelkõige pellet fraktsioonides, mistõttu saab toimuda replikatsioon.

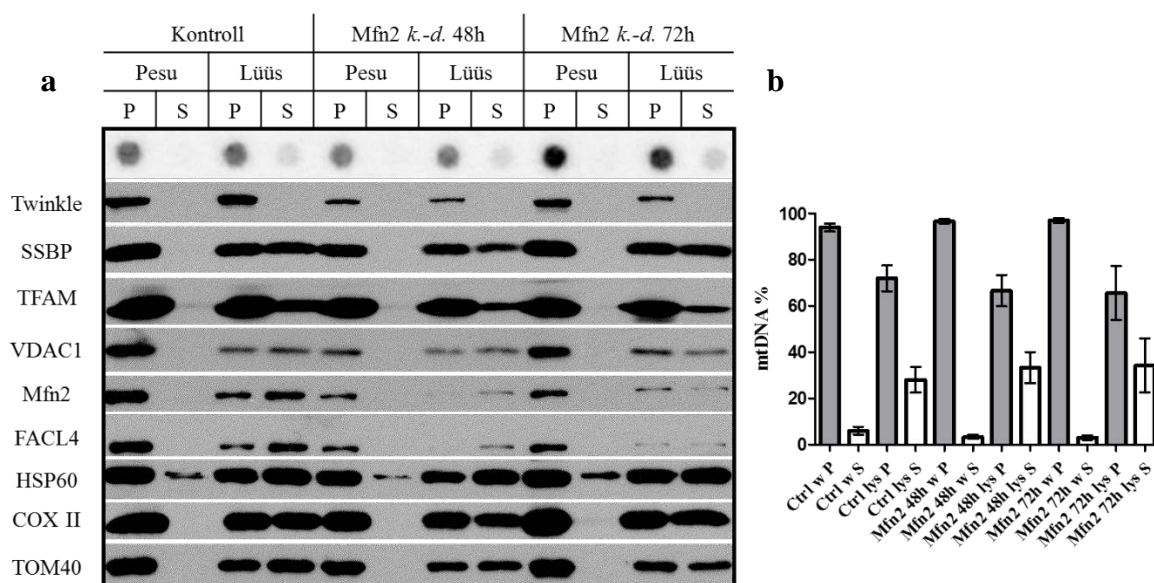
TFAM *knockdown* mõjutab varases faasis MAM struktuure. 72h järgselt tugevnevad nii VDAC1 kui Mfn2 silmnähtavalt pellet fraktsioonides. Veelgi enam, ER-paiknev FACL4 tugevneb samuti, mis näitab selgemat MAM-ide olemasolu. On võimalik, et TFAM-i kadumisel genereritakse kompensatoorselt rohkem MAM-struktuure, hoidmaks mtDNA-d membraaniga seotud nn replikatsiooniplatvormide vahetus läheduses. Antud leidude edasiuurimiseks viiakse järgmisena läbi ka 96h, 120h ja 144h *knockdown*'id (kuni mtDNA depletsioonini), mõõdetakse absoluutseid mtDNA koopiaarve ning jälgitakse nii nukleoidide „kuju“ kui MAM olekut mikroskoopia abil.

### **2.3.3 Mitofusiin 2 kadu mõjutab nõrgalt nukleoidide organisatsiooni**

Mitokondriaalne jagunemine on lisaks mitokondrite morfoloogia reguleerimisele oluline ka mtDNA homöostaasis, kuna mitokondriaalse jagunemise faktorid koekultuurirakkudes ja skeletilihases võivad põhjustada mtDNA koopiaarvu vähenemist ning mtDNA mutatsioonide kuhjumist (Chen jt, 2010). Varasemalt on näidatud, et Mfn1 või Mfn2 täielik kaotamine hiire embrüonaalsetes fibroblastides (*MFN*<sup>-/-</sup> *knockout* MEF-id) põhjustab tõsist mtDNA koopiaarvu langust, ja sellega seoses mtDNA nukleoidide lagunemist, membraanipotentsiaali kadu ning vähenenud hingamisahela funktsioneerimist (Chen jt, 2005; Chen jt, 2010). Üldisemalt võib öelda, et defektid mitokondriaalses jagunemises võivad viia mtDNA kaoni ning oksüdatiivse fosforüleerimise häirumiseni, mis omakorda põhjustab näiteks Charcot–Marie–Tooth

haigusvormi (CMT2A) kujunemist (Charcot ja Marie, 1886; Tooth, 1886; Chen jt, 2005). On näidatud, et Mfn2 puudumisel paiknevad mitokondrid ja ER membraanid üksteisele lähemal, st tugevnevad ER-mitokondri kontaktid (Filadi jt, 2015; Leal jt, 2016).

Pole aga selge, millist mõju avaldab lühiajaline Mfn2 taseme langus mtDNA-le ja nukleoididele, ning kas midagi (ja, kui üldse, mis) juhtub sel juhul MAM struktuuridega. Üleüldiselt on avaldatud Mfn2 efektid ebaselged ja kohati vastuolulised tulenevalt sellest, millises koes/rakusüsteemis katsed on läbi viidud. Käesolevas töös uuriti Mfn2 spetsiifilise siRNA efekti 48h ja 72h möödumisel ning teostati mitokondrite lüüsimine ja edasi valkude ning mtDNA analüüsimine.



**Joonis 7. Mitofusiin 2 mahasurumine RNAi meetodil.** (a) Western blot analüüsi tulemused, mille puhul on näha muutused nukleoidi struktuuris Mfn2 ekspressiooni mahasurumisel. Twinkle hakkab vähenema lüüsimisel pellet fraksioonides. mtSSB jääb Mfn2 vähenemisel muutumata. Veidi nõrgeneb TFAM signaal. FACL4 signaalid nõrgenevad sarnaselt Mfn2 signaalidega. Geelile laetud proovide totaalne valgu sisaldus P+S on Bradford meetodi (vt Materjal ja meetodika) kohaselt samasugune. (b) mtDNA jaotus Mfn2 mahasurumisel. 48h ja 72h *knockdown* korral puuduvad selged muutused mtDNA jaotuvuses võrreldes kontrollidega. Näidatud on mtDNA kvantifitseeritud andmed peale mtDNA detekteerimist Southern blot meetodil. Seejuures on toodud ära iga analüüsi puhul keskmine standardviga. mtDNA – mitokondriaalne DNA; mtSSB – mitokondriaalne üheaahelalist DNA-d siduv valk; TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A; VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; Mfn2 – mitofusiin 2; FACL4 – pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4; HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa; COXII – tsütokroom c oksüdaasi II subühik; TOM40 – välismembraani translokaas 40 kDa. Ctrl – kontroll; P – pellet; S – supernatant; w – pestud mitokondrid, mis on kontroll, et lüüsimiseks kasutatud mitokondrid on terved; lüüs – digitoniiniga lüüsitud mitokondrid; k.-d. – *knockdown* 48 tundi ja 72 tundi.

Joonisel 7a on näha, et Mfn2 48h-72h *knockdown* korral väheneb lüüsimisel Twinkle pelletis võrreldes kontrollidega. mtSSB signaalid üldiselt ei muutu peale 72h Mfn2 vähenemist. Twinkle *knockdown* korral on Twinkle kadu detekteeritav sama ajavahemiku jooksul. Võib oletada, et Mfn2 mahasurumine võib küll mõjutada nukleoide, ent mitte lühikese (48h/72h) aja jooksul. MtDNA puhul puudub oluline efekt Mfn2 kaotamisel nii 48h kui 72h pärast, nagu selgub jooniselt 7b. Esmapilgul on näha tendents, et mtDNA liigub rohkem supernatandi fraktsiooni, mis oleks ka kooskõlas Twinkle signaalide vähenemisega. Antud juhul aga pole see statistiliselt oluline viidates sellele, et järgmise sammuna on mõistlik jälgida 96h, 120h ja 144h Mfn2 *knockdown* efekti.

Mitokondri sisemembraani valgu COXII signaalid jäävad Mfn2 *knockdown* korral nii 48h kui 72h vältel muutumatuks ja sarnaseks kontrollidega. TOM40, kui mitokondri välismembraani markervalk, on sarnaselt pelletis ja supernatandis (joonis 7a). See tähendab, et mitokondri membraanid ei ole (veel) Mfn2 *knockdown*'i tõttu kahjustunud. Lisaks näitab COXII olemasolu, et mtDNA koopiaarvud ei ole muutunud ning transkriptsioon kuidagi häiritud.

Mfn2 signaalid nõrgenevad märgatavalt 48h *knockdown* korral. Sarnaselt Mfn2 vähenemisele nõrgeneb ka ER marker FACL4 mitokondrites nii 48h kui 72h möödumisel.

On teada vähemalt kaks valgukompleksi, mis osalevad MAM-struktuuride moodustumises - VDAC1-Grp75-IP3R kompleks ning Mfn2-Mfn1/2 (vt ptk 1.5 joonis 4). Mfn2 vahendatud MAM kontaktide moodustumine on tõenäoliselt häiritud, kuna Mfn2 nõrgeneb märgatavalt, lisaks on näha ka MAM markervalgu FACL4 nõrgenemist. Mfn1 signaalid lüüsimata mitokondritel vähenevad algsetel andmetel samuti, kui suruda maha Mfn2 (andmed pole näidatud). See läheb aga vastuollu varasemate andmetega, kus 48h Mfn2 *knockdown* korral Mfn1 signaal mõnevõrra hoopis tugevnes (Leal jt, 2016). Selle efekti uurimiseks on vaja edasisi analüüsi. Huvitaval kombel hakkab 72h Mfn2 *knockdown* puhul tugevneva VDAC1 signaal pellet fraktsioonis. Antud juhul võiks tegu olla Mfn1/2 vahendatud ER-mitokondri kontaktide kompensatoorse mehhanismiga, kuna VDAC1 on oluline mitokondriaalne komponent ühte tüüpi MAM kontaktide moodustumisel. Selle efekti kinnitamiseks tuleb uurida ka Grp75 ja IP3R valkude muutuseid ning on vaja lisaks rakendada immunofluorestsents mikroskoopiat, jälgimaks eelpool mainitud valkude kolokalisatsiooni muutuseid või olekuid.

Lähtudes käesolevatest tulemustest pole päris selge, millist mõju avaldab Mfn2 mahasurumine (48-72h jooksul) mtDNA säilitamisele ja nukleoididele. Mfn2 lühiajaline kaotamine ei näi mõjutavat mtDNA lahutuvust teostatud biokeemiliste fraktsioneerimiskatsete käigus. Kuigi on näha mõningaid muutuseid Twinkle signaalide ja TFAM signaalide nõrgenemisel, pole 72h pikkune Mfn2 *knockdown* arvatavasti piisav, et põhjustada mtDNA vähenemist. Kui näiteks

TFAM *knockdown* puhul on efekt nii nukleoididele kui MAM-struktuuridele nähtav varases *knockdown*'i faasis, pole Mfn2 puhul selget ja konkreetset efekti näha.

Seniste tulemuste paikapidavusel võib spekuloida, et Twinkle (oluline mikrodomääni komponent) või mtDNA replikatsioon (langenud Twinkle vähenemise tõttu), aga ka näiteks Mfn1/2 valkude vahendatud MAM-ühendused ei avalda tugevat ja kiiret mõju nukleoididele. Küll aga avaldab mõju nii MAM-idele kui nukleoididele TFAM, mistõttu võiks/peaks järgmisena testima, kas ja kuidas võiks TFAM olla oluline signalseerija nii mtDNA sorteerimiseks mitokondrite sees kui nukleoidide „staatuse“ signaali edastaja tsütosoolile. Võib olla toimub signalseerimine MAM-struktuuride kaudu, kuna TFAM *knockdown* mõjutab ka MAM-struktuure varakult ja kiirelt.

#### **2.3.4 ATAD3 vähenemine põhjustab ka MAM-struktuuride vähenemist**

ATAD3A ning vähemlevinud ATAD3B on paraloogsed valgud. Tõenäoliselt moodustavad need heteroheksameere või homoheksameere ATAD3A-st, mis ulatuvad sisemembraanist välismembraani (Merle jt, 2012; Hubstenberger jt, 2010) ning nimetatakse kokku ATAD3-ks. Varasemalt on leitud, et ATAD3 puhastub välja koos mtDNA säilitamisvalkudega ja mitokondriaalsete ribosoomidega (Hubstenberger jt, 2010). ATAD3 muutunud ekspressioon mõjutab mtDNA topoloogiat ning mitokondriaalset valgusünteesi (He jt, 2007; He jt, 2012). ATAD3 omab tugifunktsiooni nukleoididele ja mitokondriaalsetele ribosoomidele sisemembraanil (He jt, 2012). ATAD3 puhastub välja ka koos valkudega, mis osalevad lipiidide metabolismis (He jt, 2012) ning ATAD3 on detekteeritud MAM-idel (Issop jt, 2014). (Gerhold jt, 2015)

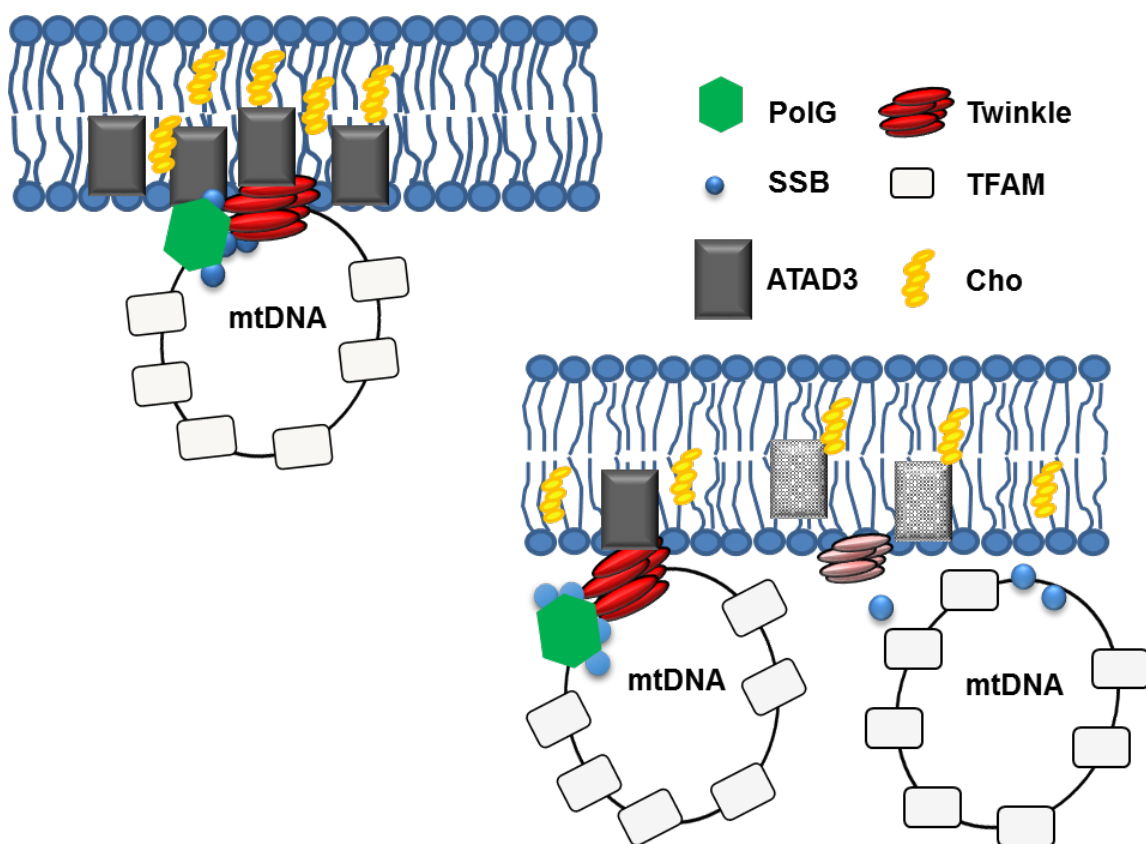
Hiljuti leiti, et ATAD3 panustab muuhulgas kolesteroolirikka membraanidomääni moodustumisse. Nende kolesteroolirikaste membraani struktuuridega (mikrodomäänidega) seostuvad Twinkle'it sisaldavad replitseeruvad nukleoidid, mis potentsiaalselt ankurdatakse sisemembraanile ATAD3 vahendusel. (Gerhold jt, 2015)

Hiljuti avaldatud tulemuste põhjal selgus, et ATAD3 mahasurumine põhjustab mitokondriaalsete nukleoidide häirumist ning ebanormaalsete kristade teket. Nn flotatsiooni gradientidel (vt ptk Materjal ja meetodid; ptk 2.3.5 joonis 10) põhinevate analüüsidega leiti, et ATAD3 puudumisel toimub mitokondriaalsete nukleoidide ümberjaotumine tihedusgradiendis, lisaks muutub ka lipiidide (kolesterooli ning fosfolipiidide) jaotus samas suunas. (Gerhold jt, 2015)



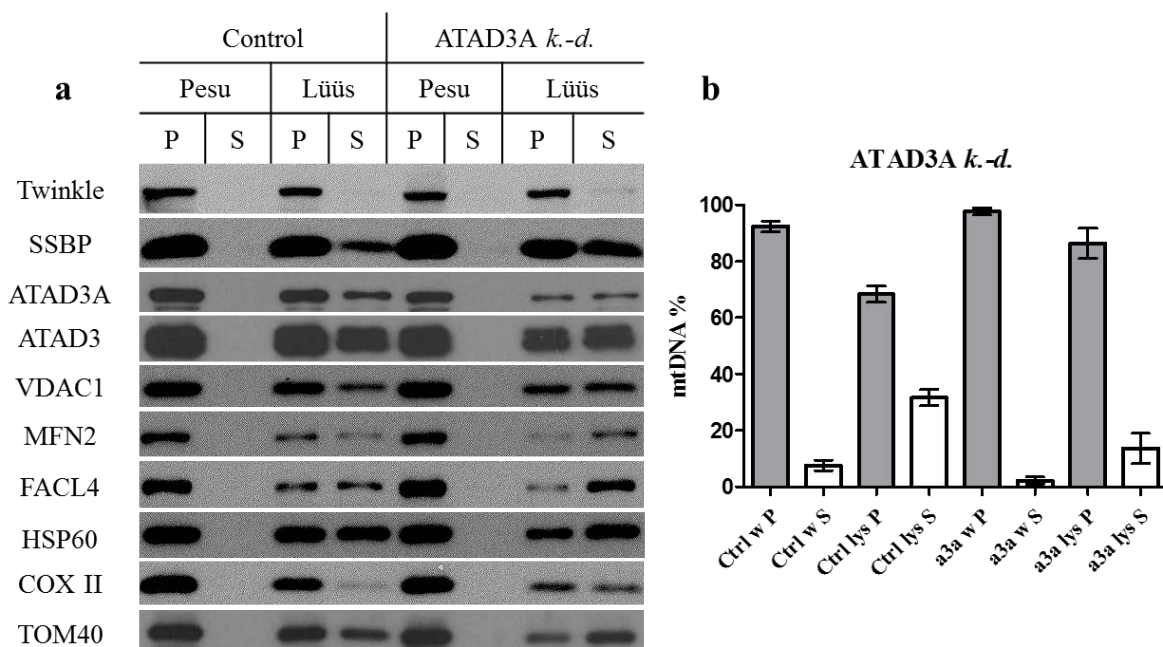
On ilmne, et ATAD3 on seotud mitokondriaalsete membraanidega ning panustab muuhulgas ka mtDNA assotsieerumisse membraanidega, seega muutunud ATAD3 ekspressioon põhjustab mtDNA säilitamise häirumist (He jt, 2012; He jt, 2007).

Hiljutiste tulemuste baasil on välja pakutud hüpotees, mille kohaselt ATAD3 kaotamisel väheneb membraaniga assotsieerunud mtDNA nukleoidide hulk (Joachim Matthias Gerhold avaldamata andmed; joonis 8) ning mtDNA lahutuvus biokeemilisel fraktsioneerimisel muutub oluliselt. See tähendab, et mikrodomääni laialivalgumise tõttu jääb digitoniiniga lüüsimisel rohkem mtDNA-d supernatanti, kuna ebastabiilse mikrodomääni tõttu ei suuda Twinkle'it sisaldavad nukleoidid enam jääda tihedalt sisemembraaniga seotuks (joonis 8).



**Joonis 8. ATAD3 mõju replikatsiooni mikrodomäänile.** Väljapakutud hüpoteesi kohaselt toimub ATAD3 vähenemisel membraaniga seotud replitseeruvate nukleoidide kadumine. Toimub ka kolesterooli hajumine ning sellega seoses membraaniga seotud mikrodomäänide lagunemine. Selle tulemuseks on ennustatud, et mtDNA on tavalisest vähem IMM-iga seotud ning katseliselt peaks mtDNA olema peale digitoniini lüüsi rohkem supernatandi fraktsioonis detekteeritav (vt Kirjanduse ülevaade). mtDNA – mitokondriaalne DNA; PolG – polümeraas  $\gamma$ ; Twinkle – mitokondriaalne helikaas; SSB – üheaheelalist DNA-d siduv valk; ATAD3 – ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3; TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A, Cho – kolesterool. (Joachim Matthias Gerhold avaldamata andmed)

Käesolevas töös katsetati ATAD3A mahasurumist spetsiifilise siRNA-ga rakendades 72h *knockdown*'i, kusjuures 48h möödudes tehti rakkudele teine lisa-*knockdown*, kuna varasemalt on näidatud, et ainult antud tingimuste juures on ATAD3A valgu kadu detekteeritav ja rakud veel ligi 48-ks tunniks elujõulised (Gerhold jt, 2015).



**Joonis 9. a) ATAD3A 72h pikkune ekspressiooni mahasurumine.** ATAD3A vähenemisel ei toimu mitokondriaalsete nukleoidide terviklikkuse kadu. MAM struktuurid hakkavad ATAD3A kadumisel lagunema, lisaks on mitokondriaalsete membraanide terviklikkus muutunud. **b)** mtDNA jaotus ATAD3A mahasurumisel 72h jooksul. *Knockdown* korral esineb mtDNA digitoniiniga lüüsimisel rohkem pelletis („a3a lys P“) kui lahustuvas fraktsioonis („a3a lys S“), võrreldes kontrollidega. Näidatud on mtDNA kvantifitseeritud andmed peale mtDNA detekteerimist Southern blot meetodil. Seejuures on toodud ära iga analüüsi puhul keskmine standardviga (SEM). mtDNA – mitokondriaalne DNA; mtSSB – mitokondriaalne üheaahelalist DNA-d siduv valk; ATAD3 – ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3; VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; MFN2 – mitofusiin 2; FACL4 – pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4; HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa; COXII – tsütokroom c oksüdaas subühik II; TOM40 – välimembraani translokaas 40 kDa.

Käesolevalt jooniselt on näha, et ATAD3A mahasurumisel toimub valgu signaali nõrgenemine võrreldes kontrollidega (joonis 9a). Kui kontrollrakkudes on ATAD3A ja ATAD3B ekspressioon võrdne, siis ATAD3A mahasurumisel häirub nende kahe valgu tasakaal, st ATAD3B signaalid on ATAD3A omadest tugevamad (joonis 9a). Lisaks on näha, et mitokondriaalsete nukleoidide valkude ekspressioon (Twinkle, SSBP, TFAM) oluliselt ei muutu ATAD3A mahasurumisel võrreldes kontrolliga.

Mitokondriaalsed membraanid on ATAD3A mahasurumisel ebastabiilsemad, kuna võrreldes kontrollidega väheneb sisemembraani markervalk COXII digitoniiniga lüüsimisel. Kui Twinkle *knockdown* puhul vähenes samuti COXII signaal peale 72h, näitas see transkriptsiooni häirumist (olulisi muutuseid mtDNA puhul ei täheldatud), siis ATAD3 kaotamisel jäävad nii Twinkle kui mtDNA prominentelt pelletisse. Ka välismembraani markervalk TOM40 ATAD3A *knockdown* korral on kontrollidega võrreldes lüüsimisel enamuses supernatandis kui pelletis. Antud juhul võiks põhjuseks olla mitokondrite morfoloogia muutus, kuna ATAD3A vähenemisel on varem näidatud ebanormaalse kujuga kristade teket (Gerhold jt, 2015).

Lisaks on muutunud Mfn2 ekspressioon, mis lokaliseerub sarnaselt FACL4-ga peale lüüsimist rohkem lahustuvasse fraktsiooni. Kontrollide puhul asub Mfn2 selgelt pellet fraktsioonis peale digitoniini töötlust. Nähtavasti kaovad Mfn2 vahendatud MAM struktuurid kiiremini peale ATAD3A kadu, kuna võivad olla ebastabiilsemad. MAM ühendus, mis on vahendatud mitokondritel VDAC1 poolt on esialgsel andmetel stabiilsem ning sel juhul ei toimu lüüsimisel olulist muutust.

Kuigi ATAD3A *knockdown* puhul on mitokondriaalsete kristade struktuur muutunud (vt Gerhold jt, 2015), mistõttu võiksid mitokondriaalsed membraanid olla ebastabiilsemad, ei toimu käesolevate katsete puhul mtDNA vähenemist (ja sellega seoses sisemembraaniga seotud mtDNA-nukleoidide vähenemist) (joonis 9b). Vastupidi, mtDNA jääb peale digitoniiniga lüüsimist eelkõige pellet fraktsiooni (umbes 85% pelletis ja 15% supernatandis), seevastu kontrollides on mtDNA lahutuvus pelleti ja supernatandi vahel selgelt erinev (vastavalt 70% ja 30%) (joonis 9b). See läheb vastuollu väljapakutud hüpoteesiga.

Samas on ATAD3 *knockdown*'il sarnane efekt nagu TFAM *knockdown* korral, kus mtDNA esineb rohkem pelletis kui supernatandis (vt joonis 6b), kuid efekt MAM-idele on vastupidine. TFAM mahasurumisel MAM-struktuurid tugevnevad (vt joonis 6a), aga ATAD3 vähenemisel vastupidi - MAM struktuurid kaovad. Seega tõenäoliselt ei ole MAM-struktuurid otseselt mtDNA poolt reguleeritud, pigem mängib ATAD3 puhul olulist rolli mikrodomääni kadumine. TFAM kaotamisel aga arvatavasti kaasatakse rohkem mtDNA-d membraaniga seotud replikatsioonitehastesse ning tugevdatakse MAM-struktuure.

Kuna esialgsete tulemuste baasil selgus, et ATAD3A *knockdown* tulemused ei toetanud eelnevalt väljapakutud hüpoteesi, oli alternatiivselt võimalik testida ATAD3B üleekspressiooni. Varasemalt publitseeritud katsed on näidanud selle sarnast efekti mitokondritele, mille korral ATAD3B üleekspresseerimine põhjustab (muuhulgas) mtDNA säilitamise ja replikatsiooni häirumist (He jt, 2007).

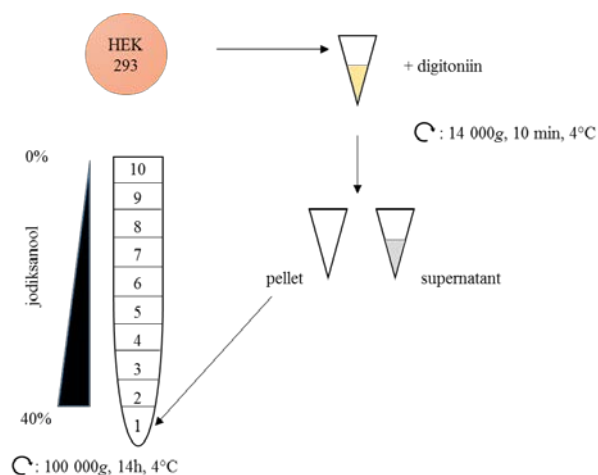
Seega otsustati katsetada esmalt, kas antud juhul on ATAD3B üleekspressioon üldse põhjendatud.

### 2.3.5 ATAD3B üleekspressiooni efekt nukleoidi mikrodoomäänile sarnaneb ATAD3A mahasurumisega

ATAD3B üleekspressioonil on sarnane efekt nagu ATAD3A *knockdown*'il, mille korral on täheldatud vähest mtDNA koopiaarvu langust ja kristade morfoloogia muutuseid (Dr Helen M Cooper, publitseerimata andmed).

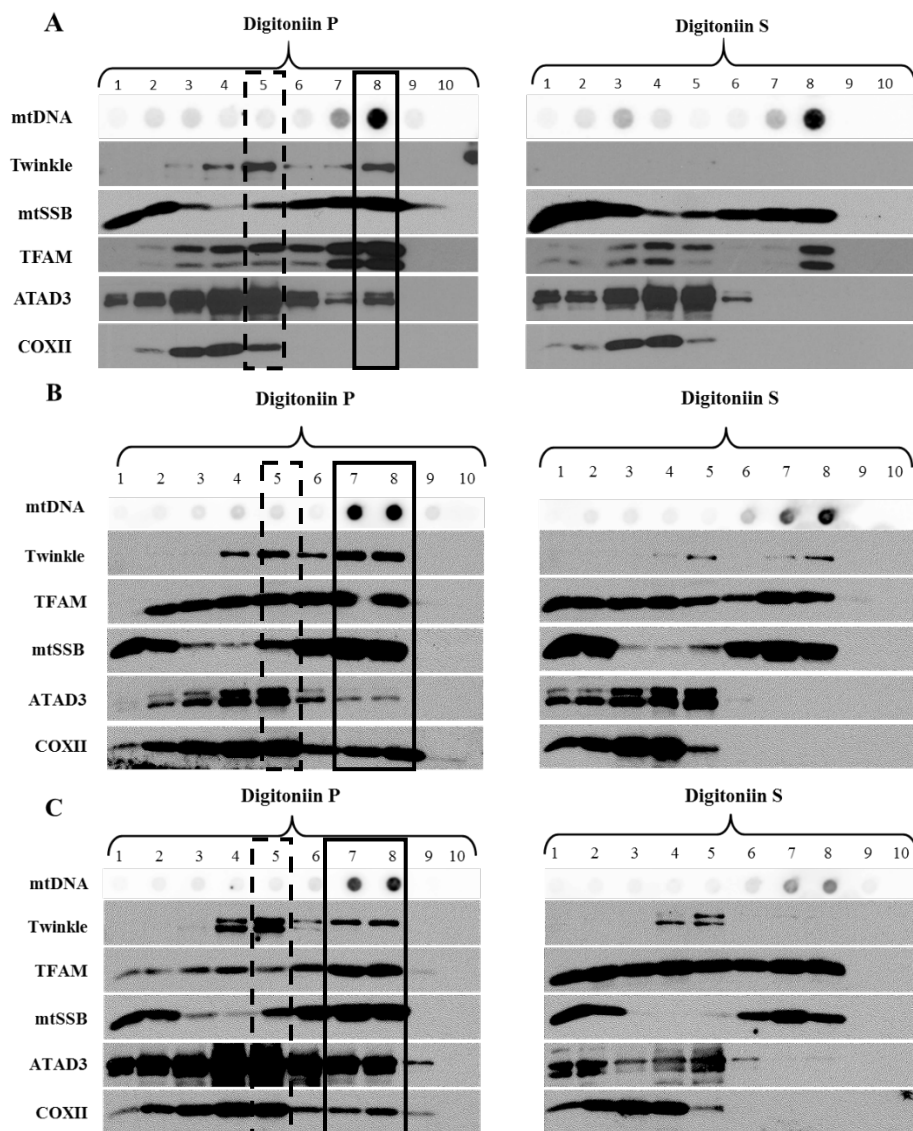
Käesolevas töös kasutati Dr Helen M Cooper ning Louis van Enkevort (MRC Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, UK; Åbo Akademi, Turku, Soome) poolt konstrueeritud T-Rex-HEK293-ATAD3B indutseeritavaid rakke, millega esmalt teostati nn flotatsioonigradiendid (joonis 10), seejuures kontrollidena kasutati nii ATAD3B mitteindutseeritud rakkude mitokondreid kui tavalisi, HEK293e rakkude mitokondreid.

Mainitud tihedusgradientide analüüsimisega sooviti kontrollida, kas ATAD3B üleekspressioon põhjustab sama efekti nagu ATAD3A *knockdown*. Varasemalt on teostatud juba elektronmikroskoopia, mis näitas ka ATAD3B üleekspressiooni puhul kristade struktuuri muutuseid (Dr Helen M Cooper publitseerimata andmed).



**Joonis 10. Jodiksanooli tihedusgradient (nn flotatsioon).** Käesoleval skeemil on ära toodud nn flotatsioonigradiendid valmistamise töökäik. Rakkudest eraldatud mitokondrid lüüsitakse jääl digitoniiniga, eraldatakse tsentrifuugimisega pellet ja supernatant ning edasi formeeritakse jodiksanooligradiendid 40%-0%. Gradiendid jäetakse fuugima 14 tunniks 100 000g juures ja seejärel kogutakse fraktsioonid ülevalt alla. HEK293 – inimese embrüonaalsed neerurakud. Joonis on koostatud Joachim Matthias Gerhold'i ja Koit Aasumets'a poolt.

ATAD3B üleekspresseerimiseks kasutati 72h induksiooni doksütsükliiniga, koguti rakud ning alustati mitokondrite eraldamist. Mitokondrid lüüsi, nagu eelnevalt, digitoniiniga jääle ning seejärel formeeriti pelleti („P“) ja supernatandi („S“) jodiksanooligradiendid 1X TN puhvril (42,5% → 0%). Gradiende tseentrifuugiti 100 000g juures 14h ja koguti analüüsiks fraktsioonid (vt joonis 10).



**Joonis 11. Jodiksanooli ehk nn flotatsiooni gradiendid.** A) Joonisel on ära toodud HEK293e kontroll jodiksanooli gradientide Western ja Southern blot detektsioonid. Musta kastikesega on märgitud ära replikatiivsete nukleoidide fraktsioon (fraktsioon number 8) (Gerhold jt, 2015, Rajala jt, 2014). Punktirjoonega on tähistatud seni kirjeldamata fraktsioon number 5, kuhu koonduvad nukleoidi valgud sõltumatult mtDNA-st. B) T-Rex-HEK293-ATAD3B mitteindutseeritud jodiksanooli gradientide Western ja Southern blot detektsioonid. Mitokondriaalne nukleoid pelletis hajub laiali 7. ja 8. fraktsiooni (joonisel ümbritsetud musta kastikesega). Twinkle, TFAM, mtSSB ning ATAD3 esinevad koos 5. fraktsioonis (joonisel punktirjoon), kuid mtDNA sinna ei koondunud. C) T-Rex-HEK293-ATAD3B doksütsükliiniga indutseeritud jodiksanooli gradientide Western ja Southern blot detektsioonid.

Nukleoidi fraktsioon jaotub kahte fraktsiooni (7. ja 8. fraktsioon), mis on joonisel tähistatud musta kastikesega. Lisafraktsioon (5. fraktsioon) sisaldab nukleoidi valke, kuid mitte mtDNA-d. mtSSB – mitokondriaalne üheaheelalist DNA-d siduv valk; TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A; ATAD3 – ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3; COXII – tsütokroom c oksüdaas II subühik; P – pellet; S – supernatant; Digitoniin – mitokondrite lüüsimine teostati digitoniiniga.

Joonisel 11A on näha, et HEK293e kontrollide puhul liiguvad mitokondriaalsed nukleoidid pellet (P) gradiendis ühte konkreetseesse fraktsiooni (number 8), mis sisaldab mtDNA-d ning sellega seonduvaid valke Twinkle, TFAM, mtSSB ning ATAD3, mida on ka varasemalt näidatud (Gerhold jt, 2015).

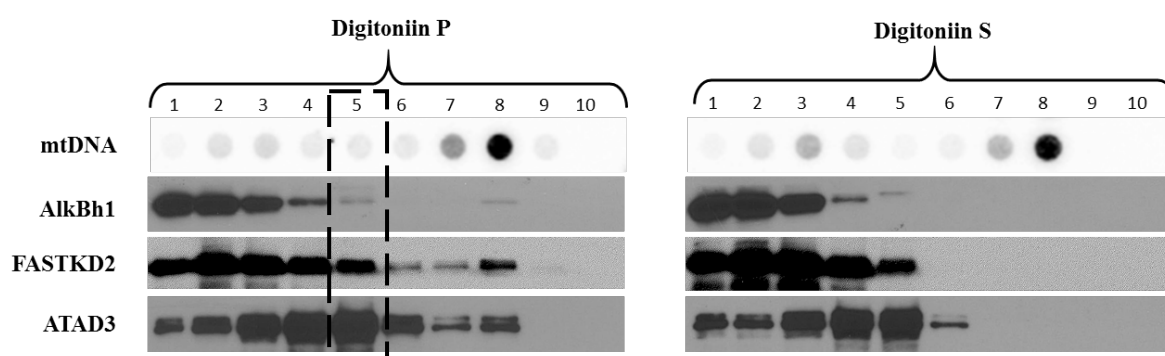
Supernatandi (S) puhul liiguvad mtDNA-ga seotud nukleoidi valgud TFAM ja mtSSB tihedusgradiendis 8. fraktsiooni ja seda koos mtDNA-ga. Antud juhul ei ole detekteeritav Twinkle, mis võiks kinnitada vähemalt kahe nukleoidide populatsiooni olemasolu (Rajala jt, 2014; Gerhold jt, 2015).

ATAD3B üleekspressioonigradienditel on näha, et nukleoidide komponendid mtDNA, Twinkle, TFAM ning mtSSB hajuvad laiali kahte fraktsiooni (fraktsioonid 7 ja 8, tähistatud joonistel musta kastiga) (joonised 11B ja 11C). See efekt on sarnane Gerhold jt, 2015 poolt avaldatud ATAD3 *knockdown* gradientidega, mille korral nukleoidi valgud ja mtDNA jaotuvad kahte fraktsiooni. Taaskord on näha prominentne 5. fraktsioon pellet gradiendis (punktirjoonega ümbritsetud), kuhu koonduvad nukleoidi valgud Twinkle, mtSSB, TFAM, ATAD3.

Antud tulemuste põhjal võib öelda, et ATAD3B üleekspressiooniga teostatud flotatsioon käitub sarnaselt varasemalt ATAD3A *knockdown* mitokondritega teostatud flotatsiooniga, kus mtDNA nukleoid ei liigu tihedusgradiendis enam ühte konkreetseesse fraktsiooni, vaid hajub laiali (vt Gerhold jt, 2015). Kuid oluline nähtus praeguste katsete puhul on see, et sarnaselt käituvad ka kontrollgradiendid, mis olid mitteindutseeritud. Mitteindutseeritud rakkudes on ATAD3A ning ATAD3B ebavõrdsete signaalidega, mis lubab oletada, et rakkudesse viidud ekspressioonivektor on lekkiv, st mingil määral toimub mitteindutseerimisel ikkagi ATAD3B tugevam ekspressioon.

Huvitaval kombel kontsentreeruvad mitokondriaalsed nukleoidi valgud veel ühte fraktsiooni (number 5). Selles fraktsioonis on tugevalt esindatud nii Twinkle kui ATAD3, nõrgemini on esindatud mtSSB ja TFAM. Antud 5. fraktsiooni ei ole koondunud mtDNA, kuid nõrk signaal on siiski detekteeritav. Varasemates töödes (Rajala jt, 2014; Gerhold jt, 2015), kus jodiksanooli gradiente analüüsiti vastavat fraktsiooni ei ole kirjeldatud. Võib olla on tegemist replikatsiooni platvormi kokkupanemiskohaga või mingi muu, näiteks reparatsiooniga seotud kompleksiga.

Kuna väga prominentselt esineb kõnealus 5. fraktsioonis ATAD3, otsustati vaadata gradientiel muuhulgas ka mt-RNA metabolismis olulisi valke – FASTKD2 ja AlkBh1 (rahvusvahelise koostööprojekti raames identifitseeritud kui ATAD3 interaktsiooni partnerid), sest teadaolevalt on ATAD3 seotud ka mitokondriaalse translatsiooniga. Joonisel 12 on näha, et AlkBh1, FASTKD2 ning ATAD3 esinevad koos mainitud 5. fraktsioonis (tähistatud punktiirjoonega), aga ilma mtDNA juuresolekuta. Kuna ATAD3 interakteerub tRNA-d modifitseeriva ensüümiga ning mitokondriaalsete ribosoomide assambleerimises osaleva valguga annab see alust oletada, et 5. fraktsiooni näol võiks tegu olla hoopis mt-RNA metabolismis olulise fraktsiooniga, kuigi jääb huvitavaks ja veel lahendamata küsimuseks, kuidas mtDNA replikatsiooniga seotud valgud võiks olla selliste protsessidega seotud.

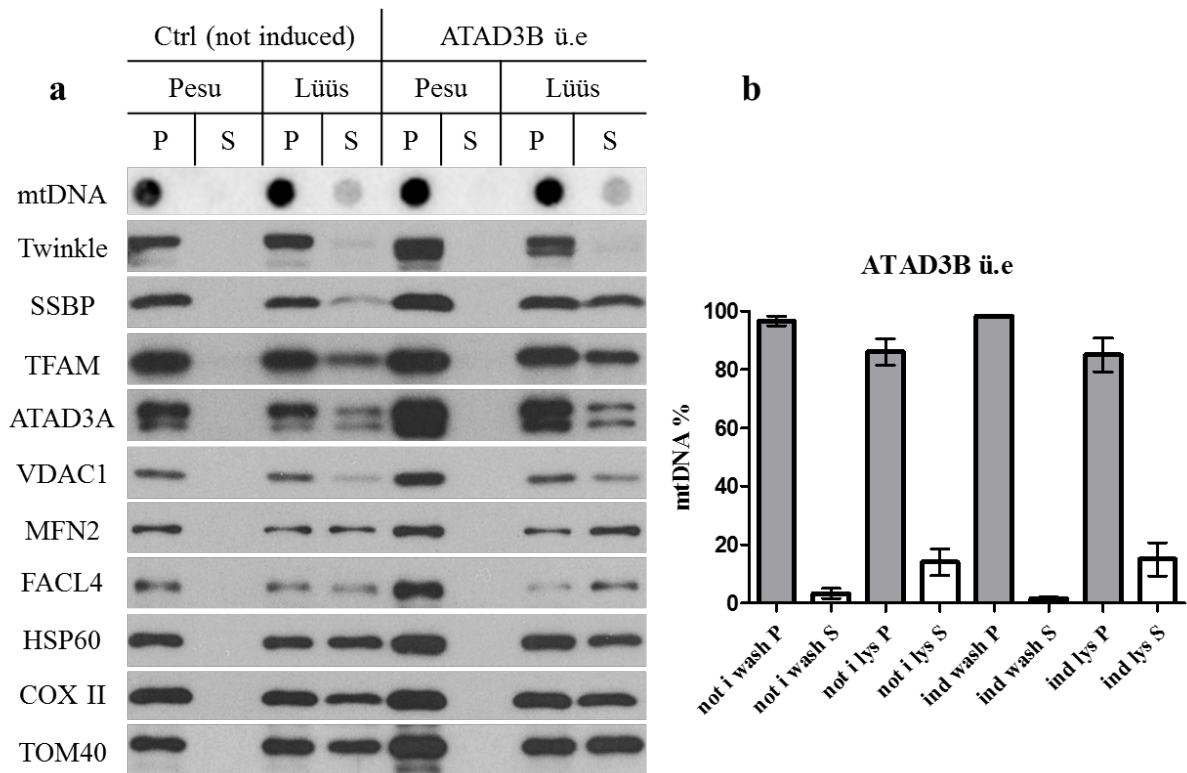


**Joonis 12. HEK293 jodiksanooligradiendid.** Western ja Southern blot detektsioonid ATAD3 ja mtDNA puhul on ka näidatud joonisel 11A, AlkBh1 ja FASTKD2 on lisadetektsioonid samadest proovidest. ATAD3, AlkBh1 ja FASTKD2 on detekteeritavad nukleoidi fraktsioonis (8. fraktsioon) koos mtDNA-ga. 5. fraktsioonis on näha ATAD3, AlkBh1 ning FASTKD2 signaalid ilma mtDNA-ta. FASTKD2 – FAST kinaasi domääni sisaldav valk 2; AlkBh1 – Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutaradii sõltuv dioksügenaas 1; ATAD3 – ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3; P – pellet fraktsioonid; S – supernatandi fraktsioonid.

On ka leitud, et *de novo* DNA metüültransferaas Dnmt3A lokaliseerub samas 5. fraktsioonis (Bolšakova, 2017), mis annab alust oletada selle fraktsiooni seotust epigeneetiliste mehhanismidega. Teisalt on antud fraktsioonis väga vähe mtDNA-d, mis võiks viidata mitokondriaalsele translatsioonile. Siiani kirjeldamata nukleoidi fraktsiooni uuritakse seega mitme hüpoteesi püstitamiseks lähiajal edasi.

### 2.3.6 ATAD3B üleekspressioon põhjustab MAM-struktuuride häirumist

Testimaks ATAD3B üleekspressiooni mõju paikapidavust ka väikeses mahus, nagu tehtud ATAD3A *knockdown* puhul, teostati mitokondrite eraldamine nii indutseeritud kui mitteindutseeritud rakkudest. Seejärel lüüsi mitokondrid digitoniiniga ja analüüsi Western blot ning Southern blot meetoditega.



**Joonis 13. (a)** ATAD3B üleekspressiooni indutseerimine ATAD3B rakkudes 72h jooksul. Western blot analüüsi tulemused, mille korral on näha üleekspressiooni negatiivne mõju MAM struktuuridele, samas säilib mitokondriaalse nukleoidi terviklikkus ja funktsioon. **(b)** ATAD3B üleekspressioonil 72h pärast olulist muutust mtDNA jaotuvuses ei esine võrreldes indutseerimata kontrollidega. Näidatud on mtDNA kvantifitseeritud andmed peale mtDNA detekteerimist Southern blot meetodil. Seejuures on toodud ära iga analüüsi puhul keskmine standardviga (SEM). mtDNA – mitokondriaalne DNA; mtSSB – mitokondriaalne üheaheelalist DNA-d siduv valk; TFAM – mitokondriaalne transkriptsioonifaktor A; ATAD3 – ATPaasi perekonna AAA domääni sisaldav valk 3; VDAC1 – pingest sõltuv anioonselektiivne kanal 1; MFN2 – mitofusiin 2; FACL4 – pikaahelalise rasvhappe-CoA ligaas 4; HSP60 – kuumašoki valk 60 kDa; COXII – tsütokroom c oksüdaas subühik II; TOM40 – välismembraani translokaas 40 kDa; not i – mitteindutseeritud; ind – indutseeritud.

Joonisel 13a on näha, et ATAD3 üleekspressioonil säilivad nukleoidi valgud ja mtDNA sarnaselt mitteindutseeritud kontrollidega pelletis peale digitoniiniga lüüsimist (TFAM, Twinkle, mtSSB). Mitokondriaalsed membraanid lüüsuvad digitoniiniga tavapäraselt sarnaselt kontrollidega, mille korral välismembraani markeri TOM40 ning sisemembraani markeri COXII jaotuvus pelletis ja supernatandis püsib sarnane (joonis 13a). Küll aga on teada, et ATAD3B üleekspressioon põhjustab ka kristade kuju muutusi (Helen M Cooper, publitseerimata andmed). Eeldatavasti võiks ka COXII (ja sisemembraan) muutuda nagu toimub ATAD3A *knockdown* korral, kus selgelt COXII väheneb. Pole täpselt teada, mis juhtub, kuid üks võimalikest optioonidest on, et ATAD3B üleekspressioon põhjustab sarnast efekti mikrodomäänile ja nukleoidile seepärast, et ATAD3A ja ATAD3B suhe muutub. Antud juhul



ATAD3B üleekspresseerimisel ei kao ATAD3A ja ATAD3B valgud, mistõttu muud tegurid (eelkõige lipiidide metabolism) ei põhjusta mitokondri membraanide muutuseid, nagu toimub ATAD3A kaotamisel. See võiks ka seletada asjaolu, et ATAD3B üleekspresseerimisel ei hakka rakud surema, seevastu ATAD3A mahasurumisel hakkavad rakud peale 72h surema.

MAM struktuurid aga muutuvad sarnaselt ATAD3A mahasurumisega. ATAD3B üleekspresseerimisel on MAM marker FACL4 digitoniini lüüsi järgselt peamiselt supernatandis, võrreldes kontrollidega, kus FACL4 jääb lüüsimisel rohkem pellet fraktsiooni (joonis 13a). Sarnaselt FACL4 jaotuvusele toimub ka Mfn2 ümberjaotumine ATAD3B üleekspresseerimisel. Lüüsidis digitoniiniga üleekspressiooni mitokondreid liigub Mfn2 rohkem supernatanti (joonis 13a).

Kontrollidega (ja muuhulgas ka ATAD3A mahasurumisega) sarnaselt jaotub ATAD3B üleekspresseerimisel VDAC1 pelleti ja supernatandi vahel (joonis 13a). Sellest võiks järeldada, et VDAC1 vahendatud MAM ühendused ei kao.

Käesolevatest katsetest on näha, et ATAD3A ning ATAD3B mõjutavad sarnaselt MAM struktuure, samas ei põhjusta nad mitokondriaalsete nukleoidide (terviklikkuse) kadu.

ATAD3A mahasurumisel ja ATAD3B üleekspresseerimisel on sarnane efekt mtDNA-le, st mtDNA lahutuvus digitoniiniga lüüsimisel järgib sarnast tendentsi jäädes valdavalt pelleti fraktsiooni (joonised 13b ja 9b). Samas ATAD3B mitte-üleekspresseerivad kontrollid (indutseerimata ATAD3B rakud) omavad sarnast mtDNA jaotuvuse mustrit (joonis 13b), mis potentsiaalselt võiks tähendada, et üleekspresseerivad rakud reageerivad teisiti digitoniini lüüsile, kuigi välismembraan (ja osati ka sisemembraan) lüüsub tavapäraselt. Kristade muutunud morfoloogiline struktuur võiks põhjustada siiski mtDNA jaotuvuse muutumist võrreldes tavaliste HEK293e rakuliiniga.

Tulemustest selgus, et Twinkle helikaasi vähenemisel 72h pärast toimuvad muutused eelkõige mtDNA tasemetes, st Twinkle kaotamisel näib mtDNA koopiaarv langevat. Digitoniini lüüsi tagajärel satub mtDNA rohkem supernatandi fraktsiooni. MAM struktuurid praeguste andmete baasil ei häiru, kuna muutuseid MAM valkude esinemises ei täheldatud.

Seevastu TFAM mahasurumisel 72h möödudes muutub mtDNA lahutuvus oluliselt, kusjuures rohkem mtDNA-d jääb pellet fraktsiooni. Nukleoidi valkude puhul on Twinkle signaalid mõnevõrra tugevnenud. MAM struktuurid hakkavad TFAM kadumisel tugevnema. Muutust on näha nii FACL4, Mfn2 kui VDAC1 puhul, mis TFAM kadumisel muutuvad pellet fraktsioonides prominentsemaks. Seega tugevaim efekt MAM-idele ja nukleoididele esines TFAM *knockdown* puhul.

Mfn2 *knockdown* põhjustab Twinkle vähenemist (aga mitte vastupidi), kuid samas puudub 2-3 päevaga signifikantsus nukleoidile. TFAM järkjärgult veidi väheneb, kuid nukleoidi lahutuvus 72h *knockdown* korral oluliselt ei muutu. Kuigi on näha vähem MAM-struktuure, ei avalda see efekti nukleoidi lahutuvusele.

ATAD3 valgu kui olulise nukleoidi komponendi ekspressiooni muutumisel toimuvad muutused eelkõige MAM-struktuurides. ER-mitokonder kontaktid vähenevad nii ATAD3A *knockdown* kui ATAD3B üleekspressiooni korral.

Võttes kokku käesoleva töö tulemused võib öelda, et nukleoidi organisatsiooni muutused varases nukleoidi häirumise faasis ei avaldanud üldiselt efekti MAM terviklikkusele. Ka vastupidi, ei täheldatud kiiret ja drastilist Mfn2 suunatud MAM manipuleerimise efekti nukleoidide terviklikkusele, kuid lisakatsed peaksid näitama, kas see on vaadeldav pikema aja jooksul või kas MAM genereerimise suurenemisel võiks olla ilmekam efekt. Huvitaval kombel selgus praeguste tulemuste baasil, et selgeim efekt nii nukleoididele kui MAM struktuuridele ilmnes vähenenud TFAM ekspressiooni varases staadiumis. See viitab sellele, et esinevad spetsiifilised tajumismehhanismid (ingl *sensing mechanisms*) nukleoidi terviklikkuse ja signaliseerimisel tsütosoolile, oletatavasti MAM kaudu, kuigi see näib olevat sõltumatu näiteks replikatsiooni intensiivsusest/efektiivsusest (sellele viitab käesolevas töös Twinkle *knockdown*). Hiljuti leiti, et tingimustes, kus esineb mtDNA depletsioon või mitmed deletsioonid mtDNA-s, käitub tsütosoolne dNTP-de populatsioon (ingl *dNTP pool*) osana tajumismehhanismist, andmaks rakule märku mtDNA „staatusest“ (Nikkanen jt, 2016). Käesolevas töös nähtu põhjal aga ei tahetud saavutada tugevat mtDNA depletsiooni ega deletsioone, mistõttu on loogiline spekuloida, et lisa tunnetamise süsteemid võivad olla aktiivsed andmaks rakule signaale nukleoidide „staatusest“ varases staadiumis (st enne kui süsteem on tugevalt kahjustunud).

Kuigi tulemused, mis puudutavad struktuurset valku ATAD3-e, vajavad detailsemat ülevaadet, on endiselt alust arvata, et lisaks saab siin aimu MAM ja nukleoidi terviklikkuse koosmõjust. Antud töö raames saadud tulemused ei välista võimalust, et nukleoidi terviklikkust tajutakse TFAM kontrollitud mehhanismi kaudu, andes seega võib olla olulist informatsiooni mõistmaks mtDNA pakkimise ja segregatsiooniga seotud mitokondriaalseid haiguseid, aga võib olla ka mõistmaks neurodegeneratiivseid haiguseid, mille korral MAM terviklikkuse häirumine rolli mängib.

## KOKKUVÕTE

Inimese mitokondriaalne DNA esineb rakkudes kompleksis erinevate valkudega, moodustades nukleoproteiinkomplekse – nukleoide (Spelbrink jt, 2010). Replikatiivsed nukleoidid assotsieeruvad Twinkle'i kaudu sisemembraanil paikneva kolesteroolirikka mikrodomääniga (Gerhold jt, 2015). Mitokondrite normaalseks talitluseks on oluline mtDNA säilitamine.

Käesolevas töös uuriti mitokondriaalsete nukleoidide struktuuri ja koostise ning MAM-struktuuride muutuseid Twinkle, TFAM, Mfn2 ning ATAD3 funktsiooni häirumisel, kasutades siRNA vahendatud *knockdown* meetodit ning T-REx indutseeritavat süsteemi.

Katsete käigus leiti, et TFAM tase mõjutas MAM struktuure juba varakult, mis hakkasid 72h pärast TFAM kadu tugevnema. Oluline muutus ilmnes ka mtDNA puhul, mille korral mtDNA jäi peale digitoniini lüüsimist vähelahustuvasse nn pellet fraktsiooni.

Erinevalt TFAM *knockdown*'ist ei mõjutanud Twinkle mahasurumine MAM struktuure. Twinkle mõjutas nähtavalt nukleoidide terviklikkust, mille korral vähenes mtSSB, aga ka OXPHOS kompleks IV ja IMM markervalguna kasutatud COXII. Lisaks oli märgata mtDNA lahutuvuse muutust, st mtDNA liikus tendentsiliselt rohkem lahustuvasse fraktsiooni.

MAM-ide moodustumises olulise valgu Mfn2 kaotamisel antud katsete käigus puudus oluline efekt mitokondriaalsetele nukleoididele. MtDNA lahutuvuse korral esines nõrk tendents, st mtDNA vähenes pelletis. Ka MAM-struktuuride muutumises esines nõrk efekt.

ATAD3, nagu ka TFAM, mõjutas MAM struktuure, kuid vastupidiselt TFAM *knockdown*'ile ei toimunud ATAD3 vähenemisel mtDNA lahutuvuse muutuseid. ATAD3B üleekspressioon andis sarnaseid tulemusi nagu ATAD3A mahasurumine, st häirusid MAM struktuurid.

Käesoleva lõputöö käigus leidsin, et kaks nukleoidi valku, TFAM ning mõningal määral ATAD3 edastavad informatsiooni nukleoidide oleku kohta ER-mitokonder kontaktidele. Kuigi edasise töö fookuses on täpse signali ja sellega seotud raja defineerimine, võib öelda, et antud tulemused võiksid olla kasulikud mõistmaks organellide omavahelist koosmõju ning nukleoidide muutuste detekteerimist raku poolt. See aitaks mõista haiguste tekkemehhanisme, mis on seotud mtDNA segregatsiooni häiretega ja ER-mitokonder kontaktsaitide moodustumisega.

# **The interplay between mitochondrial nucleoids and mitochondria associated ER-membranes (MAM) in human cultured cells**

Koit Aasumets

## **SUMMARY**

Human mitochondria possess their own DNA that is organised into protein-DNA complexes referred to as nucleoids. Since mitochondria are critically important for ATP production, they need to function properly. This requires precisely coordinated mtDNA maintenance and distribution throughout the mitochondrial network, because essential genes for oxidative phosphorylation are encoded by the mtDNA. Mitochondrial nucleoids are associated with the inner mitochondrial membrane. Twinkle containing actively replicating nucleoids are associated with cholesterol rich membrane platforms, which appear be connected to ER-mitochondria contacts (MAM) to facilitate mtDNA/nucleoid maintenance/segregation (Gerhold *et al.*, 2015). However it is not known whether or how mitochondrial nucleoids might affect MAM structures or how MAM may influence nucleoids.

The purpose of this work was to firstly study potential changes in MAM, when nucleoids are impaired and secondly to see whether weakened MAM-structures affect mitochondrial nucleoids. To achieve this, siRNA mediated knockdown of Twinkle and TFAM as nucleoid components, Mfn2 as MAM component and ATAD3, a structural mitochondrial protein and nucleoid component, were used.

It was found that the loss of TFAM within 48 to 72 hours has a significant influence on MAM since silencing of TFAM resulted in strengthened MAM contacts. After digitonin treatment mtDNA remained significantly more in pellet fractions pointing towards a yet undescribed re-organisation of nucleoids during the early stage of TFAM-expression reduction. This observation was supported by a detectable increase in Twinkle signals indicating a possible counter measure by the mtDNA maintenance system attempting to avoid mtDNA depletion (reported result of TFAM-loss) through perhaps increased replication.

The loss of Twinkle helicase however had no significant impact on MAM structures, but delivered a slight change in the nucleoid structure. This was expected since loss of Twinkle is reported to result in loss of mtDNA, whereas our interest was to observe possible early changes to nucleoids and MAM without the loss of mtDNA and (consequently) drastically altered nucleoid organisation.

The reduction of the MAM component Mfn2 showed no significant effect on nucleoids, although Twinkle was slightly decreased, but changes in ATAD3 levels disrupted MAM structures. Apart from changes in mtDNA distribution the effect on MAM structures was quite similar to TFAM knockdown.

In the course of this thesis it could thus be shown that two nucleoid proteins, TFAM and to some extent ATAD3 transfer information about the status of nucleoids to the ER-mitochondrial contact protein structures. The recently discovered replication microdomain (in the vicinity of MAM) is likely to be altered or disrupted as the nucleoid structure changes. While we are now setting out to define the precise signal and its pathway, it can be stated that the findings may prove useful for the understanding of the interplay between ER-mitochondria-communication, the detection of nucleoid changes by the cell and thus ultimately add to our understanding of disease development and progression mechanisms that are related to mtDNA segregation disorders, but potentially also neurodegenerative disorders with an involvement of ER-mitochondrial contact site formation.

## TÄNUAVALDUSED

Käesoleva töö autorina soovin tänada siiralt organellide biokeemia uurimisgrupi inimesi – Julija Basikhinat, Mikk Välbet ja Gerda Nelist toetava suhtumise ning meeldejäeva seltskonna eest. Lisaks tänan üldise ja mikroobibiokeemia õppetooli, molekulaarbioloogia õppetooli ning professor Hannest Kollist poolt juhitud taimsete signaalide uurimisrühma inimesi osutatud abi eest.

Eraldi tänan südamest oma suurepärast ning professionaalset juhendajat, organellide biokeemia uurimisgrupi juhatajat ning taimefüsioloogia dotsenti **Joachim Matthias Gerhold**'i, kelle õpetused ja abi on aidanud kaasa töö valmimisele, ning kelle toetus on olnud erakordselt märkimisväärne.

Minu eriline tänu kuulub organellide biokeemia uurimisgrupi liikmele **Julija Bolšakova**'le, kelle asjalikud nõuanded, siiras olek ning positiivsus lõi äärmiselt meeldiva ning produktiivse töökeskkonna.

## KASUTATUD MATERJALID

- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26:211–215.
- Ambro, L., Pevala, V., Bauer, J., Kutejová, E. (2012). The influence of ATP-dependent proteases on a variety of nucleoid-associated processes. *J Struct Biol.* 179: 181-92.
- Baloh, R. H., Schmidt, R. E., Pestronk, A., Milbrandt, J. (2007). Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci.* 27: 422-30.
- Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Sasaki, N., Mihara, K., Ishihara, N. (2013). Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:11863-8.
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P., Harper, J. W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature.* 466: 68-76.
- Bender, A., Krishnan, K. J., Morris, C. M., Taylor, G. A., Reeve, A. K., Perry, R. H., Jaros, E., Hersheson, J. S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R. W., Turnbull, D. M. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet.* 38: 515-7.
- Betz, C., Hall, M. N. (2013). Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol.* 203: 563-74.
- Betz, C., Stracka, D., Prescianotto-Baschong, C., Frieden, M., Demaurex, N., Hall, M. N. (2013). mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 12526-34.
- Bolšakova, J. (2017). DNA metüültransferaasid, mitokondriaalne nukleoid ja mtDNA säilitamine. [Magistritöö]. Tartu: Tartu Ülikool.

- Busch, K. B., Kowald, A., Spelbrink, J. N. (2014). Quality matters: how does mitochondrial network dynamics and quality control impact on mtDNA integrity? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 369: 20130442.
- Chan, N. C., Salazar, A. M., Pham, A. H., Sweredoski, M. J., Kolawa, N. J., Graham, R. L., Hess, S., Chan, D. C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum. Mol. Genet.* 20:1726–1737.
- Charcot, J., Marie, P. (1886). Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev. Med.* 6 p. 138.
- Chen, H., Chomyn, A., 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., 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., Vermulst, M., Wang, Y. E., Chomyn, A., Prolla, T. A., McCaffery, J. M., Chan, D. C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell.* 141:280-9.
- Chen, X. J., Wang, X., Kaufman, B. A., Butow, R. A. (2005). Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science.* 307: 714-7.
- Chen, Y., Dorn, G. W. 2nd. (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science.* 340: 471-5.
- de Brito, O. M., Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 456: 605-10.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26:207–210.
- Delettre, C., Lenaers, G., Pelloquin, L., Belenguer, P., Hamel, C.P. (2002). OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: A novel mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 75:97–107.
- Dimmer, K. S., Scorrano, L. (2006). (De)constructing mitochondria: what for? *Physiology (Bethesda)* 21:233-41.



- Dlasková, A., Engstová, H., Plecítá-Hlavatá, L., Lessard, M., Alán, L., Reguera, D. P., Jabůrek, M., Ježek, P. (2015). Distribution of mitochondrial DNA nucleoids inside the linear tubules vs. bulk parts of mitochondrial network as visualized by 4Pi microscopy. *J Bioenerg Biomembr.* 47: 255-63.
- Ducommun, S., Deak, M., Sumpton, D., Ford, R. J., Núñez Galindo, A., Kussmann, M., Viollet, B., Steinberg, G. R., Foretz, M., Dayon, L. (2015). Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: Identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. *Cell. Signal.* 27:978–988.
- Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C., Olichon, A., Loiseau, D., Reynier, P., Chinnery, P. F., Rotig, A., Carelli, V., Hamel, C. P., Rugolo, M., Lenaers, G. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res.* 21: 12-20.
- Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M. T., Palmer, C. S. (2013). Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 150–161.
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., Pizzo, P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E2174-81.
- Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., Barrientos, A. (2006). Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291: C1129-47.
- Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334: 358–362.
- Garcia, I., Jones, E., Ramos, M., Innis-Whitehouse, W., Gilkerson, R. (2017). The little big genome: the organization of mitochondrial DNA. *Front Biosci (Landmark Ed).* 22:710-721.
- Gerhold, J. M., Cansiz-Arda, S., Löhmus, M., Engberg, O., Reyes, A., van Rennes, H., Sanz, A., Holt, I. J., Cooper, H. M., Spelbrink, J. N. (2015). Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure. *Sci Rep.* 5: 15292.

- Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5: a011080.
- Gincel, D., Zaid, H., Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J.* 358: 147-55.
- Gray, M. W. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4: a011403.
- Gray, M. W., Burger, G., Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481.
- Hagiwara, A., Cornu, M., Cybulski, N., Polak, P., Betz, C., Trapani, F., Terracciano, L., Heim, M. H., Rüegg, M. A., Hall, M. N. (2012). Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab.* 15: 725-38.
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., Su, T. P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 19: 81-8.
- He, J., Cooper, H. M., Reyes, A., Di Re, M., Sembongi, H., Litwin, T. R., Gao, J., Neuman, K. C., Fearnley, I. M., Spinazzola, A., Walker, J. E., Holt, I. J. (2012). Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* 40: 6109-21.
- He, J., Mao, C. C., Reyes, A., Sembongi, H., Di Re, M., Granycome, C., Clippingdale, A. B., Fearnley, I. M., Harbour, M., Robinson, A. J., Reichelt, S., Spelbrink, J. N., Walker, J. E., Holt, I. J. (2007). The AAA<sup>+</sup> protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol.* 176: 141-146.
- Hensen, F., Cansiz, S., Gerhold, J. M., 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: 219-26.
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J., Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* 143: 359-373.
- Hubstenberger, A., Merle, N., Charton, R., Brandolin, G., Rousseau, D. (2010). Topological analysis of ATAD3A insertion in purified human mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 42: 143-50.

- Horner, S. M., Liu, H. M., Park, H. S., Briley, J., Gale, M. Jr. (2011). Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 14590-5.
- Iborra, F. J., Kimura, H., Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol.* 2:9.
- Ishihara, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M., Mizushima, N., Mihara, K., Ishihara, N. (2015). Dynamics of mitochondrial DNA nucleoids regulated by mitochondrial fission is essential for maintenance of homogeneously active mitochondria during neonatal heart development. *Mol Cell Biol.* 35: 211-23.
- Ji, W. K., Hatch, A. L., Merrill, R. A., Strack, S., Higgs, H. N. (2015). Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *Elife* 4: e11553.
- Kang, D., Hamasaki, N. (2005). Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: overview of its multiple roles. *Ann N Y Acad Sci.* 1042:101-8.
- Kanki, T., Nakayama, H., Sasaki, N., Takio, K., Alam, T., Hamasaki, N., Kang, D. (2004). Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci.* 1011: 61-8.
- Kasamatsu, H., Vinograd, J. (1974). Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 43: 695-719.
- Kasashima, K., Nagao, Y., Endo, H. (2014). Dynamic regulation of mitochondrial genome maintenance in germ cells. *Reprod Med Biol.* 13:11-20.
- Kasashima, K., Sumitani, M., Endo, H. (2011). Human mitochondrial transcription factor A is required for the segregation of mitochondrial DNA in cultured cells. *Exp Cell Res.* 317:210-20.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392: 605-8.
- Korobova, F., Gauvin, T. J., Higgs, H. N. (2014). A role for myosin II in mammalian mitochondrial fission. *Curr. Biol.* 24: 409–414.
- Korobova, F., Ramabhadran, V., Higgs, H. N. (2013). An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* 339: 464–467.

- Kucej, M., Butow, R. A. (2007). Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids. *Trends Cell Biol.* 17: 586-92.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 13: 89.
- Lackner, L. L. (2014). Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biology* 12: 35.
- Leal, N. S., Schreiner, B., Pinho, C. M., Filadi, R., Wiehager, B., Karlström, H., Pizzo, P., Ankarcrona, M. (2016). Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid  $\beta$ -peptide production. *J Cell Mol Med.* 20: 1686-95.
- Lewis, S. C., Uchiyama, L. F., Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* 353: aaf5549.
- Manor, U., Bartholomew, S., Golani, G., Christenson, E., Kozlov, M., Higgs, H., Spudich, J., Lippincott-Schwartz, J. (2015). A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife* 4: e08828.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C. A., Sou, Y. S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* 189:211–221.
- McBride, H. M., Neuspiel, M., Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol.* 16: R551-60.
- Merle, N., Féraud, O., Gilquin, B., Hubstenberger, A., Kieffer-Jacquinet, S., Assard, N., Bennaceur-Griscelli, A., Honnorat, J., Baudier, J. (2012). ATAD3B is a human embryonic stem cell specific mitochondrial protein, re-expressed in cancer cells, that functions as dominant negative for the ubiquitous ATAD3A. *Mitochondrion.* 12: 441-8.
- Milenkovic, D., Matic, S., Köhl, I., Ruzzenente, B., Freyer, C., Jemt, E., Park, C. B., Falkenberg, M., Larsson, N. G. (2013). TWINKLE is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication. *Hum Mol Genet.* 22:1983-93.
- Mishra, P. (2016). Interfaces between mitochondrial dynamics and disease. *Cell Calcium.* 60: 190-8.

- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., Chan, D. C. (2014). Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 19:630–641.
- Mishra, P., Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial Dynamics. *JCB* 212: 379-387.
- Naon, D., Scorrano, L. (2014). At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. *Biochim Biophys Acta* 1843:2184-94.
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R., Youle, R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8:e1000298.
- Nikkanen, J., Forsström, S., Euro, L., Paetau, I., Kohnz, R. A., Wang, L., Chilov, D., Viinamäki, J., Roivainen, A., Marjamäki, P., Liljenbäck, H., Ahola, S., Buzkova, J., Terzioglu, M., Khan, N. A., Pirnes-Karhu, S., Paetau, A., Lönnqvist, T., Sajantila, A., Isohanni, P., Tyyntismä, H., Nomura, D. K., Battersby, B. J., Velagapudi, V., Carroll, C. J., Suomalainen, A. (2016). Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism. *Cell Metab.* 23: 635-48.
- Nunnari, J., Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148:1145-59.
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., Matsuda, N. (2015). Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *J. Cell Biol.* 209:111–128.
- Phillips, M. J., Voeltz, G. K. (2016). Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17: 69-82.
- Prudent, J., McBride, H. M. (2016). Mitochondrial Dynamics: ER Actin Tightens the Drp1 Noose. *Curr Biol.* 26: R207-9.
- Rajala, N., Gerhold, J. M., Martinsson, P., Klymov, A., Spelbrink, J. N. (2014). Replication factors transiently associate with mtDNA at the mitochondrial inner membrane to facilitate replication. *Nucleic Acids Res.* 42: 952-67.
- Rajala, N., Hensen, F., Wessels, H. J., 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:e0116726.

- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M. R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R. A., Fogarty, K. E., Rizzuto, R. (2002). Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria. *J Cell Biol.* 159: 613-24.
- Raturi A, Simmen T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta.* 1833:213-24.
- Renard, P., Michel, S., Rommelaere, G., Arnould, T. (2012). Mammalian mitochondrial genetics, genomics and turnover. *Cellular Bioenergetics in Health and Diseases: New Perspectives in Mitochondrial Biology.* 1-83.
- Reznik, E., Wang, Q., La, K., Schultz, N., Sander, C. (2017). Mitochondrial respiratory gene expression is suppressed in many cancers. *eLife.* 6: e21592.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R. J., Fuller, M. T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci.* 116:2763-74.
- Santel, A., Fuller, M. T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci.* 114: 867-74.
- Sarraf, S. A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M. E., Huttlin, E. L., Gygi, S. P., Harper, J. W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature.* 496:372–376.
- Schapira, A. H. (2012). Mitochondrial diseases. *Lancet.* 379: 1825-34.
- Scheffler, I. E. (2008). *Mitochondria*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M. I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J. P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J. C., Gopalacharyulu, P., Orešič, M., Pich, S., Burcelin, R., Palacín, M., 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: 5523-8.
- Shamseldin, H. E., Alshammari, M., Al-Sheddi, T., Salih, M. A., Alkhalidi, H., Kentab, A., Repetto, G. M., Hashem, M., Alkuraya, F. S. (2012). Genomic analysis of mitochondrial diseases in a consanguineous population reveals novel candidate disease genes. *J. Med. Genet.* 49:234–241.

- 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. (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.
- Suomalainen, A., Majander, A., Wallin, M., Setälä, K., Kontula, K., Leinonen, H., Salmi, T., Paetau, A., Haltia, M., Valanne, L., Lonnqvist, J., Peltonen, L., Somer, H. (1997). Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. *Neurology*. 48: 1244-53.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T., Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J Cell Biol.* 175: 901-11.
- Tooth, H. (1886). The peroneal type of progressive muscular atrophy. Dissertation, London.
- Toyoma, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Loson, O. C., Helberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D. C., Shaw, R. J. (2016). AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energetic stress. *Science*. 351:275–281.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 304: 1158-60.
- Vance, J. E. (2014). MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta*. 1841: 595-609.
- Vanstone, J. R., Smith, A. M., McBride, S., Naas, T., Holcik, M., Antoun, G., Harper, M. E., Michaud, J., Sell, E., Chakraborty, P. (2015). DNMT1L-related mitochondrial fission defect presenting as refractory epilepsy. *Eur. J. Hum. Genet.*
- Vendelin, M., Eimre, M., Seppet, E., Peet, N., Andrienko, T., Lemba, M., Engelbrecht, J., Seppet, E. K., Saks, V. A. (2004). Intracellular diffusion of adenosine phosphates is locally restricted in cardiac muscle. *Mol Cell Biochem.* 256-257: 229-41.

- Vincent, J-P., Ziukaite, R., Alexandre, C. (2016). Developmental Biology: Decapentaplegic Controls Growth at a Distance. *Current Biology* 26: R209-R212.
- Wang, Y., 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.* 281:25791-802.
- Waterham, H. R., Koster, J., van Roermund, C. W., Mooyer, P. A., Wanders, R. J., Leonard, J. V. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356:1736–1741.
- Westermann, B. (2011). Organelle dynamics: ER embraces mitochondria for fission. *Curr Biol.* 21: R922-4.
- Yang, L., Long, Q., Liu, J., Tang, H., Li, Y., Bao, F., Qin, D., Pei, D., Liu, X. (2015). Mitochondrial fusion provides an 'initial metabolic complementation' controlled by mtDNA. *Cell Mol Life Sci.* 72: 2585-98.
- Züchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36:449–451.



# LISAD

## Lisa 1 Töös kasutatud lahused

### **10X homogeniseerimispuhver**

400 mM Tris-HCl pH 7,8

250 mM NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

### **Luminool**

1,5 M Tris pH 8,8

37 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

22,5 mg luminool 1 ml DMSO-s

### **20X SSC**

3 M NaCl

300 mM trinaatriumtsitraat dihidraat

### **10X TBS**

1,5 M NaCl

500 mM Tris, pH 7,5

1X TBS puhvris 0,1% Tween 20

### **10X PBS**

1,37 M NaCl

27 mM KCl

81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

17,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **Church puhver**

0,25 M NaPi pH 7,2

1 mM EDTA pH 8,0

0,5 % (w/v) BSA

7% (w/v) SDS

### **Church wash puhver**

40 mM NaPi pH 7,2

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

1X puhvris 20% MetOH

### **1X TN puhver**

25 mM Tris pH 7.4

150 mM NaCl

10% sucrose

1 mM DTT

proteaasi inhibiitorid

1% TX-100

### **Western strip puhver**

200 mM glütsiin pH 2,3

1% SDS

## Lisa 2 Antikehad ja siRNA konstruktid

Tabel A1. Töös kasutatud antikehad.

Primaarantikeha	Tootja ja Cat N°	Antikeha allikas	Lahjendus
TFAM	Abcam <b>ab119684</b>	Hiir	1:10 000
Twinkle 10D	Dr Anu Suomalainen Wartiovaara	Hiir	1:1000
PolG	Santa Cruz <b>sc-5931</b>	Kits	1:500
TOM40	Santa Cruz <b>sc-11414</b>	Küülik	1:1000
VDAC1	Santa Cruz <b>sc-390996</b>	Hiir	1:1000
SSBP	Sigma <b>HPA002866</b>	Küülik	1:3000
HSP60	Santa Cruz <b>sc-376240</b>	Hiir	1:1000
ATAD3	Dr Ian Holt	Küülik	1:50 000
AlkBH1	Abcam <b>ab126596</b>	Küülik	1:500
ATAD3A	HMGU <b>FLJ4D5</b>	Rott	1:50
Mitofusin 2	Santa Cruz <b>sc-100560</b>	Hiir	1:1000
MTCO2	ProteinTech <b>55070-1-AP</b>	Küülik	1:5000
FASTKD2	ProteinTech <b>17464-1-AP</b>	Küülik	1:1000
ACSL4	Santa Cruz <b>sc-271800</b>	Hiir	1:1000
PSEN2	Bethyl Laboratories <b>A304-342A-T</b>	Küülik	1:1000

Tabel A2. Töös kasutatud sekundaarsed antikehad.

Sekundaarantikeha	Tootja ja Cat N°	Antikeha allikas	Lahjendus
anti-goat IgG HRP	Santa Cruz <b>sc-2020</b>	Eesel	1:10 000
anti-mouse IgG HRP	Vector Laboratories <b>PI-2000</b>	Hobune	1:10 000
anti-rabbit IgG HRP	Vector Laboratories <b>PI-1000</b>	Kits	1:10 000
anti-rat IgG-HRPO	Dianova <b>112-035-003</b>	Kits	1:10 000

Tabel A3. Töös kasutatud siRNA konstruktid.

<b>siRNA</b>	<b>Tootja</b>	<b>Kataloogi N°</b>
TFAM	Dharmacon™	<b>M-019734-00-0020</b>
Twinkle (C10orf2)	Dharmacon™	<b>M-017815-01-0020</b>
ATAD3	Dr Helen M Cooper	N/A
MFN2	Dharmacon™	<b>M-012961-00-0005</b>
PSEN2	Dharmacon™	<b>M-006018-02-0005</b>

## **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 nukleoidide ja mitokondritega seotud ER-membraanide (MAM) koosmõju inimrakkudes**“, 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 **31.01.2022** 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, 31.05.2017