

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kerly Niinep

Varajase eluea stressi mõju epigeneetilistele modifitseerijatele

Magistritöö
Geenitehnoloogia
30 EAP

Juhendajad: prof. Anti Kalda, Ph.D

Kaili Anier, Ph.D

Neeme Tõnisson, Ph.D

TARTU 2016

INFOLEHT

Varajase eluea stressi mõju epigeneetilistele modifitseerijatele

Varases elueas kogetud stress võib mõjutada indiviidi arengut pikema aja jooksul ning tekkinud kahjulikud muutused võivad püsida ka täiskasvanueas. Sünnijärgselt on aju veel väga plastiline ning eriti tundlik erinevate stressorite suhtes. Seetõttu võivadki negatiivsed kogemused või pikaajaline hooletusse jätmine varajases elueas põhjustada erinevate psühhopatoloogiate ja haiguste tekke hilisemas eas. Kuigi hetkel veel ei teata täpset mehhanismi, kuidas noorena kogetud stress mõjutab indiviide hilisemas elus, on siiski leitud seoseid varajase eluea stressi ja muutunud geeniregulatsiooni vahel. Geenide pikaajalisem aktiivsus ongi suuresti määratud erinevate epigeneetiliste modifikatsioonide poolt, mistõttu võivad muutused epigeneetilises mustris põhjustada hilisemas eas erinevaid patoloogiaid.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli hinnata varajase eluea stressi mõju epigeneetilistele modifitseerijatele, võttes aluseks maternaalse separatsiooni ajalise dünaamika. Antud töös kasutati stressi tekitamiseks maternaalse separatsiooni (MS) mudelit, kus rotipojad eraldati emast 1.-15. elupäeva jooksul igapäevaselt 180 minutiks. Seejärel vaadeldi maternaalse separatsiooni mõju loomade kehakaaludele, kortikosterooni tasemetele ja erinevatele epigeneetilistele modifitseerijatele.

Katsete tulemusena leiti, et MS suurendas kortikosterooni taset rotipoegade vereplasmas nii MS15 kui ka MS180 rühmal, mis tõestab ka suurenenud stressitaset. Lisaks vähenesid stressi ja hooletuse tagajärjel MS180 rühma loomade kehakaalud. MS mõjutas märgatavalt ka erinevate DNA metüültransferaaside (*Dnmt*-de) mRNA tasemeid, kus esmalt (3. postnataalsel päeval) *Dnmt*-de mRNA tase langes märkimisväärselt rotipoegade juttkehas ja väikeajus, kuid pärast seda, 8. ja 15. postnataalsel päeval, tõusid *Dnmt*-de mRNA tasemed märgatavalt. Samas jäid DNA demetüülija (*Tet1*) mRNA tasemed aga muutumatuks. Lisaks leiti MS-i mõju histoonide modifitseerijatele, kuid väiksemal määral võrreldes mõjuga *Dnmt*-dele.

Märksõnad: epigeneetika, maternaalne separatsioon, juttkeha, väikeaju, qPCR

CERCS kood: B220, B640, B650

The effects of early life stress on epigenetic modifiers

Abstract:

Early life stress could have prolonged effect on individual development and the resulting adverse changes may persist into adulthood. Brain is still very plastic on the perinatal period and particularly sensitive to various stressors. Therefore, negative experiences or long-term neglect in early life may cause various psychopathologies and diseases later in life. Although the exact mechanism how early life stress can affect individual later in life is not yet understood, there have been found some connections between early life stress and altered gene regulation. Long-term activity of genes is largely determined by various epigenetic modifications, changes in the epigenetic pattern may cause variety of pathologies later life.

The general aim of this master's thesis was to assess the effects of early-life stress on epigenetic modifiers, based on the maternal separation and timing. Maternal separation (MS) model was used in this work to induce stress. In this model rat pups were separated on a daily basis from their mother up to 180 minutes on 1.-15. postnatal day. Then the role of maternal separation on the weight of the animals, on corticosterone levels and different epigenetic modifiers was determined.

Our data demonstrated that the MS increased corticosterone levels in the blood plasma of rat pups in both MS15 and MS180 groups, which proves the increased stress levels. In addition, stress and negligence decreased body weights of the rat pups in the MS180 group. MS also significantly influenced the mRNA levels of DNA methyltransferases (*Dnmts*). At first (on postnatal day 3) the mRNA levels of *Dnmts* were significantly decreased in striatum and cerebellum of rats, but thereafter on postnatal days 8 and 15 the mRNA levels of *Dnmts* were increased.. However, the mRNA levels of *Tet1* were unchanged. In addition, MS showed impact on histone modifiers, but to a lesser extent compared to the effect of *Dnmts*.

Keywords: epigenetics, maternal separation, striatum, cerebellum, qPCR

CERCS: B220, B640, B650

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Epigeneetika ja epigeneetilised mehhanismid	8
1.2. Histonide modifikatsioonid	8
1.2.1. Histonide atsetüülimine ja deatsetüülimine	10
1.2.2. Histonide metüülimine	11
1.3. DNA metüülimine	12
1.3.1. DNA metüültransferaasid	12
1.3.2. DNA demetüülimine	13
1.3.3. DNA demetülaasid	14
1.4. Stress ja selle mõju	15
1.5. Maternaalne separatsioon ja epigeneetilised muutused	16
1.6. Epigeneetilised biomarkerid	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1. Töö eesmärk	19
3. MATERJALID JA MEETODID	20
3.1. Katseloomad	20
3.2. Maternaalne separatsioon	20
3.3. Kudede eraldamine ja säilitamine	20
3.4. Geeniekspressiooni analüüs reaalaja kvantitatiivse PCR meetodil	21
3.4.1. RNA eraldamine kudedest	21
3.4.2. cDNA süntees	21
3.4.3. Reaalaja PCR	22
3.5. Kortikosterooni taseme mõõtmine	23
3.6. Western blot analüüs	24
3.7. Katseandmete statistiline analüüs	25
4. TULEMUSED JA ARUTELU	26
4.1. Rotipogade kehakaalude ajaline dünaamika	26
4.2. Kortikosterooni ajaline dünaamika	27

4.3.	<i>Dnmt1</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade juttkehas.....	29
4.4.	<i>Dnmt1</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade väikeajus	30
4.5.	<i>Dnmt3a</i> ekspressioonitasemete muutused rotipoegade juttkehas.....	31
4.6.	<i>Dnmt3a</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade väikeajus	33
4.7.	<i>Dnmt3b</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade juttkehas.....	35
4.8.	<i>Dnmt3b</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade väikeajus	36
4.9.	<i>Tet1</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade juttkehas.....	37
4.10.	<i>G9a</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade juttkehas	39
4.11.	<i>Hdac1</i> mRNA tasemete muutused rotipoegade juttkehas	40
4.12.	Epigeneetiliste modifitseerijate mRNA tasemete muutused leukotsüütides.....	41
4.13.	Arutelu.....	44
5.	JÄRELDUSED.....	47
	KOKKUVÕTE.....	48
	SUMMARY	49
	TÄNUAVALDUSED	51
	KASUTATUD KIRJANDUS	52
	LISA 1	59

KASUTATUD LÜHENDID

ACTH	adrenokortikotroopne hormoon, <i>adrenocorticotropic hormone</i>
AFR	kontrollrühm, <i>animal facility reared</i>
CpG	tsütosiin-guaaniin dinukleotiid, <i>cytosine-guanine dinucleotide</i>
CRH	kortikotropiini vabastav hormoon, <i>corticotropin-releasing hormone</i>
DNMT	DNA metüültransferaas, <i>DNA methyltransferase</i>
GR	glükokortikoidi retseptor, <i>glucocorticoid receptor</i>
HAT	histoonide atsetüültransferaas, <i>histone acetyltransferase</i>
HDAC	histoonide deatsetülaas, <i>histone deacetylase</i>
HMT	histoonide metüültransferaas, <i>histone methyltransferase</i>
HPA	hüpotaalamus-hüpopüüs-neerupealise, <i>hypothalamic–pituitary–adrenal</i>
MR	mineralokortikoidi retseptor, <i>mineralocorticoid receptor</i>
MS	maternaalne separatsioon, <i>maternal separation</i>
OD	optiline tihedus, <i>optical density</i>
PND	postnataalne päev, <i>postnatal day</i>
RNAas	ribonukleas, <i>ribonuclease</i>
SAH	S-adenosüülhomotsüsteiin, <i>S-Adenosylhomocysteine</i>
SAM	S-adenosüülmetioniin, <i>S-Adenosylmethionine</i>
SUMO	ubikvitiini sarnased modifitseerijad, <i>small ubiquitin-like modifier</i>
TET	Tet metüültsütosiini dioksügenaas, <i>Tet methylcytosine dioxygenase</i>
β-ME	2-merkaptöetanool; <i>β-mercaptoethanol</i>

SISSEJUHATUS

Esmane emalik hoolitsus on üks peamisi faktoreid, mis mõjutab indiviidi arengut ka tulevases elus. Varajases lapsepõlves kogetud hülgamine, stress või traumad mõjutavad suuresti tõenäosust erinevate psühholoogiliste häirete tekkeks tulevikus. Sellise keskkonnast sõltuva fenomeni põhjused ei ole veel päris selged, kuid järjest enam avaldatakse artikleid, kus tuuakse välja seosed varajase eluea stressi ja epigeneetilise geeniregulatsiooni vahel. Selliste muutuste paremaks mõistmiseks ja kirjeldamiseks kasutataksegi erinevaid loommudeleid, käesolevas töös maternaalse separatsiooni mudelit. Maternaalse separatsiooni (MS) käigus eraldatakse pojad emast teatud ajaks mingi perioodi jooksul. Rottide puhul viiakse enamasti MS läbi 2-14 päeva vanustel poegadel. Antud perioodi jooksul toimub veel aju väljakujunemine, mistõttu mõjutab stress tugevalt poegade aju arengut ning psüühikat (Molet, et al., 2014).

Genoomi sekveneerimine aitab mõista vaid väikest osa sellest, kuidas toimub geenide aktiveerimine ja reguleerimine. Raku fenotüüp ei sõltu mitte ainult DNA järjestusest, vaid ka sellest, millised geenid on antud hetkel aktiivsed. Epigenoom ehk epigeneetiliste markerite kogum reguleeribki seda, kas geenid on aktiivsed või vaigistatud (Smith & Mill, 2011; Wong, et al., 2011). Kuigi epigeneetilised mehhanismid on hädavajalikud indiviidi esmase arengu vältel, on need aktiivsed ka täiskasvanud isendil. Sellega seoses võib epigeneetiline muster muutuda kas spontaanselt või keskkonna mõjul kogu elu jooksul (Jaenisch & Bird, 2003). Enim on vaadeldud ja kirjeldatud seda, kuidas varajase eluea stress mõjutab *Dnmt*-de regulatsiooni ja seeläbi ka geenide aktiivsust.

Antud magistritöö on üks osa suuremast projektist, mis uurib maternaalse separatsiooni mõju epigeneetilistele modifitseerijatele ning seeläbi ravimisõltuvuse väljakujunemisele. Lõputöö üldeesmärkideks oli välja selgitada, kuidas rotipoegade emast eraldamine ja sellest tekkiv stress mõjutab epigeneetilisi modifitseerijaid. Eeskätt jälgiti stressi mõju erinevate DNA metüültransferaaside, demetüüljate, histoonide metüültransferaaside ja deatsetülaaside mRNA tasemetele rotipoegade juttkehas, väikeajus ning leukotsüütides. Lisaks vaadeldi ka MS mõju loomade kehakaaludele ning kortikosterooni tasemetele rotipoegade vereplasmas. Antud lõputöö teostati Tartu Ülikooli Bio- ja Siirdemeditsiini instituuti Farmakoloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Epigeneetika ja epigeneetilised mehhanismid

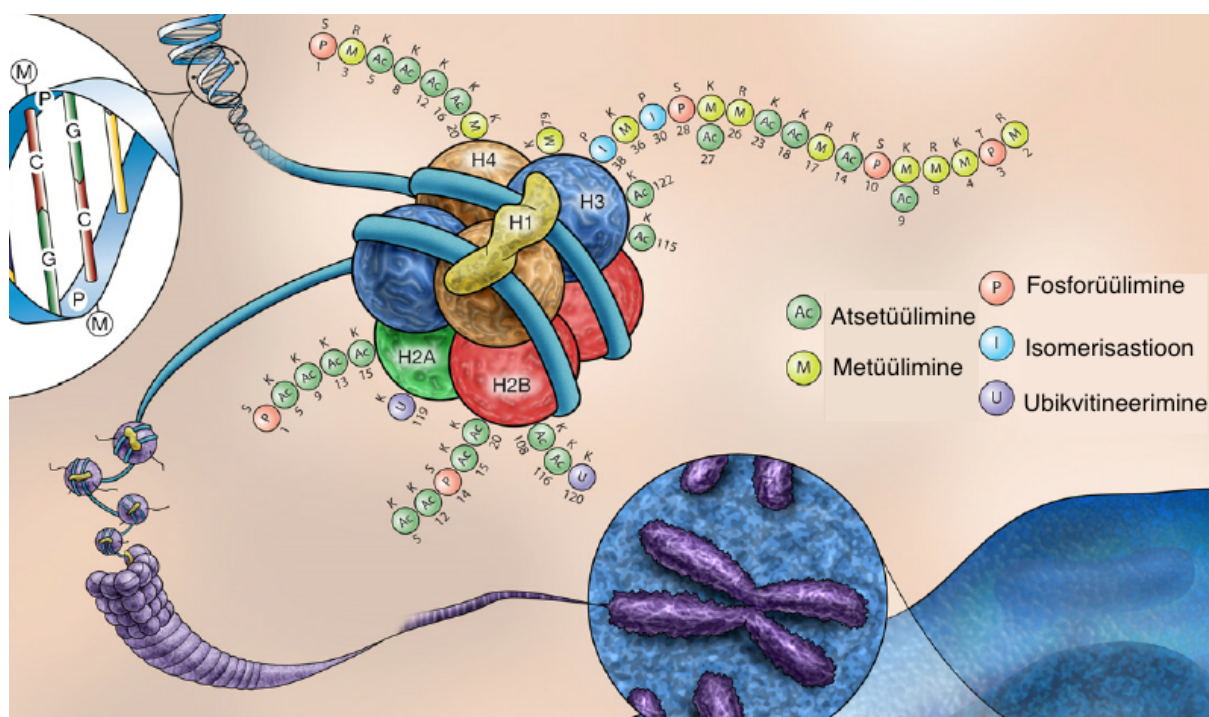
Epigeneetika termini võttis esmalt kasutusele Conrad Hal Waddington 1942 aastal, kirjeldamaks geenide ja nende produktide vahelisi põhjuslikke seoseid, mis loovad fenotüübi (Waddington, 1942; Dupont, et al., 2009). Epigeneetika mõiste on pärast selle esmamainimist paljuski muutunud. Tänapäeval mõeldakse epigeneetika all peamiselt mitootiliselt ja/või meiootiliselt päranduvaid muutuseid, mis mõjutavad geenide avaldumist, kuid ei ole tingitud muutustest DNA nukleotiidses järjestuses (Wu & Morris, 2001). Selliseid muutuseid põhjustavad epigeneetilised modifikatsioonid, mida saab jagada kolme peamisesse gruppi: DNA ja histoonide modifikatsioonid ning geeniekspressiooni reguleerimine mittekodeeritava RNA abil (Minocherhomji, et al., 2012). Enim uuritud on DNA metüülimine ja histoonide modifitseerimine, mis osalevad kromatiini modelleerimises ja seeläbi ka geenide aktiivsuse reguleerimises.

Epigeneetikaalaste artiklite hulk on aastate lõikes järjest suurenenud. Tõus artiklite arvukuses võib olla tingitud sellest, et epigeneetiliste muutuste ning mehhanismide uurimisega tegelevad väga erinevate erialade teadlased, alates geneetikutest ja bioloogidest, lõpetades psühholoogidega. Üha rohkem pööratakse tähelepanu ka sellele, kuidas kõrvalekalded normaalsest epigeneetilisest mustrist võivad põhjustada paljusid erinevaid haiguseid, näiteks põletikke, kasvajaid, samas ka psüühilisi haiguseid, sõltuvusi, mälu halvenemist ja õppevõime langust (Bierne, et al., 2012; Breivik, et al., 2015; Portela & Esteller, 2010). Samas kasutatakse erinevates teadusvaldkondades paralleelselt erinevaid definitsioone epigeneetika mõiste jaoks. Ökoloogia ja füsioloogia eriala artiklid keskenduvad enamasti fenotüübi varieeruvusele, mis on tingitud keskkonnast. Geneetikuid huvitab aga pigem erinevate epigeneetiliste mustrite pärandumine tütarakkudele ning järgnevatel generatsioonidele. Selline mitmeti mõistetavus muudab isegi epigeneetilise fenomeni äratundmise keeruliseks, rääkimata siis selle defineerimisest ja kirjeldamisest (Deans & Maggert, 2015).

1.2. Histoonide modifikatsioonid

Eukarüootsetes organismides on DNA raku tuumas seotud histoonide ning teiste valkudega, mis kokku moodustavad kromatiini. Kromatiin on vajalik DNA korrapäraseks

kokkupakkimiseks histoonide abil, mis moodustavad nukleosoomi. Nukleosoom on kromatiini põhistruktuuriks, mis koosneb histoonide oktameerist, kuhu kuuluvad kaks paari H3 ja H4 histoonide dimeeri ning kaks paari H2A ja H2B histoonide dimeeri (Joonis 1.). Nukleosoomi ümber keritakse 1,65 kordselt ~147 aluspaari pikkune kaheaahelaline DNA lõik, mille vahele jääb veel vaba DNA-d. Sellele lõigule DNA-st kinnitub histoon H1, mis on vajalik kromatiini kõrgemat järku struktuuri pakkimiseks (Strahl & Allis, 2000; Kouzarides, 2007).



Joonis 1. DNA, histoonid ja nende modifikatsioonid. Kaheaahelaline DNA on rakutuumas keritud ümber histoonide kogumiku, mis moodustab nukleosoomi. Nukleosoom koosneb nelja histooni (H2A, H2B, H3, H4) kahest kordusest, lisaks ka histoonist H1, mis muudab kromatiini veelgi kompaktsemaks. Histoonide N-terminaalsete sabade modifitseerimise (atsetüülimisel, metüülimisel, fosforüülimisel, isomerisatsioonil või ubikvitineerimisel) tagajärjel toimuvad muutused kromatiini struktuuris ning DNA kättesaadavuses. Lisaks modifitseeritakse ka DNA-l tsütosiini (CpG dinukleotiidide juures), millele lisatakse metüülmärgiseid. (Barbera & Rastegara, 2010), kohandatud autori poolt.

Iga histoon koosneb kesksest globulaarsest domeenist ning sellest välja ulatuvast N-terminaalsest sabast, millele on võimalik lisada (Joonis 1), kas atsetüül-, metüül-, fosfaatrühm, SUMO valk, ubikvitiin, ADP-riboos või siis viia läbi proteiinijäägi isomerisatsioon. Enamik histoonide translatsioonijärgsetest modifikatsioonidest on ajas muutuvad ning sõltuvad paljudest teistest histooni modifitseerivatest ensüümidest (Berger, 2007). Vastselt lisatud märgised histoonide sabadel võivad kaduda juba minutite jooksul

pärast vastava stiimuli saabumist rakupinnale. See asjaolu raskendab ka modifikatsioonide uurimist, eriti globaalsel tasandil (Kouzarides, 2007).

Kromatiini struktuur ja selle ümber pakitud DNA kättesaadavus sõltub suuresti translatsioonijärgsetest modifikatsioonidest histoonidele ning DNA-le (Joonis 1). Antud modifikatsioonide tõttu võib tekkida kas eukromatiin ehk transkriptsiooniliselt aktiivne (avatud) kromatiin või siis hoopis heterokromatiin ehk transkriptsiooniliselt inaktiivne (suletud) kromatiin (Jenuwein & Allis, 2001; Kouzarides, 2007). Heterokromatiini teket seostatakse rohkearvuliste metüülimistega positsioonides H3K9, H3K27 ja H4K20 ning madalate atsetüülmärgiste hulgaga (Schotta, et al., 2004). Heterokromatiin on vajalik kromosoomi otste kaitsmiseks aga ka selleks, et mitoosis saaks toimuda kromosoomide lahknemine. Seevastu suure osa genomist moodustab hoopis eukromatiin, mis on vajalik aktiivseks transkriptsiooniks ning seda seostatakse rohkete atsetüülmärgistega histoonidel ning lüsiinide H3K4, H3K36, H3K79 trimetüülimisega (Kouzarides, 2007).

1.2.1. Histoonide atsetüülimine ja deatsetüülimine

Histoonide atsetüülimise avastas aastal 1964 Allfrey oma uurimisrühmaga ning praeguseks on sellest saanud kõige põhjalikumalt uuritud histoonide modifikatsioon (Allfrey, et al., 1964). Histoonide lüsiinijääkide atsetüülimine on väga dünaamiline protsess ning seda viivad läbi kaks vastupidise ülesandega ensüümide perekonda. Esiteks histoonide atsetüültransferaasid (HAT), mis lisavad atsetüülrühmi ning teiseks histoonide deatsetüülaasid (HDAC), mis eemaldavad neid (Hodawadkar & Marmorstein, 2007).

HAT-id katalüüsivad atsetüülrühma ülekannet atsetüülkoensüüm-A-lt lüsiini külghela ϵ -amino grupele. Atsetüülrühma lisamine neutraliseerib lüsiini positiivse laengu ning nõrgestab kromatiini struktuuri, mistõttu saavad transkriptsioonifaktorid DNA-le paremini ligi ning suureneb transkriptsiooni osakaal. HAT-id jagunevad kahte suuremasse gruppi tüüp-A ja tüüp-B atsetüültransferaasid. Tüüp-A HAT-id asuvad rakutuumas ja atsetüülivad kromatiinis asetsevate histoonide N-terminaalseid sabasid. Tüüp-B HAT-id asetsevad seevastu tsütoplasmas ja atsetüülivad peamiselt vastvalminud histoone (Yang & Seto, 2007).

Histoonide deatsetüülaasi ensüümid (HDAC-d) tegelevad vastupidiselt HAT-idele lüsiinide deatsetüülimisega, mis muudab lüsiinide laengud tagasi positiivseks ja stabiliseerib kromatiini. Sellega kaasneb enamasti lokaalne kromatiini kondenseerumine ja transkriptsiooni

repressioon. Lisaks histoonidele deatsetüülivad HDAC ka p53, E2F, α -tubulin ja MyoD. HDAC-d jagunevad nelja klassi: klass I (HDAC 1, 2, 3, 8), mis asub enamasti rakutuumas; klass II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10) võib leida nii rakutuumast kui ka tsütoplastmast; klassi IV kuulub vaid HDAC 11. Klassi I, II ja IV on oma järjestuselt sarnased ning vajavad deatsetüülimiseks Zn^{2+} . Klassi III nimetatakse ka SIR2 ehk sirtuini perekonnaks, see klass erineb teistest nii oma järjestuse kui ka kofaktori poolest, milleks siin on NAD^+ (De Ruijter, et al., 2003; Hodawadekar & Marmorstein, 2007).

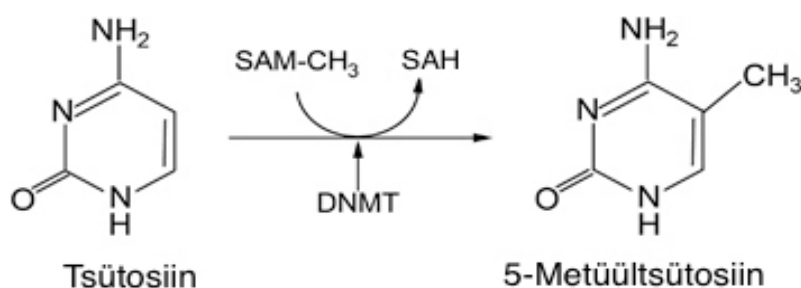
1.2.2. Histoonide metüülimine

Histoonide metüülimist viivad läbi histoonide metüültransferaasid (HMT), mis lisavad metüülrühmasid lüsiinide (K) või arginiinide (R) kõrvalahelale, saades metüülrühmad S-adenosüülmetioniinilt (SAM). Ka meie poolt vaadeldud G9a (EHMT2) kuulub HMT-de hulka, ning viib läbi H3K9 dimetüülimist. Erinevalt DNA metüülimisest, mida seostatakse transkriptsiooni langusega, sõltub histoonide metüülimise mõju lisatud metüülrühmade arvust ning nende asukohast. Lisaks ei mõjuta metüülrühmad otseselt kromatiini laengut ja struktuuri vaid on pigem seondumiskohaks teistele valkudele ja kofaktoritele, mis seda teevad. Lüsiine on võimalik mono-, di- või trimetüülida samas kui arginiinid saavad olla, kas mono- või dimetüülitud (Ng, et al., 2009). Kui algselt peeti histoonide metüülmärgiseid püsivaks, siis praeguseks on avastatud terve hulk ensüüme, mis vastutavad arginiinidelt ja lüsiinidelt metüülmärgiste eemaldamise eest. Demetüülimist lüsiinidel ja arginiinidel viiakse läbi amiinide oksüdeerimise, hüdroksüülimise või deiminatsiooni abil (Cloos, et al., 2008).

Kõige enam uuritud lüsiini metüülmärgised asuvad positsioonides H3K4, K9, K27, K36, K79 ja H4K20. Nendest H3K4me3, K36me3 ja K79me3 seostatakse aktiivse transkriptsiooniga ning H3K9me2/3, H3K27me3, H4K20me3 seostatakse madala transkriptsiooni tasemega (Martin & Zhang, 2005). Arginiinil esineb histoonide metüülimist positsioonides H3R2me2a, R8me2s, R17me2a, R26me2a ja H4R3me2. Transkriptsiooni repressiooniga on nendest seotud H3R2me2a, R8me2s ning aktivatsiooniga on seotud R17me2a, R26me2a ja H4R3me2 (Ng, et al., 2009; Lorenzo & Bedford, 2011).

1.3. DNA metüülimine

Geenide aktiivsust määravad lisaks histoonide modifikatsioonidele, ka DNA nukleotiidide metüülimine/demetüülimine. DNA metüülimine on stabiilne protsess, millega enamasti kaasneb transkriptsiooni inhibeerimine ilma muutusteta DNA nukleotiidises järjestuses (Joonis 1). Lisaks on metüülimisel tähtis roll ka X-kromosoomi inaktivatsioonil, spetsiifiliste kudede tekkimisel ning geenide vermimisel (Bonasio, et al., 2010). DNA metüülimise käigus lisatakse (Joonis 2.) DNA metüültransferaaside (DNMT) vahendusel metüülrühm ($-CH_3$) tsütosiini 5' süsinikule, mille käigus tekib 5-metüültsütosiin (5mC). Metüülrühma doonoriks on SAM, mis pärast metüülrühma loovutamist muutub S-adenosüülhomotsüsteiiniks (SAH) (Sheroy, et al., 2012).



Joonis 2. Tsütosiin ja 5-metüültsütosiin. Tsütosiini modifitseerimine 5-metüültsütosiiniks DNA metüültransferaaside (DNMT) abil. Metüülrühma ($-CH_3$) doonoriks on S-adenosüülmetsioniin (SAM), mis pärast metüülrühma loovutamist muutub S-adenosüülhomotsüsteiiniks (SAH). (Eileen & Nolan, 2010), kohandatud autori poolt.

Enamik metüülitud tsütosiine paikneb tsütosiin-guaaniin dinukleotiidises (CpG) järjestuses, mis imetajatel on 60-90% tõenäosusega metüülitud (Klose & Bird, 2006). CpG järjestused ei asetse ühtlaselt üle kogu genoomi, vaid moodustavad tihti suurema tihedusega alasid: CpG saari (~0,5-3 kb pikad), kus tsütosiin-guaaniin dinukleotiidide sisaldus on 60-70%, erinevalt ülejäänud genoomist, kus CpG sisaldus on $\leq 20\%$ (Bird 2002, Goll ja Bestor, 2005). Imetajatel asuvad umbes 50% CpG saartest aktiivsete geenide 5' promootori piirkonnas ja on normaalsetes rakkudes enamasti mittemetüülitud (Robertson & Wolffe, 2000; Tucker, 2001).

1.3.1. DNA metüültransferaasid

DNA metüülimist viivad läbi DNA metüültransferaaside (DNMT) perekonda kuuluvad ensüümid, mis jagunevad kolme peamisesse gruppi: DNMT1, DNMT2 ja DNMT3. Metüülmustrite säilumise eest replikatsiooni käigus vastutab DNMT1, mis omab suuremat

afiinsust just hemimetüülitud kaheaahelalise DNA suhtes, ehk antud ensüüm viib läbi metüülmustrite kopeerimist vanemahelalt uuele, sünteesitud ahelale (Goll ja Bestor, 2005). DNMT2 on tugevalt konserveerunud ensüüm, mida peetakse teiste DNA metüültransferaaside homoloogiks. Erinevalt teistest metüültransferaasidest on DNMT2 metüülimise aktiivsus madal. See võib olla tingitud hiljutisest avastusest, et DNMT2 ei metüüli mitte DNA-d vaid tRNAd, eeskätt tsütosiin 38 aspartaathappe antikoodon silmuses, mistõttu on DNMT2 tuntud ka kui tRNA aspartaathappe metüültransferaas 1 (*Trdmt1*) (Goll & Bestor, 2005; Goll, Kirpekar, et al. 2006).

DNMT3 perekonna ensüümid osalevad *de novo* metüülmustrite loomises ja jagunevad omakorda DNMT3a ja DNMT3b. Mõlemad ensüümid on sarnase ülesehitusega: koosnedes pikemast varieeruvast N-otsa domeenist ning lühemast konserveerunud C-otsa domeenist. N-ots on vajalik DNAl õige koha äratundmiseks ning valkudega seondumiseks (Liu, et al., 1998) ning konserveerunud C-otsas asuvad katalüütiline tsender ning kofaktorite seondumissaidid (Margot, et al., 2003). Lisaks kuulub siia perekonda ka DNMT3L (DNMT3-Like valk), mis omab homoloogiat DNMT3a ja DNMT3b-ga, kuid ei oma metüültransferaasi aktiivsust. DNMT3L on peamiselt vajalik globaalseks metüülimiseks iduteerakudes ning genoomivermimisel (Bourchis, et al., 2001). DNMT3L kinnitub mittemetüülitud kromatiiniga stimuleerides DNMT3a ja DNMT3b katalüütilist aktiivsust ja soodustades nende seostumist DNA-ga (Hata, et al., 2002).

1.3.2. DNA demetüülimine

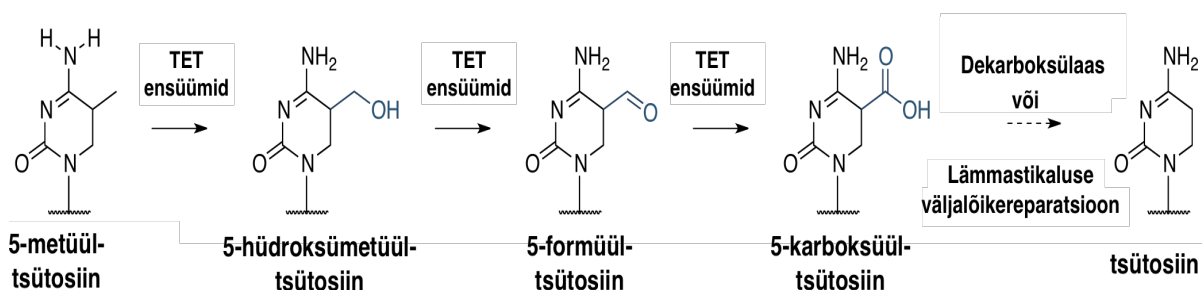
Erinevalt DNA metüülimisest, mille kohta on hulgaliselt informatsiooni, on teadmised DNA demetüülimise kohta üsna vähesed (Kapoor, et al., 2005). DNA demetüülimine kujutab endast metüülrühma eemaldamist 5-metüültsütosiinilt. Imetajatel toimub pärast viljastumist kaks suuremat demetüülimise lainet. Esimene metüülrühmade eemaldamine leiab aset pärast viljastumist sügoodis, kui metüülimise tase hakkab langema ja on madalaim blastotsüüdi tekkel. Teine demetüülimise laine leiab aset ürgsetes idurakkudes pärast migratsiooni valmivasse gonaadi (Cristina & Leonhardt, 1999).

Antud protsess võib olla kas mingi teatud koha spetsiifiline/globaalne või siis aktiivne/passiivne. Kohaspetsiifilisel demetüülimisel peavad olema regulatoorsed elemendid suunatud teatud geenijärjestusele, kus need saavad reguleerida geeni aktiivsust (Kress, et al., 2001). Samas globaalne demetüülimine võib aset leida kas aktiveeritud demetüülimist

läbiviivate ensüümide toimetel või juhul kui DNMT-de töö on takistatud (Cardoso & Leonhardt, 1999). Asukohapõhine demetüülimine toimub enamasti koespetsiifilistes geenides samas kui globaalne demetüülimine leiab aset näiteks embrüo arengul (Weiss & Cedar, 1997). Aktiivse demetüülimise korral eemaldatakse 5-metüültsütosiinilt metüülrühm ensümaatilise protsessi käigus. Passiivse demetüülimise ajal kaob 5mC replikatsiooni käigus vigase DNMT1 ensüümi tõttu, mis ei lisa metüülrühma uuele ahelale. Enamasti mõistetakse seda, kuidas leiab aset passiivne demetüülimine, kuid aktiivse demetüülimise kohta on veel vähe informatsiooni (Kohli & Zhang, 2013).

1.3.3. DNA demetülaasid

Aktiivse demetüülimise läbiviijateks on TET perekonna metüüldioksügenaasi ensüümid. TET perekond koosneb TET1, TET2 ja TET3 ensüümidest, mis viivad läbi metüülrühma eemaldamist (Joonis 3.) 5-metüültsütosiinilt (5mC) mistõttu tekib 5-hüdroksümetüültsütosiin (5hmC). Lisaks viivad TET ensüümid läbi ka 5mC oksüdeerimist 5-formüültsütosiiniks (5-formylecytosine; 5-fC), ja 5-karboksüültsütosiiniks (5-carboxylcytosine; 5-caC), mis hiljem muudetakse tagasi tsütosiiniks (Wu, et al., 2014).

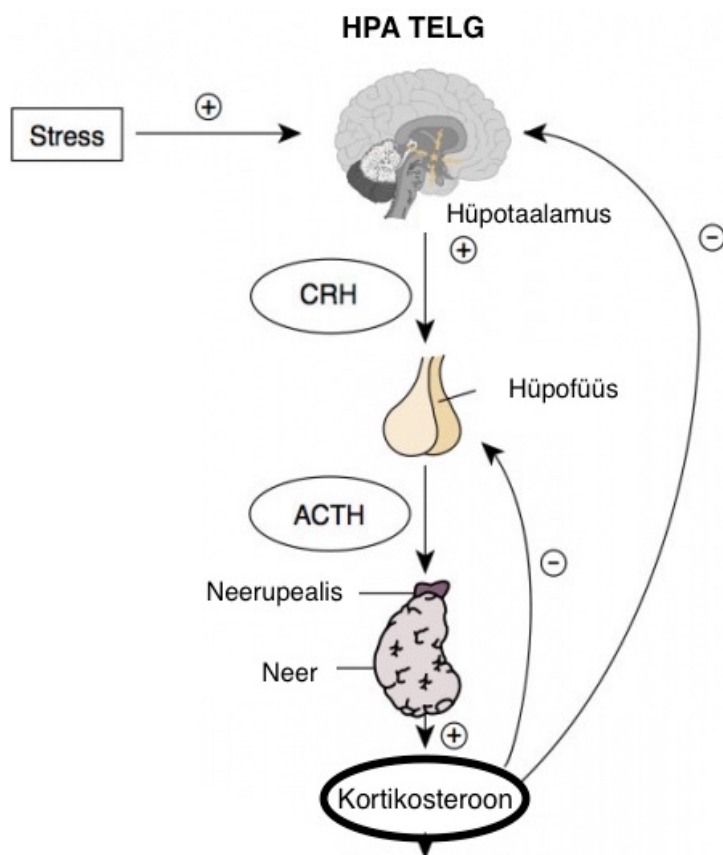


Joonis 3. 5-metüültsütosiin ja selle oksüdatsioon TET ensüümide abil. Antud joonis kirjeldab 5-metüültsütosiini oksüdatsiooni 5-hüdroksümetüültsütosiiniks ja selle edasist oksüdatsiooni 5-formüültsütosiiniks ning 5-karboksüültsütosiiniks, mis muudetakse seejärel dekarboksülaasi või lämmastikaluste väljalõikereparatsiooni abil tagasi tsütosiiniks. (Wu & Zhang, 2010), kohandatud autori poolt.

TET1 ja TET2 on enim leitavad embrüonaalsetes tüvirakkudes, TET3 esineb rohkem ootsüütides ja sügootis (Tan & Shi, 2012). Kõiki kolme TET perekonna ensüüme esineb ka ajus, kuid kõrgemalt on ekspresseeritud TET2 ja TET3, samas täiskasvanu ajus on mälu ning õppimisvõimega seotud kõige enam TET1 (Rudenko, et al., 2013).

1.4. Stress ja selle mõju

Stress on enamlevinud definitsiooni kohaselt korduvate või pikaajaliste ärritajate (stressorite) toimel tekkiv pingeseisund, mis on tingitud kohanemiskõhast keskkonnaga. Stress aktiveerib hüpotaalamus-hüpofüüs-neerupealise (HPA) telje (Joonis 4.) ning glükokortikoidide sekretsiooni neerupealistest. Glükokortikoidide tootmine organismis on vajalik homöostaasi taastamiseks ning pingelisest olukorrast pääsemiseks (Nicolaidis, et al., 2015). Stressi signaal saabudes hakkavad hüpotaalamuse paraventriculaarse tuuma rakud tootma kortikotropiini vabastavat hormooni (CRH) ja arginiin-vasopressiini (AVP). CRH liigub edasi hüpofüüsi eessagarasse ja aktiveerib adrenokortikotroopse hormooni (ACTH) tootmist. ACTH indutseerib omakorda glükokortikoidide (inimestel kortisooli, rottidel ja hiirtel kortikosterooni) sekretsiooni neerupealistest verre. Glükokortikoidid on steroidhormoonid, mis omavad toimet peaaegu kõigis kudedes ja organites (Bamberger, et al., 1996; Lupien, et al., 2009).



Joonis 4. HPA telg. Stressisignaali saabudes hakkab hüpotaalamus tootma kortikotropiini vabastavat hormooni (CRH), mis liigub edasi hüpofüüsi eessagarasse ja aktiveerib adrenokortikotroopse hormooni (ACTH) tootmist. ACTH indutseerib omakorda glükokortikoidide (kortikosterooni) sekretsiooni neerupealistest. Kortikosteroon omakorda mõjutab negatiivselt CRH ja ACTH tootmist, läbi negatiivse tagasiside mehhanismi. (Hiller-Sturmhofel & Bartke, 1998), kohandatud autori poolt.

HPA telje vastus stressile sõltub suuresti sellest, kui hästi suudavad glükokortikoidid seonduda glükokortikoidi (GR) või mineralokortikoidi (MR) retseptoritega hüpotaalamuses ja hüpofüüsis ning reguleerida seal CRH ja ACTH tootmist läbi negatiivse tagasiside mehhanismi. Glükokortikoididel on suurem afiinsus mineralokortikoidi retseptoritele ning madalam seostumise afiinsus glükokortikoidi retseptoritele. Kõrgenenud glükokortikoidide tase organismis ning seeläbi ka suurenenud seondumine GR-le inhibeerib HPA telje aktiivsust (Smith & Vale, 2006; Herman, et al., 2012). Glükokortikoidide kõrgenenud taset organismis seostatakse paljude erinevate probleemidega nagu südame- ja veresoonehaigused, mäluhäired, osteoporoos, II tüüpi diabeet ja immuunsüsteemi funktsioonilangus (Goosens & Sapolsky, 2007). Enim on uuritud seoseid depressiooni ja kõrge glükokortikoidide basaaltasemete ning posttraumaatilise stressihäire ja madala glükokortikoidide tasemete vahel (Burke, et al., 2005).

1.5. Maternaalne separatsioon ja epigeneetilised muutused

Maternaalne separatsioon (MS) ehk poegade eraldamine emast mingi aja jooksul, omab mõju nii aju arengule kui ka psüühikale pikemas perspektiivis (Macri, et al., 2008). Tugev side ema ja poja vahel tagab parema vastupidavuse füüsilistele ja psüühilistele häiretele tulevikus. Nii rottidel kui ka inimestel seostatakse lapseas kogetud vägivalda või vanemliku hoolitsuseta jätmist suurenenud riskiga erinevate sõltuvuste, kardiovaskulaarsete haiguste, diabeedi, depressiooni kui ka skisofreenia väljakujunemisel vanemas eas (Champagne & Curley, 2009). Inimestel ja rottidel on leitud, et varajase arengu jooksul kogetu mõjutab geenide ekspressioonitaset ning on mingil määral reguleeritud epigeneetiliste mehhanismide poolt (McGowan, et al., 2009).

Selleks, et mõista, kuidas varajases elueas kogetud stress mõjutab järglaste edasist elu, kasutatakse loomudeleid. Varajase eluea stressi uurivaid loomudeleid saab suuresti jagada kaheks: sünnieelsed (prenataalsed) ja sünnijärgsed (postnataalsed) loomudelid. Prenataalsetes mudelites tekitatakse stress alles emaülas olevatele loomadele läbi ema mõjutamise. Antud manipulatsioonides tekitatakse tiinemale emasloomale stressi näiteks kitsas ja valgustatud ruumis olemise, müra, valgussähvatuste, elektrišoki või sünteetiliste glükokortikoidide süstimise kaudu. Emale glükokortikoidide süstides liiguvad need läbi platsenta lootenii ning mõjutavad HPA telje regulatsiooni. Ka teised stressi tekitavad mudelid mõjutavad just HPA telje regulatsiooni (Lupien, et al., 2009; Brunton, 2013).

Postnataalsete mudelite puhul eraldatakse katseloomade pojad emast teatud ajaks mingi perioodi jooksul. Rottide puhul viiakse enamasti MS läbi varajases postnataalses faasis, ehk kuni 21 päeva vanuseni (peamiselt 2-14 päeva vanustel poegadel). Antud perioodil toimub veel aju väljakujunemine: aksonite ja dendriitrakkude areng ning sünapsite stabiliseerumine, mistõttu mõjutab tugev stress rotipoegade aju arengut (Molet, et al., 2014). Sünnijärgselt traumeeritud rotipojad erinevad oma käitumiselt kontrollrühmast ka nädalaid pärast stressi tekitanud sündmuse möödumist. Sellist käitumist seostatakse muutustega HPA telje regulatsioonis (Daniels, et al., 2009).

Maternaalse separatsiooni käigus moodustatakse enamasti kolm rühma, kus esimene on kontrollrühm ehk AFR (*animal facility rearing*): loomad keda häiritakse vaid kord nädalas puuride koristamise ajal, teiseks rühmaks on lühike MS (kutsutakse ka “käteldud” rühmaks), ehk rühm, kus loomi eraldatakse emast vaid lühiajaliselt (3-15 min) ning kolmandaks rühmaks on pikk MS, kus poegi eraldatakse üheks kuni kuueks tunniks päevas (Plotsky & Meaney, 1993). Käteldud ja kontrollrühma loomade tulemused ei erine nii suuresti, sest stress, mis tekitatakse on vaid lühiajaline ning kerge. Seevastu pikka aega emast eraldatud poegadel suureneb stress märgatavalt kehatemperatuuri languse, kontakti- ja toidupuuduse tõttu (Macri & Würbel, 2006).

Iga aastaga suureneb artiklite hulk, kus näidatakse seost varajase eluea stressi ja erinevate epigeneetiliste muutuste vahel organismis. Erinevad epigeneetilised mehhanismid aitavad kaasa organismide kohanemisele muutuvast keskkonnas läbi geenide ekspressioonitaseme reguleerimise ja antud muutused võivad püsida ka täiskasvanueas (Murgatroyd, et al., 2009). Enim on uuritud epigeneetiliste mehhanismide mõju varajase eluea stressi puhul glükokortikoidide tasemetele (Liu, et al., 1997; Weaver, et al., 2004). Varasemad tööd on näidanud seost emaliku hoolitsuse ja glükokortikoidide mRNA tasemete vahel, mis on reguleeritud läbi GR geeni (*Nr3c1*) promootorala metüülimise. Erinevates katsetes on leitud, et GR mRNA tase on kõrgem nende poegade hipokampuses, kes on saanud esimestel elunädalatel paremat vanemliku hoolt, võrreldes stressis loomadega. GR geeni mRNA tase langus on tingitud ekson 1₇ promootorala suurenenud metüülimisest (Weaver, et al., 2004; Hellstrom, et al., 2012). Vastupidised tulemused said oma katsetes aga Daniels koos kolleegidega (2009), kes ei leidnud mingeid muutusi metüülmustris ekson 1₇ GR promootoris. Nad arvasid, et varieeruvus tulemustes võib olla põhjustatud katsete erinevast ülesehitusest, sest Daniels oma kolleegidega kasutas stressi tekitamiseks maternaalset separatsiooni, samas

kui Weaver ja tema kolleegid vaatlesid loomi, kellel stress oli tekkinud nõrgast vanemlikust hoolest (emad ei lakkunud/ei toitnud piisavalt oma poegi) (Daniels, et al., 2009). Lisaks on uuritud ka võimalusi, kuidas varajase eluea stressist tekkinud epigeneetilisi modifikatsioone muuta läbi metüülmärgiste taset alandavate ravimite või stressis loomade asendusema hoolde andmise abil (Weaver, 2007).

1.6. Epigeneetilised biomarkerid

Viimastel aastatel on suurenenud huvi niinimetatud epigeneetiliste biomarkerite leidmiseks psühhiaatriliste ja neuroloogiliste haiguste riski hindamisel, diagnoosimisel ning ravi jälgimisel. Epigeneetilisi biomarkerid võib defineerida kui normaalseid või patoloogilisi protsesse või ravimite toimest põhjustatud farmakoloogilisi reaktsioone, mida saab objektiivselt mõõta ja mis on olulisel määral seotud epigeneetiliste mehhanismidega (Biomarkers Definitions Working Group, 2001; García-Giménez, et al., 2015). Kliinilises olukorras on nii kesk kui ka perifeerne närvikude raskesti kättesaadav ja see raskendab nende kudede analüüsimist haiguse korral. Meie oma uuringutes keskendusime epigeneetiliste biomarkerite määramisele leukotsüütides, eesmärgiga hinnata, kas tugev stress mõjutab epigeneetilises regulatsioonis osalevate geenide ekspressioonitaset sarnaselt aju struktuuridega ka leukotsüütides.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärk

Käesolev magistritöö hõlmab ühte osa meie uurimisrühma suuremast teadustööst, mis uurib maternaalse separatsiooni mõju epigeneetilistele modifitseerijatele ning seeläbi ravimisõltuvuse kujunemisele. Minu töö üldeesmärgiks oli hinnata varajase eluea stressi mõju epigeneetilistele modifitseerijatele võttes aluseks MS-i ajalise dünaamika. Sellest lähtuvalt püstitati antud töö jaoks järgmised tööülesanded ja eesmärgid:

Töö spetsiifilisemad eesmärgid olid:

- Hinnata varajase eluea stressi mõju rotipoegade kehakaalule ja stressihormooni kortikosterooni tasemetele rotipoegade vereplasmas MS-i järgselt postnataalsetel päevadel (PND) 3, 8 ja 15.
- Määrata DNA metüültransferaaside (*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*) ning DNA demetülaasi (*Tet1*) ekspressioonitase maternaalse separatsiooni järgselt rotipoegade juttkehas ja väikeajus võttes arvesse separatsiooni ajalise dünaamika.
- Määrata histoon metüültransferaasi (*G9a*) ja histoon deatsetülaasi (*Hdac1*) ekspressioonitase maternaalse separatsiooni järgselt rotipoegade juttkehas ja väikeajus.
- Hinnata, kas varajase eluea stress võib muuta lisaks ajukoele *Dnmt1*, *Dnmt3a* ja *Dnmt3b* ekspressioonitaset perifeersetes vererakkudes (leukotsüütides) MS-i järgselt.

3. MATERJALID JA MEETODID

3.1. Katseloomad

Kõik loomadega läbi viidud katsed on kooskõlas Euroopa Liidu direktiiviga (86/609/EEC) ning on heaks kiidetud Tartu Ülikooli arstiteaduskonna eetikakomitee poolt. Katseloomadena kasutati isaseid Wistar liini rotte (Harlan Laboratories, Holland), keda hoiti standardsetes polüpropüleenist puurides termoneutraalses keskkonnas ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), 12 h valguse/pimeduse tsükli juures. Loomadel oli vaba juurdepääs toidugraanulitele ja joogiveele.

3.2. Maternaalne separatsioon

Isased rotipojad jagati esimesel sünnijärgsel päeval (PND1) juhuslikult kolme alljärgnevasse rühma:

1. **Kontrollrühm (AFR)** – kahe esimese elunädala jooksul (PND1-15) viibisid rotipojad kogu aja ema juures ja neid ei häiritud. Rotipoegi liigutati vaid puuride koristamise ajaks.
2. **„Käteldud” rühm (MS15)** – rotipojad (PND2-15) eraldati igapäevaselt 15 minutiks ema juurest, käteldi ning asetati teineteisest eraldi lauale, seejärel tagasi puuri.
3. **Maternaalse separatsiooni rühm (MS180)** – rotipojad (PND2-15) eraldati igapäevaselt 180 minutiks ema juurest ning asetati teineteisest eraldi üksikutesse puuridesse. Katse lõppedes pandi pojad tagasi ema juurde kodupuuri.

MS15 ja MS180 rühma loomad tõsteti iga päev (PND2-15) ema juures ära kell 12.00 ning pärast separatsiooni lõppu jälgiti ema ja poegade käitumist puuris 10 minuti jooksul.

3.3. Kudede eraldamine ja säilitamine

Molekulaarbioloogiliste analüüside läbiviimiseks eutaniseeriti 15 päeva vanused rotipojad dekapitatsiooni teel. Kella 10 ja 11 vahel koguti rotipoegadelt vereplasma ning nende ajast eraldati väikeaju ja juttkeha, mis koheselt jahutati külmal alusplaadil ning säilitati -80°C juures kuni analüüside läbiviimiseni.

3.4. Geeniekspressiooni analüüs reaalse ja kvantitatiivse PCR meetodil

3.4.1. RNA eraldamine kudedest

RNA eraldamiseks väikeajust ja juttkehas kasutati *RNeasy Mini Kiti* (Qiagen, Hilden, Saksamaa) ja vastavat tootjafirma poolt koostatud protokoll. Ühtlaste koguste jaoks kaaluti proovid (~10 mg) ning asetati 1,5 ml Eppendorfi tuubidesse. Igasse tuubi lisati 350 µl lüüsipuhvrit (RLT ja β-ME segu) ning homogeniseeriti pestli abil. Vajalik on proovi maksimaalne homogeniseerimine, et eralduks võimalikult suur hulk RNA-d ning toimuks tugev seostumine kolonni membraanidele. Saadud lüsaati tsentrifugeeriti 3 minuti jooksul 13000 g juures ning supernatant eraldati ja tõsteti uude puhtasse tuubi. Supernatandile lisati võrdses mahus jääkülma 70% etanooli, mis tõhustab RNA seostumist kolonni membraanile. Proovid kanti edasi spetsiaalsesse RNeasy kolonni, tsentrifugeeriti 30 sekundit 8000 g juures ja kolonni põhja kogunenud läbivool visati ära. Esmalt lisati membraanile 700 µl pesupuhvrit (RW1 *buffer*) ning tsentrifugeeriti 30 sekundit 8000 g juures. Läbivool visati ära ning seejärel lisati membraanile kaks korda 500 µl pesupuhvrit (RPE *buffer*) ning tsentrifugeeriti kolonni kaks korda (15 sekundit ja 2 minutit 8000 g juures). RNA elueeriti membraanilt 30 µl RNAasi vaba veega ning tsentrifugeeriti 1 minut 8000 g juures. Isoleeritud RNA sisaldus mõõdeti NanoDrop (ND-100) spektrofotomeetril vahetult enne cDNA sünteesi ja ülejäänud RNA säilitati -80°C juures.

3.4.2. cDNA süntees

RNA-st sünteesiti cDNA kasutades RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitti (Thermo Scientific, K1622). cDNA sünteesimiseks võeti 0,2 µg RNA-d, millele lisati juurde 1 µl oligo(dT)₁₈ praimerit ja RNAaside vaba vett kuni proovi koguruumala oli 12 µl. Seejärel segati proove vorteksil ning tsentrifugeeriti põgusalt ja asetati 5 minutiks 65°C juurde termotsüklerisse. Proovide kuumutamine on vajalik praimerite paremaks seostumiseks ning sekundaarstruktuuride tekke vältimiseks. Pärast proovide kuumutamist, asetati proovid koheselt jääle, ning tsentrifugeeriti lühiajaliselt.

Järgnevalt lisati proovidele 4 µl 5 x reaktsioonipuhvrit, 1 µl RNAasi inhibiitorit *RiboLockTM*, 2 µl 10mM dNTP segu ning 1 µl *M-MuLV* pöördtranskriptaasi. Proove segati, tsentrifugeeriti lühiajaliselt ja asetati 60 minutiks 42°C juurde termotsüklerisse. Reaktsiooni lõpetamiseks tõsteti termotsükleri temperatuuri 70°C-ni, proove hoiti antud temperatuuril 5 minutit ning cDNA säilitati -80°C juures.

3.4.3. Reaalaja PCR

Uuritavate geenide ekspresioonitaseme mõõtmiseks kasutati qPCRi (*ABI Prism 7900HT*, *Applied Biosystems*), kommertsiaalset *SYBR Green RT-PCR Master Mixi* (*Applied Biosystems*, USA) ning eelnevalt disainitud praimerid (Tabel 1). Kõik praimerid peale *Tet1* on tellitud firmast TAG Copenhagen AS (Taani), *Tet1* praimer on tellitud firmast SABiosciences (Saksamaa). Kõik reaktsioonid viidi läbi kolmes paralleelis 384-kannulisel plaadil (MicroAmp, *Applied Biosystems*). PCR plaadi igasse kannu kanti 10 µl uuritavat ja koduhoidja proovi. PCR reaktsioonisegu ühe proovi kolme paralleeli jaoks (kogumaht 35 µl) koosnes 3,5 µl cDNA-st, 10,5 µl ülipuhtast veest, 17,5 µl Master SYBR Green RT-PCR Master Mix-st (*Applied Biosystems*, USA), 1,75 µl *Forward* praimerist ja 1,75 µl *Reverse* praimerist.

Tabel 1. Geeniekspressiooni uurimiseks kasutatud qPCR praimerite järjestused.

GEEN	<i>Forward praimer</i>	<i>Reverse praimer</i>
<i>Dnmt1</i>	5'AACGGAACACTCTCTCTCACTCA3'	5'TCACTGTCCGACTTGCTCCTC3'
<i>Dnmt3a</i>	5'CAGCGTCACACAGAAGCATATCC3'	5'GGTCCTCACTTTGCTGAACCTGG3'
<i>Dnmt3b</i>	5'GAATTTGAGCAGCCCAGGTTG3'	5'TGAAGAAGAGCCTTCCTGTGCC3'
<i>G9a</i>	5'CCCAGAGGAGTGAATGGTGT3'	5'CTTTCGGTGGCCATACACTT3'
<i>Hdac1</i>	5'CATGCCAAGTGTGTGGAGTTCGT3'	5'GTCCAGCACCGAGCGACATT3'
<i>Gapdh</i>	5'TGCCATCACTGCCACTCAGA3'	5'GTCAGATCCACAACGGATACATTG3'
<i>Tubulin</i>	5'AGCAACATGAATGACCTGGTG3'	5'GCTTTCCTAACCTGCTTGG3'
<i>Tet1</i>	PPR55325A-200 RT2 PCR Primer Set for Rat Tet1	

qPCR reaktsioonitingimused olid järgmised: eeltötlus 50°C juures 2 minutit ja algne denaturatsioon 95°C juures 10 minutit. Sellele järgnesid 40 tsüklit denaturatsiooni 95°C juures 15 sekundi jooksul ning praimerite seondumine ja ekstensioon 60°C juures 1 minuti jooksul. Dissotsiatsioonikõver programmi lõpus 95°C 15 sekundit, 60°C 15 sekundit ning 95°C 15 sekundit.

qPCRi käigus saadud tulemusi analüüsiti SDS 2.4. (*Applied Biosystems*) programmi abil. Geeniekspressiooni väärtused normaliseeriti koduhoidja (*Gapdh/ Tubulin*) suhtes ning mRNA kogused arvutati võrdleva Ct meetodiga, kasutades valemit $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

3.5. Kortikosterooni taseme mõõtmine

Kortikosterooni taseme mõõtmiseks kasutati *Corticosterone ELISA Kit*-i (ab108821; Abcam, USA) ja vastavat tootjafirma poolt koostatud protokollit. Kiti tööpõhimõte seisneb antigeen-antikeha kompleksi tekkes ning konjugaadi kinnitumisel sellisele kompleksile. Hilisemal kromogeeni pealekandmisel värvuvad antigeen-antikeha kompleksi sisaldavad testkannu lahused tetrametüülbensidiini abil siniseks ning pärast stopplahuse pealekandmist vesinikkloriidhappe abil kollaseks. Kortikosterooni sisaldust määratakse spektrofotomeetriliselt lahuse värvuse neeldumise intensiivsuse järgi.

Enne katse alustamist valmistati: lahjendused 1 µl vereplasmast ja 199 µl ülipuhast veest, reagentid ning standardite seeriad, kus kortikosterooni lõppkonsentratsioonid olid 25 ng/ml, 6,25 ng/ml, 1,563 ng/ml ja 0,391 ng/ml. Seejärel kanti mikroplaadi (kitis kaasas) igasse kannu kahes korduses 25 µl standardeid ja uuritavaid proove ning asetati inkubeerima kaheks tunniks toatemperatuurile. Inkubatsioonile järgnes viiekordne mikroplaadi pesemine pesupuhvriga (5 x 200 µl) ning seejärel 50 µl streptavidiin-peroksüdaasi konjugaadi pealekandmine ja hoidmine 30 minuti jooksul. Konjugaat pesti maha 200 µl pesupuhvriga (etappi korrati 5 korda) ning kannukestesse pipeteeriti 50 µl kromogeen/substraadi lahust, misjärel oodati optimaalse sinise tooni tekkimiseni ja lisati 50 µl stopplahust. Pärast stopplahuse lisamist mõõdeti värvuste intensiivsus koheselt *Tecan Sunrise* mikroplaadi lugejaga (Tecan Group Ltd., Switzerland) lainepikkusel 450 nm. Optilise tiheduse (OD) väärtused kuvati Magellan 6 (Tecan Group Ltd., Switzerland) programmi abil ning kortikosterooni kontsentratsioonid igas proovis arvutati OD väärtuste järgi Elisaanalysis netilehel¹, kus kasutati 5-parameetrilist regressioonanalüüsi.

¹ <http://elisaanalysis.com/app>

3.6. Western blot analüüs

Western blot-i analüüsiks vajalikud ajukoe tükid kaaluti (keskmine kaal ~6 mg) ning neile lisati 10x kogus RIPA puhvrit (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X 100, PIC (cOmplete protease inhibitor cocktail tablets, Roch), Na₃VO₄, NaF), misjärel jäeti proovid 20 minutiks jääle seisma. Seejärel proovid tsentrifuugiti 4°C ja 14000 rpm juures 20 minutit. Enne proovide geelile kandmist lisati neile laadimispuhvrit, mis koosnes 4X *Protein Loading Buffer*-ist (LI-COR Biosciences - GmbH), ülipuhtast veest ja β-merkaptotoetanoolist (β-ME), misjärel valgud denatureeriti 90°C juures 10 minuti jooksul.

Valgu lüsaadid kanti 8% SDS-polüakrüülamiid-geelelektroforeesi (SDS-PAGE) geelile ning asetati *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* masinasse (Bio-Rad, USA). Valke lahutati 15 minutit 50V juures ning 1 tund 95V juures foreesipuhvris (pH 8,3), milles sisaldus 5 mM Tris, 34,8 mM glütsiin, 0,02% SDS ja 90% dH₂O. Valkude suuruse visuaalseks hindamiseks lisati valguredelit *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas). Enne ülekandega alustamist asetati polüvinülideen fluoriid (PVDF, Immobilon®-FL, Millipore) membraanid esmalt minutiks metanooli, hiljem paariks minutiks ülekandepuhvrise (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glütsiin, 20% metanool, 80% dH₂O, 0,1% SDS). Valgud kanti geelilt üle membraanile kasutades *Bio-Rad Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* masinat, kus ülekanne toimus ülekandepuhvris 90V juures 1 tund.

Pärast ülekannet pesti membraani 5 minutit TBST-s (*Tris-buffered saline with Tween*: TBST- 50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich), pH 7,5), et eemaldada metanooli jäägid. Membraane blokeeriti *Odyssey® Blocking Buffer-is* (LI-COR Biosciences - GmbH) mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks üks tund loksutil toatemperatuuril. Edasi toimus membraanide inkubeerimine primaarsetes antikehades (Tabel 2.), mis lahjendati blokeerimislahuses, üleöö 4°C juures ning millele järgnes kolm kümne minutilist pesukorda TBST-ga ning sekundaarse antikeha pealekandmine. Sekundaarset antikeha (Tabel 2.) hoiti peal 1,5 tundi toatemperatuuril ja loksutil, millele järgnes kolm kümne minutilist pesukorda TBST-s. Signaali visualiseerimine toimus *Odyssey CLx Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences - GmbH) skänneri ja *Image Studio* (LI-COR Biosciences - GmbH) programmi abil. *Western blot*'i abil saadud signaali tugevuse kvantifitseerimine teostati *ImageJ* programmiga (vabavara Internetis) ning saadud tulemuste analüüsiks kasutati *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software) tarkvara. Analüüsi tulemused on esitatud keskmiste väärtustena, millele on lisatud standardviga (SEM).

Tabel 2. *Western blot-i* jaoks kasutatud antikehad.

Antikeha	Tootja	Lahjendus	Tüüp	Peremeesloom
Anti-Dnmt3a antibody (ab2850)	Abcam	2 µg/ml	Primaarne	Küülik
Anti-β-Aktiin Licor 92642212	LI-COR	1 µg/ml	Primaarne	Hiir
IRDye® 680LT Goat anti-Rabbit IgG 92668021	LI-COR	0,1 µg/ml	Sekundaarne	Kits
IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG 92632210	LI-COR	0,1 µg/ml	Sekundaarne	Kits

3.7. Katseandmete statistiline analüüs

Geenide ekspresioonitasemete, valgukoguste, rottide kehakaalude ja kortikosteronitasemete analüüsimiseks kasutati ühefaktorilist variatsiooni analüüsi (*one-way ANOVA*). Eri gruppide *post hoc* võrdlus tehti Bonferroni või Tukey järeltestiga. Statistiliseks analüüsiks kasutati GraphPad Prism (GraphPad, USA) tarkvara. Katsete tulemused esitati keskmiste väärtustena ± SEM. Olulisuse tasemeks seati $p < 0.05$.

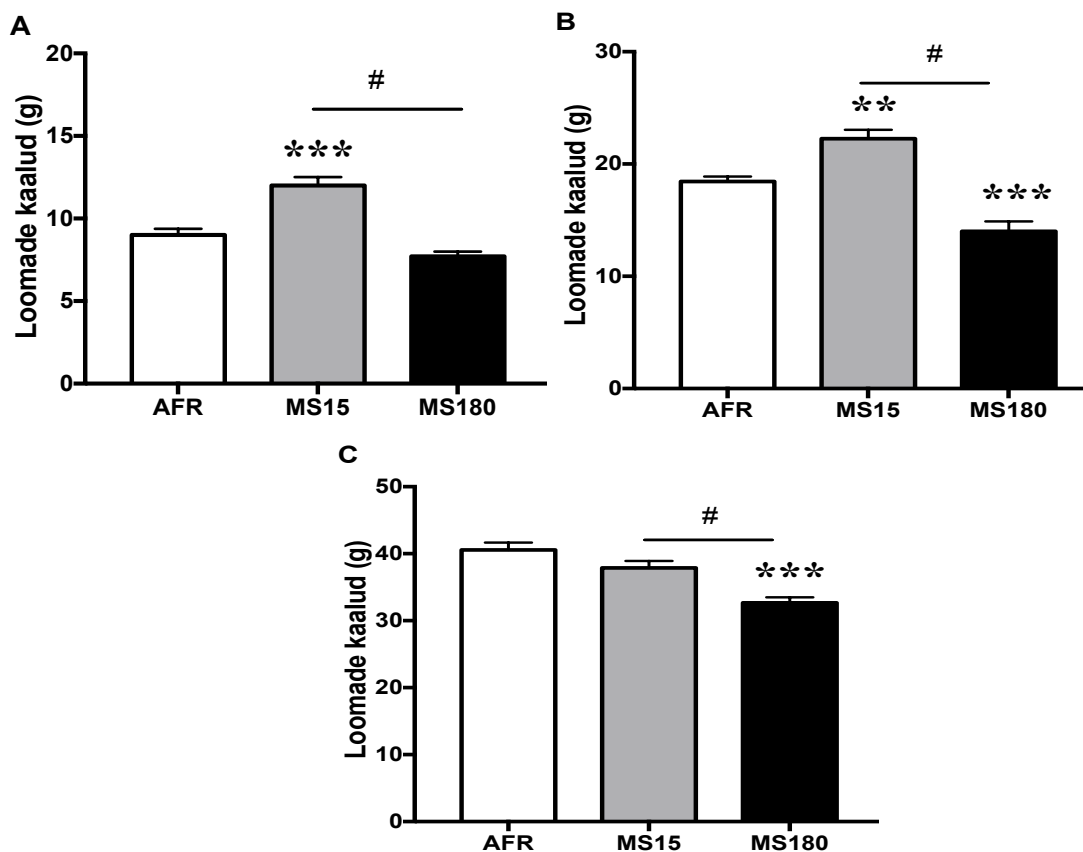
4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1. Rotipogade kehakaalude ajaline dünaamika

Esmalt vaadeldi seda, kuidas mõjutab MS rotipogade kehakaale erinevatel postnataalsetel päevadel 3, 8, 15 (Joonis 5). Vaatluste põhjal leiti, et juba kolme päeva vanustel (Joonis 5A) rotipogadel esineb statistiliselt olulisi erinevusi kehakaalude vahel. Leiti, et 15 minutiline (MS15) emast eraldamine tõstab oluliselt rotipogade kehakaale ($12 \text{ g} \pm 0,516 \text{ g}$), samas kui 180 minutiline (MS180) emast eraldamine langetab oluliselt rotipogade kehakaale ($7,7 \text{ g} \pm 0,286 \text{ g}$) võrreldes kontrollrühma (AFR) loomadega ($9 \text{ g} \pm 0,378 \text{ g}$). Ühefaktorilise ANOVA analüüsi ja Tukey järeldestitulemusena leiti statistiliselt oluline erinevus AFR ($9 \text{ g} \pm 0,378 \text{ g}$) vs MS 15 ($12 \text{ g} \pm 0,516 \text{ g}$), $p < 0.001$ rühma vahel ja lisaks ka MS15 vs MS180 ($7,7 \text{ g} \pm 0,286 \text{ g}$) rühmade vahel, $p < 0.001$; $n=6$.

Kaheksa päeva vanustel (Joonis 5B) rotipogadel esinesid sarnased varieeruvused kehakaalude vahel, kus ka selles ajapunktis olid kõige raskemad MS15 rühma loomad ($22,25 \text{ g} \pm 0,8 \text{ g}$), võrreldes AFR ($18,44 \text{ g} \pm 0,44 \text{ g}$) ja MS180 rühma loomadega ($14 \text{ g} \pm 0,89 \text{ g}$). Antud ajapunktis leiti statistiliselt oluline erinevus kehakaalude vahel kõigi rühmade võrdlusel, kus AFR ($18,44 \text{ g} \pm 0,44 \text{ g}$) vs MS15 ($22,25 \text{ g} \pm 0,8 \text{ g}$), $p < 0,01$, AFR vs MS180 ($14 \text{ g} \pm 0,89 \text{ g}$), $p < 0,001$ ja MS15 vs MS180 $p < 0.001$; $n=6$.

Joonis 5C kujutab 15-ne päeva vanuste rotipogade kehakaalude varieeruvust. Antud ajapunktis olid kõige raskemad AFR rühma rotipojad ($40,556 \text{ g} \pm 1,1 \text{ g}$) ning suurim erinevus kehakaalude vahel esines kontrollrühma ja MS180 rühma ($32,667 \text{ g} \pm 0,82$) vahel, vastavalt AFR ($40,556 \text{ g} \pm 1,1 \text{ g}$) vs MS180 ($32,667 \text{ g} \pm 0,82 \text{ g}$), $p < 0.001$. Lisaks leiti statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ($37,889 \text{ g} \pm 1,038 \text{ g}$) vs MS180 rühmade vahel, $p < 0.01$; $n=6$.



Joonis 5. Kehakaalude ajaline dünaamika. Maternaalse separatsiooni mõju rotipoegade kehakaaludele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15. Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Tukey's test ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; joonis 5 A), B) # $p < 0.001$, joonis 5C) # $p < 0.01$; $n = 6$.

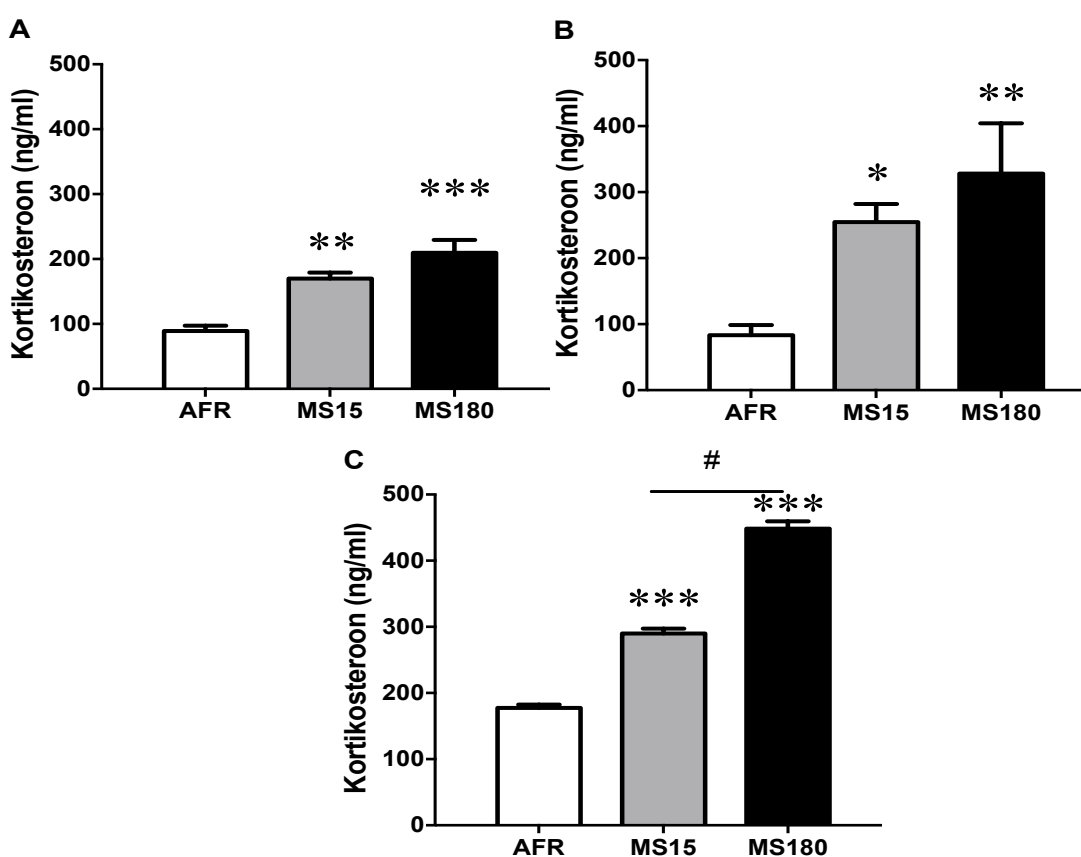
4.2. Kortikosterooni ajaline dünaamika

Järgnevalt vaadeldi MS-i mõju rotipoegade kortikosterooni tasemetele erinevatel PND (3, 8, 15). Üldjoontes oli kortikosterooni tõusu trend sarnane erinevates ajapunktides, olles kõrgeim MS180 rühmal ning madalaim AFR rühmal. Statistiliselt olulisi erinevusi kortikosterooni tasemetes esines kõigis kolmes ajapunktis. Antud tulemused näitavad, kuidas emast eemalolek suurendab stressihormooni taset vereplasmas, korduvate manipulatsioonide tõttu tõuseb kortikosterooni tase vereplasmas veelgi (PND 3 vs PND15).

Kolme päeva vanustel (Joonis 6A) rotipoegadel esines statistiliselt oluline erinevus kortikosterooni tasemetes nii MS15 kui ka MS180 rühmade vahel, võrreldes AFR rühmaga. Mõlemal juhul oli trend kontsentratsioonide suurenemise suunas AFR ($89,2 \text{ ng/ml} \pm 8,08 \text{ ng/ml}$) vs MS15 ($169,88 \text{ ng/ml} \pm 9,41 \text{ ng/ml}$), $p < 0.01$ ja AFR vs MS180 ($209,58 \text{ ng/ml} \pm 19,89 \text{ ng/ml}$), $p < 0.001$; $n = 6$.

Ka kaheksa päeva (Joonis 6B) vanustel rotipoegadel oli kõrgeim stressihormooni tase MS180 rühma loomadel. Kusjuures statistiliselt olulised erinevused leiti AFR (83,2 ng/ml \pm 15,6 ng/ml) vs MS15 (254,66 ng/ml \pm 27,5 ng/ml), $p < 0.05$ ja AFR vs MS180 (328,08 ng/ml \pm 76,14 ng/ml), $p < 0.01$; $n = 6$ rühmade vahel, mõlemal juhul oli trend kontsentratsioonide suurenemise suunas.

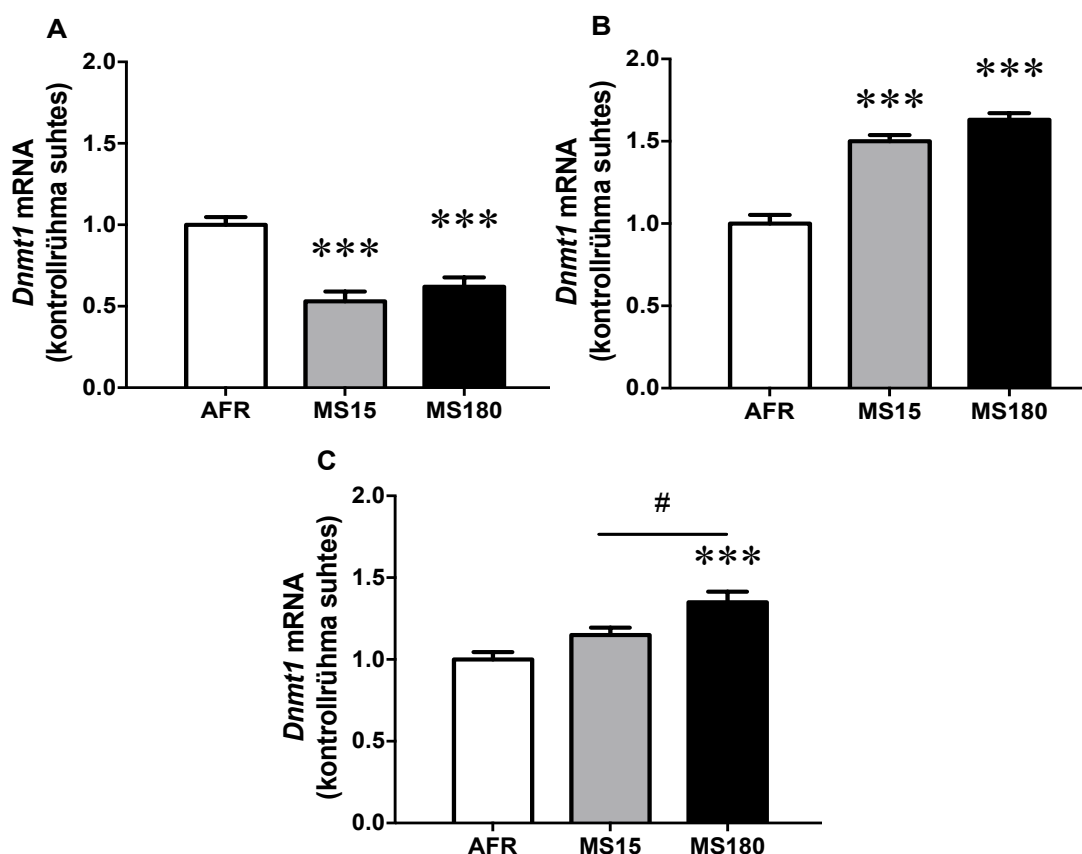
15. päeva vanustel (Joonis 6C) rotipoegadel oli kortikosterooni tase vereplasmas tõusnud juba rohkem kui 100 ng/ml, võrreldes kolme päeva vanuste rotipoegadega. Ka antud ajapunktis esines kõrgeim kortikosterooni tase MS180 rühmal. Statistiliselt olulised erinevused leiti AFR (177,5 ng/ml \pm 4,89 ng/ml) vs MS15 (290,1 ng/ml \pm 7,409 ng/ml), $p < 0.001$ ja AFR vs MS180 (448,53 ng/ml \pm 10,99 ng/ml), $p < 0.001$ rühmade vahel, kus mõlemal juhul oli trend kontsentratsioonide suurenemise suunas. Lisaks esines statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ja MS180 rühma vahel $p < 0.001$; $n = 6$.



Joonis 6. Kortikosterooni ajaline dünaamika. Maternaalse separatsiooni mõju kortikosterooni tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipoegade vereplasmas. Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; # $p < 0.001$; $n = 6$.

4.3. *Dnmt1* mRNA tasemete muutused rotipoeegade juttkehas

Kasutades reaalaaja kvantitatiivset PCR (qPCR), hinnati rotipoeegade emast eraldamise mõju DNA metüültransferaasi *Dnmt1* mRNA tasemetele rotipoeegade juttkehas PND 3, 8 ja 15 (Joonis 7). Töö tulemused näitasid (Joonis 7A), et juba kolme päeva vanustel rotipoeegadel esinevad MS-i järgselt erinevused *Dnmt1* mRNA tasemetes. Leiti, et nii 15 minutiline kui ka 180 minutiline emast eraldamine langetab oluliselt *Dnmt1* mRNA tasemeid rotipoeegade juttkehas võrreldes kontrollrühma (AFR) loomadega. Ühefaktorilise ANOVA analüüsi ja Bonferroni järeltesti tulemusena leiti, et *Dnmt1* mRNA taseme langus MS15 rühma loomade juttkehas ($0,53 \pm 0,06$) oli statistiliselt oluline võrreldes AFR rühma loomadega ($1 \pm 0,048$), $p < 0,001$ MS15 vs AFR. Samuti esines oluline *Dnmt1* mRNA taseme langus MS180 loomade juttkehas ($0,62 \pm 0,057$) võrreldes AFR rühmaga, $p < 0,001$ MS180 vs AFR; $n=6$.



Joonis 7. *Dnmt1* juttkehas. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt1* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipoeegade juttkehas (*striatum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, *** $p < 0,001$ võrreldes AFR rühmaga; # $p < 0,05$ MS15 vs. MS180; $n=6$.

Järgnevalt hinnati *Dnmt1* mRNA tasemeid kaheksandal postnataalsel päeval. Töö tulemused näitasid (Joonis 7B), et maternaalse separatsiooni järgselt suurenes nii MS15 ($1,5 \pm 0,038$) kui ka MS180 ($1,63 \pm 0,041$) rühma loomade juttkehas *Dnmt1* mRNA tase (Joonis 7B) võrreldes

kontrollrühma AFR ($1 \pm 0,053$) loomadega. Antud muutused olid statistiliselt olulised, $p < 0.001$ MS15 ja MS180 vs AFR rühm; $n=6$.

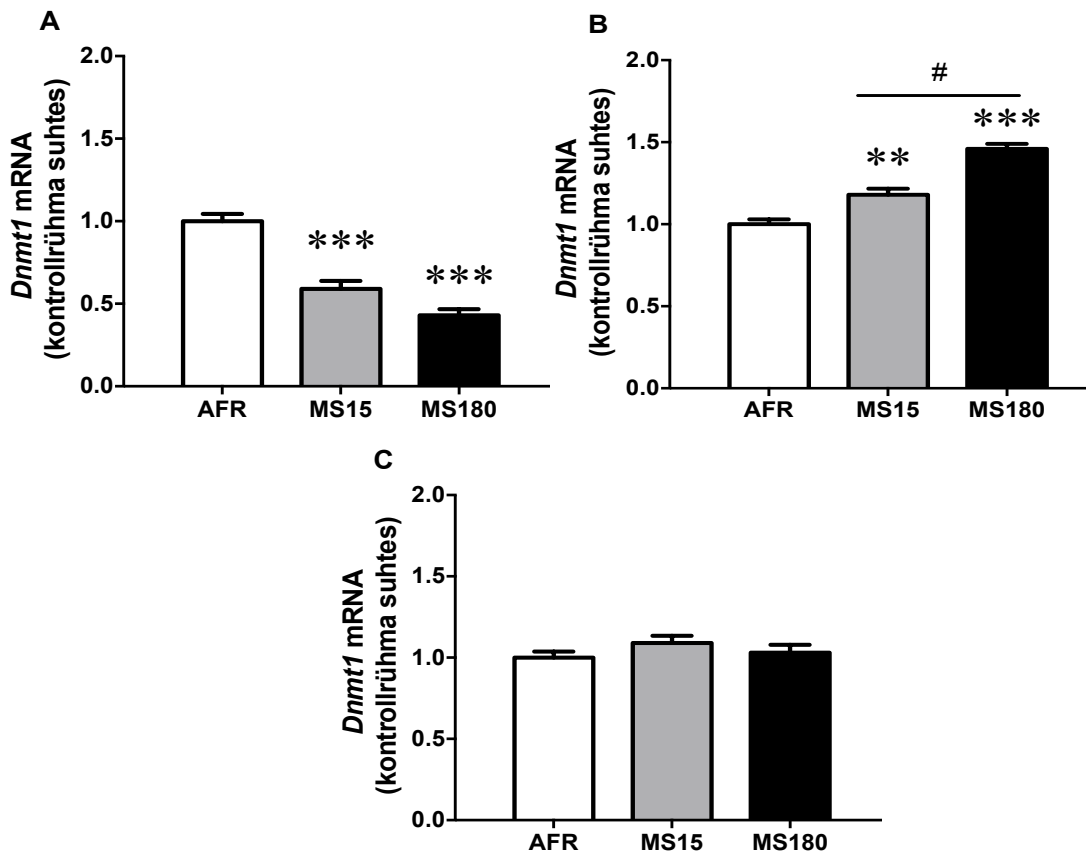
Ka 15. postnataalsel päeval (PND15) leiti (Joonis 7C), et rotipoegade pikemaajaline emast eraldamine MS180 ($1,35 \pm 0,067$) suurendas statistiliselt oluliselt *Dnmt1* mRNA taset rotipoegade juttkehas võrreldes MS15 ($1,15 \pm 0,045$) ja AFR ($1 \pm 0,045$) rühma loomadega, $p < 0.001$ MS180 vs AFR. Samuti esines statistiline erinevus MS15 ja MS180 rühmade vahel, $p < 0.05$ MS15 vs MS180; $n=6$.

4.4. *Dnmt1* mRNA tasemete muutused rotipoegade väikeajus

Lisaks juttkehale, hinnati rotipoegade emast eraldamise mõju *Dnmt1* mRNA tasemetele ka võrdlus ajukoos, milleks oli antud töös oli väikeajus. Nii nagu eelnevas punktis, hinnati ka siin ajalise dünaamika mõju (PND 3, 8 ja 15) *Dnmt1* mRNA tasemetele. Töö tulemused näitasid (Joonis 8A), et võrreldes kontrollrühma loomadega ($1 \pm 0,04$), oli kolmandal postnataalsel päeval oluliselt langenud *Dnmt1* mRNA tase nii MS15 ($0,59 \pm 0,048$) kui MS180 ($0,43 \pm 0,037$) rühmas. Antud muutused olid statistiliselt olulised, $p < 0.001$ MS15 ja MS180 vs AFR rühm; $n=7$.

Kaheksandal postnataalsel päeval (joonis 8B) leiti rotipoegade väikeajus üsna sarnaseid muutuseid *Dnmt1* mRNA tasemetega juttkehas. Maternaalse separatsiooni järgselt oli *Dnmt1* mRNA tase oluliselt tõusnud nii MS15 ($1,18 \pm 0,037$) kui ka MS180 ($1,46 \pm 0,03$) rühmas võrreldes kontrollrühma ($1 \pm 0,03$) loomadega. Statistiline analüüs näitas, et antud muutused olid olulised, $p < 0.01$ MS15 vs AFR; $p < 0.001$ MS180 vs AFR; $n=7$. Lisaks esines statistiline erinevus ka MS15 ja MS180 rühmade vahel, $p < 0.001$ MS15 vs MS180.

Lisaks PND3-le ja PND8-le, hinnati *Dnmt1* mRNA tasemeid ka 15. postnataalsel päeval, kuid siin statistiliselt olulisi muutuseid rühmade vahel ei leitud (Joonis 8C). Seega, töö tulemused näitasid, et maternaalne separatsioon võib lisaks juttkehale mõjutada *Dnmt1* mRNA tasemeid ka väikeajus (PND3 ja PND8). Ainus erinevus oli 15.-ndal postnataalsel päeval, kus ei leitud muutuseid *Dnmt1* mRNA tasemetes kontrollrühma ja emast eraldatud loomade vahel.



Joonis 8. *Dnmt1* väikeajus. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt1* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipogade väikeajus (*cerebellum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; # $p < 0.001$ MS15 vs. MS180; $n = 7$.

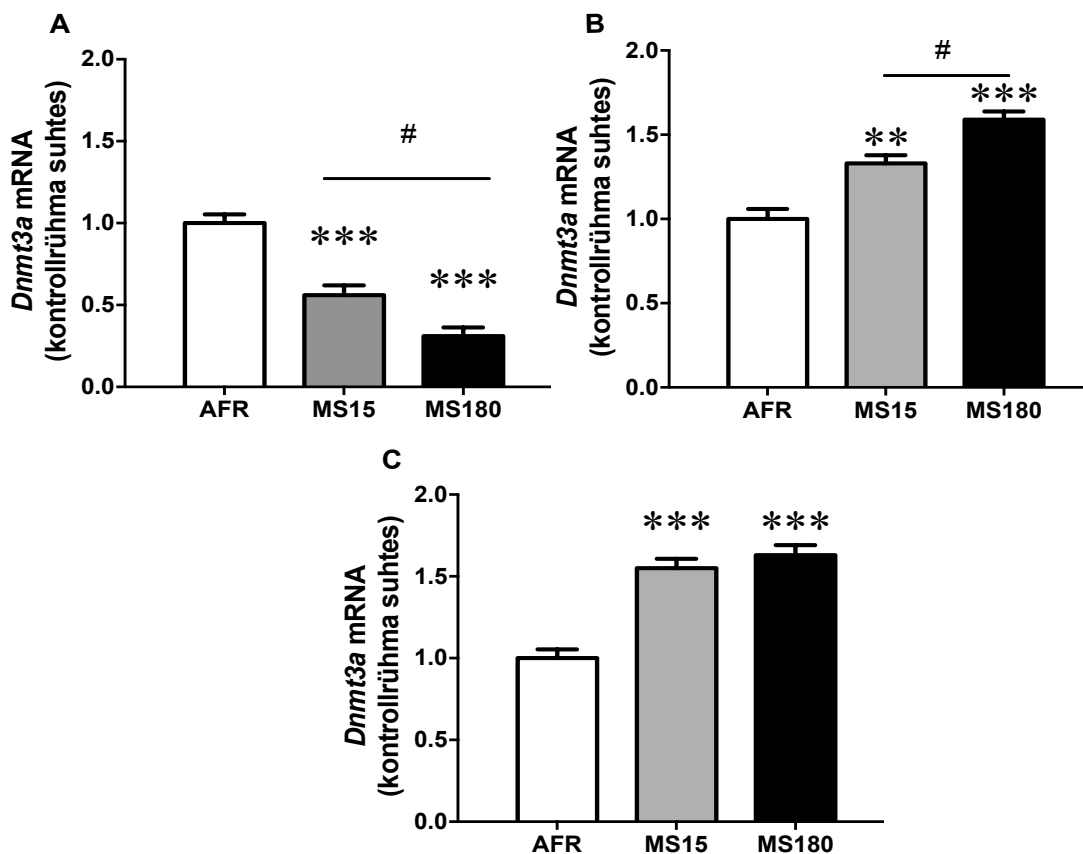
4.5. *Dnmt3a* ekspressioonitasemete muutused rotipogade juttkehas

Järgnevalt vaadeldi MS-i mõju *Dnmt3a* mRNA tasemetele juttkehas. Antud ensüüm vastutab koos DNMT3b-ga uute metüüljääkide lisandumise eest DNA-le. Katsete tulemustest selgub (Joonis 9A), et kui esmasel poegade emast eraldamisel hakkavad *Dnmt3a* mRNA tasemed langema, siis korduval emast eraldamisel mRNA hulk hoopis suureneb. Kolme päeva vanustel rotipogadel leiti, et nii MS15 ($0,56 \pm 0,06$) kui ka MS180 ($0,31 \pm 0,053$) rühma loomadel olid mRNA tasemed märgatavalt langenud võrreldes AFR ($1 \pm 0,053$) rühmaga. Statistiline analüüs näitas, et antud muutused olid olulised, MS15 vs AFR, $p < 0.001$ ja MS180 vs AFR, $p < 0.001$. Lisaks esines statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ja MS 180 rühma vahel, $p < 0.05$; $n = 7$.

Kaheksa päeva vanustel (Joonis 9B) rotipogadel on aga näha vastupidist tendentsi, kus MS15 ($1,33 \pm 0,049$) ja MS180 ($1,53 \pm 0,049$) rühmal on kõrgemad mRNA tasemed võrreldes AFR ($1 \pm 0,06$) rühmaga. Antud tulemused olid ka statistiliselt olulised MS15 vs AFR,

$p < 0.01$ ja MS180 vs AFR, $p < 0.001$, lisaks esines märkimisväärne erinevus ka MS15 vs MS180 rühmade vahel, $p < 0.01$; $n = 7$.

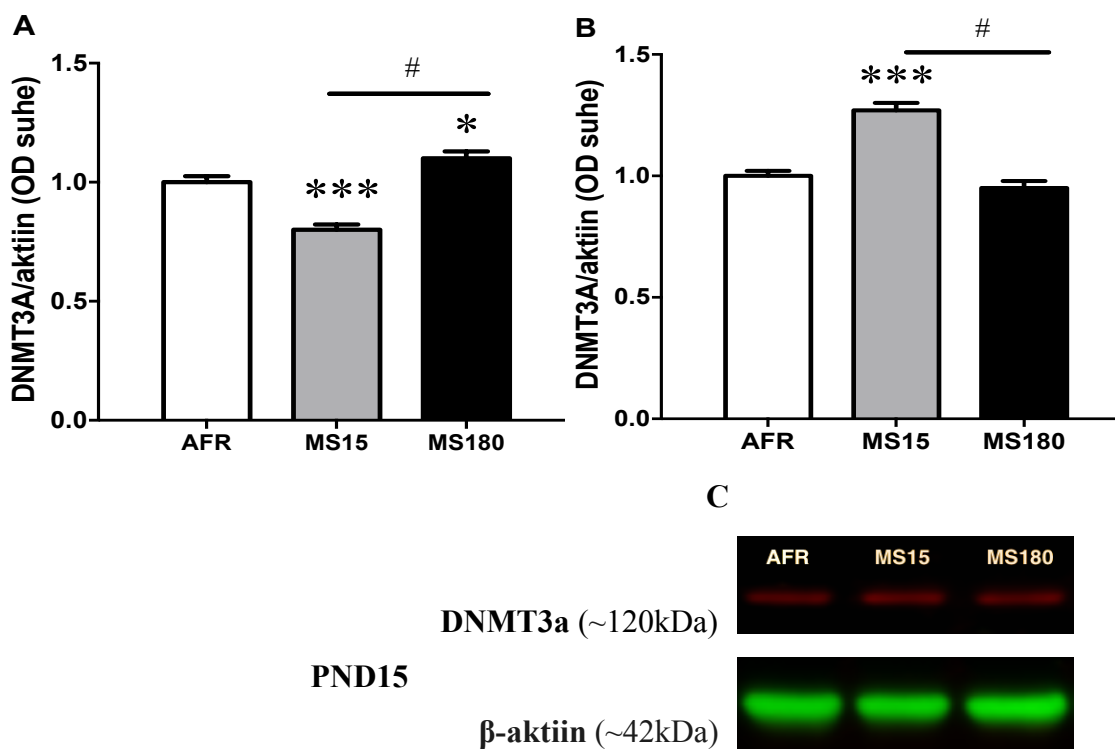
Pikemaajalisem MS (Joonis 9C) ei tõstnud *Dnmt3a* mRNA tasemeid enam märkimisväärselt. Küll aga võrdsustasid peaaegu MS15 ($1,55 \pm 0,057$) ja MS180 ($1,63 \pm 0,061$) rühma loomade mRNA tasemed. Statistiliselt oluline tõus mRNA tasemetes esines vaid võrdluses kontrollrühmaga ($1 \pm 0,053$), kus MS15 vs AFR, $p < 0.001$ ja MS180 vs AFR, $p < 0.001$; $n = 7$.



Joonis 9. *Dnmt3a* juttkehas. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3a* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipoegade juttkehas (*striatum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; joonis 9A) # $p < 0.05$; joonis 9B) # $p < 0.01$ MS15 vs. MS180; $n = 7$.

Lisaks mRNA-le vaadeldi MS-i mõju ka DNMT3a valgu tasemetele kaheksa (Joonis 10A) ja 15. päeva (Joonis 10B) vanuste rotipoegade juttkehas. Antud tulemused ei ühti qPCR-i tulemustega, kuid ka siin esineb statistiliselt olulisi erinevusi. Kaheksa päeva vanuste rotipoegade puhul on MS15 rühmas valgu tase madalam ($0,8 \pm 0,022$) võrreldes kontrollrühmaga ($1 \pm 0,02$), esines ka statistiliselt oluline erinevus $p < 0.001$. Oluline erinevus esines ka MS180 rühma ($1,1 \pm 0,029$) võrdlusel MS15, $p < 0.001$ ja AFR-iga, $p < 0.05$, $n = 7$, kus MS180 oli kõrgem valgutase, võrreldes teiste rühmadega.

15. päeva vanustel loomadel esines kõige kõrgem valgu tase MS15 ($1,27 \pm 0,03$) rühmas ning madalaim MS180 ($0,95 \pm 0,028$) rühma loomadel võrreldes kontrollrühmaga ($1 \pm 0,02$). Antud tulemused on vastupidised võrreldes eelneva ajapunktiga, kuid ka siin esines statistiliselt olulisi erinevusi, kus MS15 vs AFR $p < 0,001$ ja MS15 vs MS180, $p < 0,001$; $n = 7$.



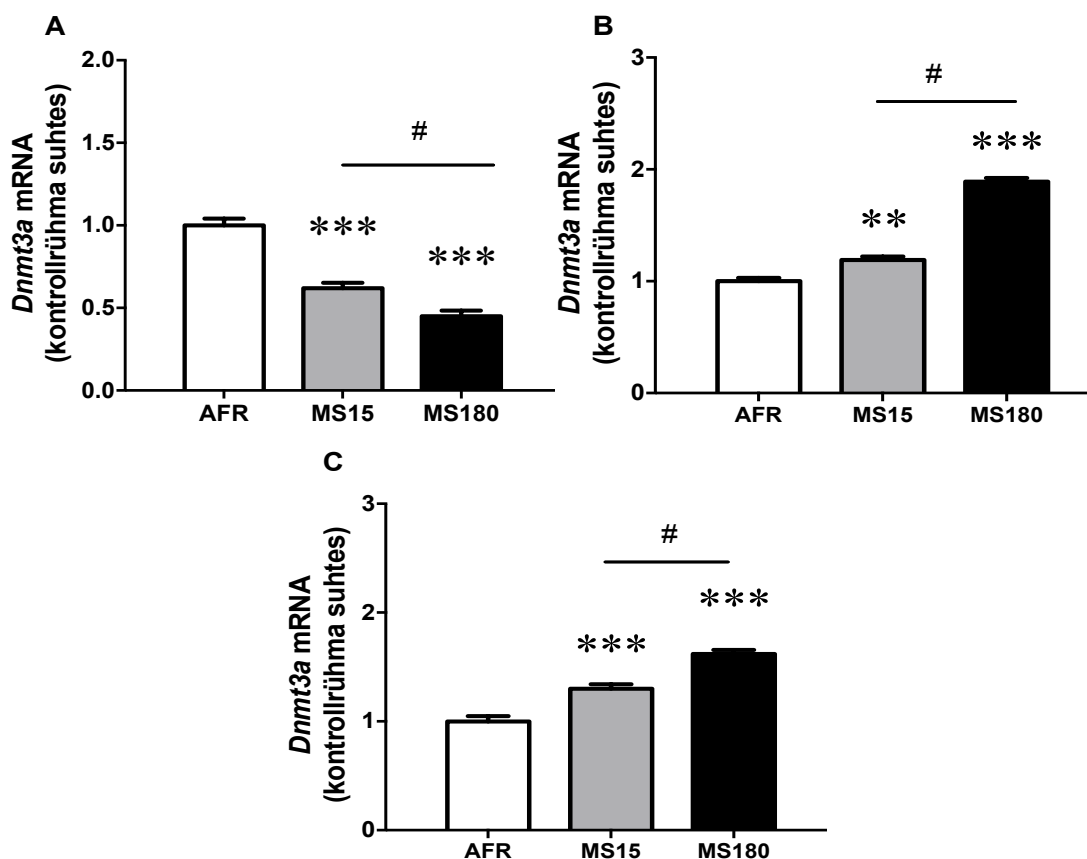
Joonis 10. *Dnmt3a* Western blot. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3a* valgu tasemetele ajapunktides A) PND8 B) PND15 rotipöögade juttkehas (striatum). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ võrreldes AFR rühmaga; # $p < 0,001$ MS15 vs. MS180; $n = 7$. Joonistel 10C on välja toodud illustratiivne Western blot valguriiba, mis näitab PND15; AFR, MS15 ja MS180 DNMT3a (punased) ja β-aktiin (rohelised) bände.

4.6. *Dnmt3a* mRNA tasemete muutused rotipöögade väikeajus

Lisaks juttkehale, hinnati rotipöögade emast eraldamise mõju *Dnmt3a* mRNA tasemetele ka võrdlus ajukoos, väikeajus. *Dnmt3a* qPCR-i tulemused väikeajus on sarnased juttkehast saadud katsete tulemustega. Ka siin esineb kolme päeva vanustel loomadel trend mRNA tasemete langusele samas kui järgnevatel ajapunktides on mRNA tasemete trend tõusule. PND3 (Joonis 11A) on kõige kõrgem mRNA tase kontrollrühmal ($1 \pm 0,041$), veidi on langenud MS15 rühma loomade mRNA tasemed ($0,62 \pm 0,032$) ning kõige madalam *Dnmt3a* mRNA tase esineb MS180 ($0,45 \pm 0,034$) rühma loomadel. Antud ajapunktis esinesid statistiliselt olulised erinevused kõikide gruppide vahel, MS15 vs AFR, $p < 0,001$, MS180 vs AFR, $p < 0,001$ ja lisaks ka MS15 vs MS180, $p < 0,05$; $n = 7$.

Vastupidist trendi oli näha juba kaheksa päeva vanustel loomadel (Joonis 11B), kus leiti, et MS15 rühma mRNA tase ($1,19 \pm 0,03$) oli suurenenud võrreldes AFR rühmaga ($1 \pm 0,03$), $p < 0.01$. Veelgi enam oli tõusnud MS180 rühma loomade mRNA tase ($1,89 \pm 0,034$) võrreldes AFR rühmaga, $p < 0.001$. Lisaks esines statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ja MS 180 vahel $p < 0.001$; $n=7$.

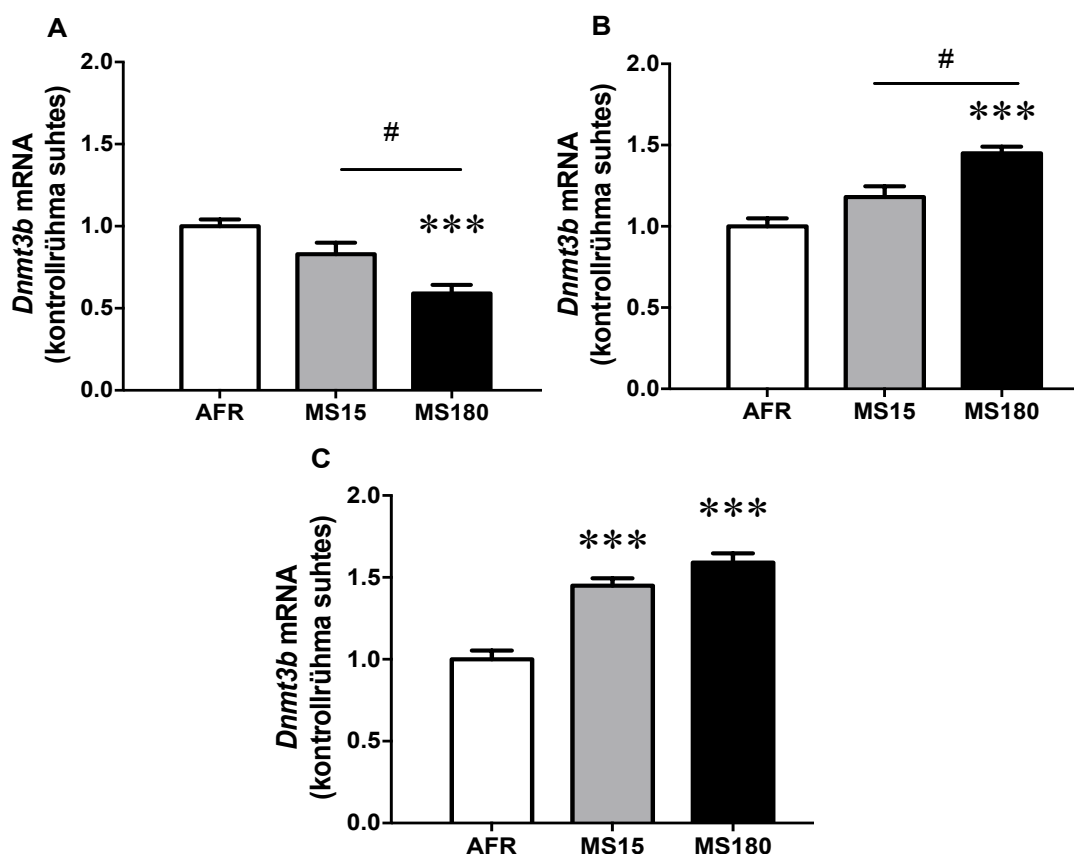
Ka 15. päeva vanustel loomadel (Joonis 11C) oli seos emast eraldatuse ja mRNA tasemete vahel. Kõige madalam mRNA tase oli kontrollrühmal ($1 \pm 0,049$), veidi kõrgem oli see “käteldud” rühmal ($1,3 \pm 0,041$) ning kõige kõrgem mRNA tase esines MS180 ($1,62 \pm 0,037$) rühma loomadel. Statistilise analüüsi tulemusel leiti olulised erinevused kõigi rühmade vahel, kus MS15 vs AFR, $p < 0.001$, MS180 vs AFR, $p < 0.001$ ning MS15 vs MS180, $p < 0.001$; $n=7$.



Joonis 11. *Dnmt3a* väikeajus. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3a* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipoegade väikeajus (*cerebellum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; joonis 11. A) # $p < 0.05$; joonis 11 B,C) # $p < 0.001$ MS15 vs. MS180; $n=7$.

4.7. *Dnmt3b* mRNA tasemete muutused rotipoeegade juttkehas

Lisaks *Dnmt3a* mRNA tasemetele jälgiti MS-i mõju ka *Dnmt3b* mRNA tasemetele rotipoeegade juttkehas. Katsete tulemused näitasid, et emast eraldamise mõju *Dnmt3b* tasemetele on sarnane eelnevalt vaadeldud *Dnmt3a* mRNA tasemetega. Ka siin langevad kolme päeva vanustel (Joonis 12A) rotipoeegadel mRNA tasemed emast eraldamise korral, kuid alates kaheksandast päevast muutub trend vastupidiseks (Joonis 12B) ning jääb püsima ka 15. päeva vanustel loomadel (Joonis 12C). Statistilise analüüsi tulemusena leiti, et kolme päeva vanustel MS180 ($0,59 \pm 0,053$) rühma loomadel on mRNA tase oluliselt langenud võrreldes AFR ($1 \pm 0,041$) rühmaga, $p < 0.001$. Lisaks esines statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ($0,83 \pm 0,07$) ja MS180 rühma vahel, $p < 0.05$; $n=7$.



Joonis 12. *Dnmt3b* juttkehas. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3b* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipoeegade juttkehas (*striatum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; joonis 12A) # $p < 0.05$; joonis 12B) # $p < 0.01$ MS15 vs. MS180; $n=7$.

Järgnevalt vaadeldi *Dnmt3b* mRNA tasemeid kaheksandal postnataalsel päeval. Katsete tulemused näitasid (Joonis 12B), et MS-i järgselt suurenesid juttkehas nii MS15 ($1,18 \pm 0,067$) kui ka MS180 ($1,45 \pm 0,041$) rühma loomade mRNA tasemed, võrreldes

kontrollrühmaga ($1 \pm 0,049$). Statistiliselt olulised erinevused esinesid MS180 vs AFR, $p < 0.001$ ja lisaks ka MS15 vs MS180, $p < 0.01$ rühma loomade vahel; $n=7$.

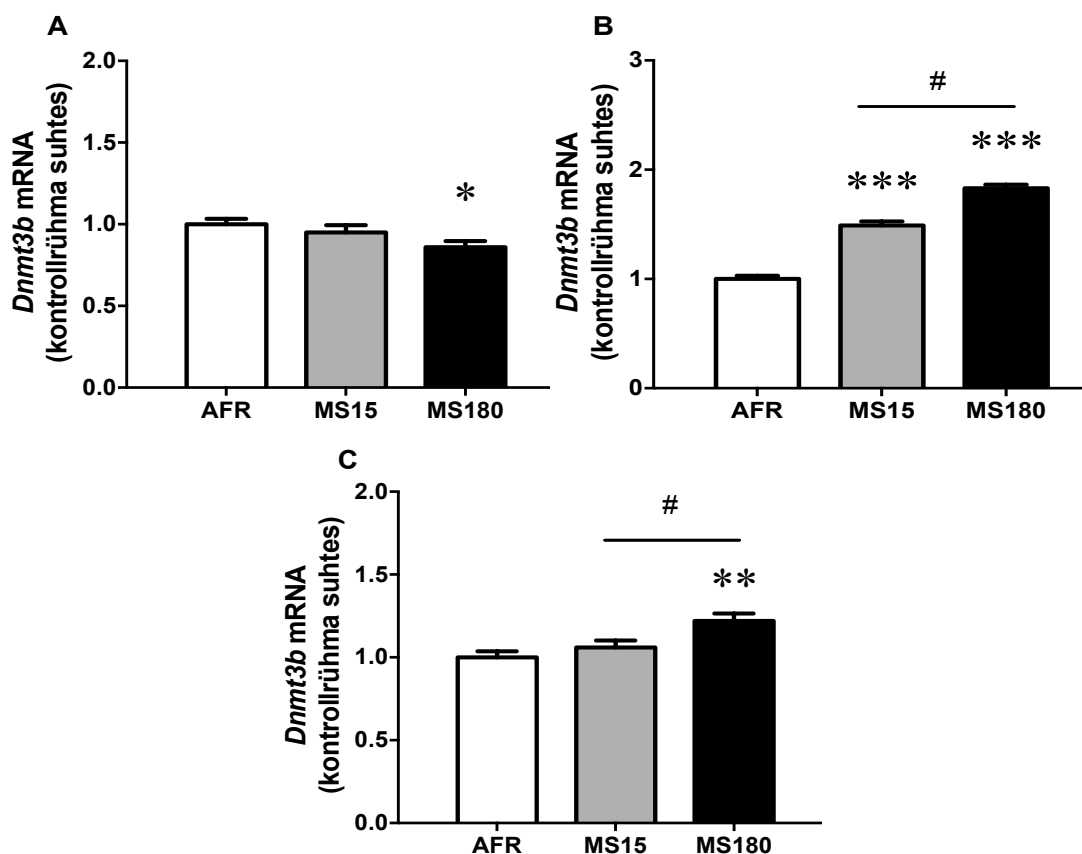
Sarnased tulemused jäid püsima ka 15. postnataalsel päeval (Joonis 12C). Ka siin leiti, et pikemaajalisem emast eraldamine (MS180) suurendas oluliselt *Dnmt3b* mRNA tasemeid ($1,59 \pm 0,057$) võrreldes kontrollrühma loomadega ($1 \pm 0,053$), $p < 0.001$. Lisaks esines statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ($1,45 \pm 0,045$) ja AFR rühma loomade vahel, $p < 0.001$; $n=7$.

4.8. *Dnmt3b* mRNA tasemete muutused rotipoegade väikeajus

Järgnevalt vaadeldi *Dnmt3b* mRNA tasemeid ka võrdlus ajukoos, milleks oli väikeaju. Siin leiti juttkehaga sarnased, kuid väiksemate amplituudidega tulemusi. Kolme päeva vanustel (Joonis 13A) loomadel esines emast eraldatud loomadel väga väike trend mRNA tasemete languse suunas. Ainus statistiliselt oluline erinevus leiti MS180 ($0,86 \pm 0,037$) ja kontrollrühma ($1 \pm 0,033$) võrdluses, $p < 0.05$.

Kaheksandal postnataalsel päeval (Joonis 13B) leiti väikeajus üsna sarnaseid muutuseid *Dnmt3b* mRNA tasemetes võrreldes juttkehaga. Antud katsetes leiti, et MS15 rühma mRNA tase ($1,49 \pm 0,037$) oli suurenenud võrreldes AFR rühmaga ($1 \pm 0,03$), $p < 0.001$; kuid enim oli tõusnud emast eraldamise tõttu MS180 rühma loomade mRNA tase ($1,83 \pm 0,034$) võrreldes AFR rühmaga, $p < 0.001$. Lisaks esines statistiliselt oluline erinevus ka MS15 vs MS180 vahel, $p < 0.001$; $n=7$.

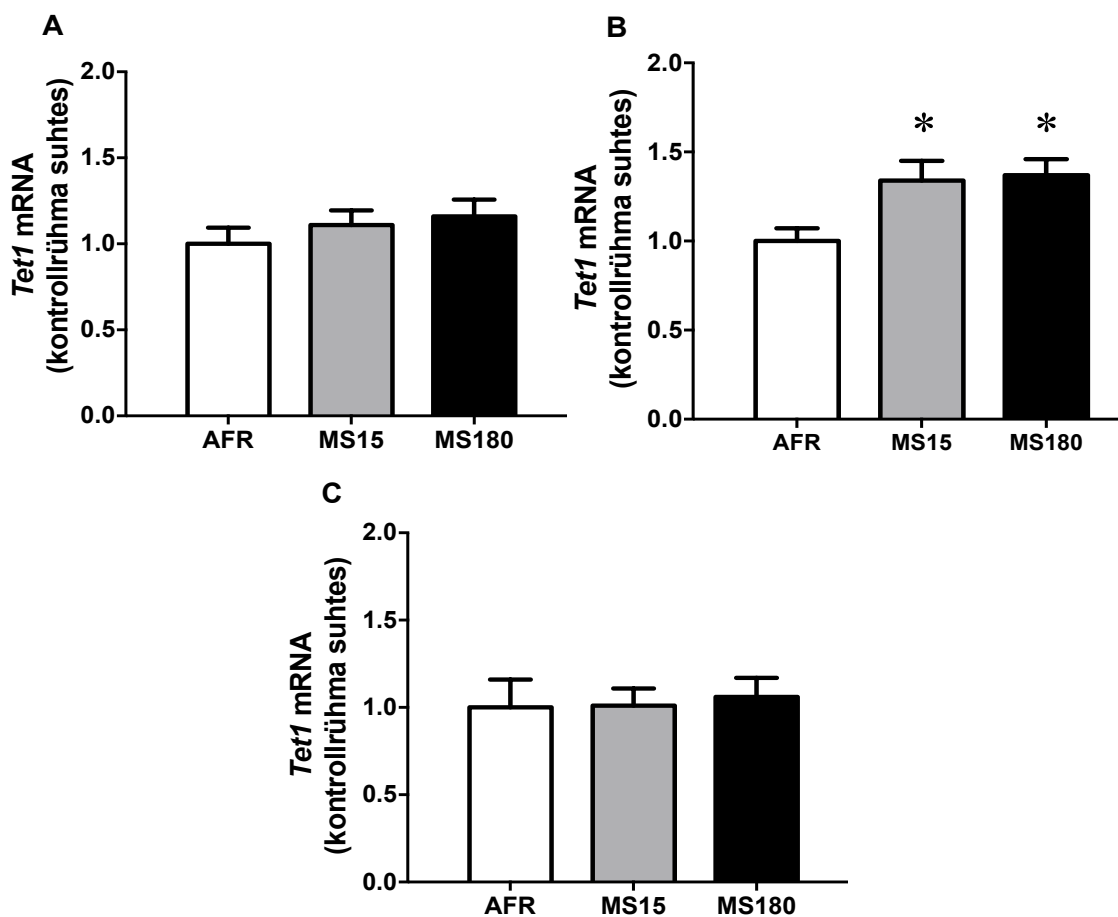
Lisaks hinnati MS-i mõju ka 15. päeva vanuste (Joonis 13C) rotipoegade *Dnmt3b* mRNA tasemetele. Katsete tulemusel leiti, et üldiselt olid mRNA tasemed muutnud ühtlasemaks, kuid kõige suurem erinevus mRNA tasemete vahel esines MS180 rühma ($1,22 \pm 0,045$) ja kontrollrühma vahel ($1 \pm 0,037$), $p < 0.01$. Lisaks leiti statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ($1,06 \pm 0,042$) ja MS180 rühmade vahel, $p < 0.05$; $n=7$.



Joonis 13. *Dnmt3b* väikeajus. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3b* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipogade väikeajus (*cerebellum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; joonis 13 B) # $p < 0.001$; joonis 13 C) # $p < 0.05$ MS15 vs. MS180; $n = 7$.

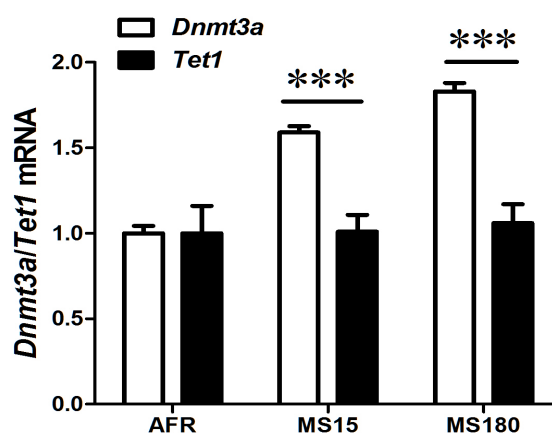
4.9. *Tet1* mRNA tasemete muutused rotipogade juttkehas

DNA demetülaasidest jälgiti MS-i mõju *Tet1* mRNA tasemetele rotipogade juttkehas. Kolme päeva (Joonis 14A) vanustel rotipogadel oli märgata vaid minimaalset tõus MS15 ja MS180 rühma loomadel, kuid statistiliselt olulisi muutusi mRNA tasemetes ei tekkinud. Kaheksa päeva (Joonis 14B) vanustel rotipogadel esines statistiliselt oluline tõus mRNA tasemetes nii MS15 ($1,34 \pm 0,11$) kui ka MS180 ($1,37 \pm 0,09$) rühma loomade hulgas, võrreldes kontrollgrupi loomadega $p < 0.05$, $n = 6$. PND15 ajapunktis (Joonis 14C) olid mRNA tasemed uuesti ühtlustunud ning statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud.



Joonis 14. *Tet1* juttkehas. Maternaalse separatsiooni mõju *Tet1* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipoegade juttkeha (*striatum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, * $p < 0.05$ võrreldes AFR rühmaga; $n=6$.

Lisaks leiti statistiliselt oluline erinevus ka PND15 *Dnmt3a/Tet1* mRNA tasemete võrdluses (Joonis 15). Antud jooniselt on näha, et 15. päeva vanustel rottidel on juttkehas suurenenud *Dnmt*-de mRNA tasemed samas kui *Tet1* tase ei ole muutunud.

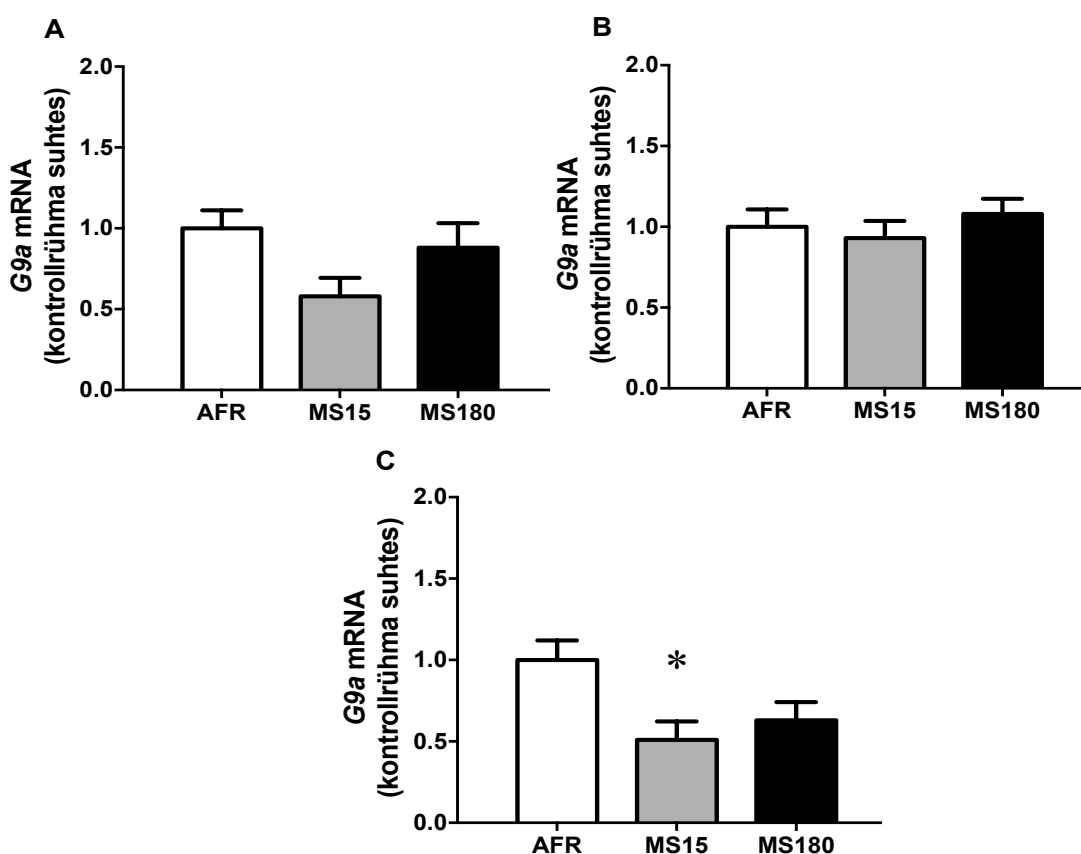


Joonis 15. *Dnmt3a/Tet1* juttkehas. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3a/Tet1* mRNA tasemetele ajapunktis PND15 rotipoegade juttkeha (*striatum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, *** $p < 0.001$ võrreldes AFR rühmaga; $n=6$.

4.10. *G9a* mRNA tasemete muutused rotipogade juttkehas

Maternaalse separatsiooni mõju vaadeldi ka histoonide metüültransferaasi *G9a* mRNA tasemetele. Katsete tulemusena selgus, et üldiselt emast eraldatus langetab *G9a* mRNA tasemeid, kuid muutused on üsna väiksed ning erinevused qPCR-i tulemustes liiga suured, et saada kätte statistiliselt olulised erinevused. Kolme päeva (Joonis 16A) vanustel rotipogadel esines kõige madalam mRNA tase MS15 (0,58 ± 0,114) rühma loomadel võrreldes kontrollrühmaga (1 ± 0,112), $n=6$. Statistiliselt olulisi tulemusi ei saadud ka kaheksa päeva (Joonis 16B) vanuste loomade võrdlusel. Antud katsetes esinesid kõigil rühmadel peaaegu sama suured mRNA tasemed.

Ainus statistiliselt oluline erinevus leiti 15. päeva (Joonis 16C) vanuste rotipogadega tehtud katsetest, kus märgatav mRNA taseme langus esines MS15 rühma loomadel (0,51 ± 0,112) võrreldes AFR rühmaga (1 ± 0,12) $p<0.05$. Trend langusele esines ka MS180 rühmal, kuid see oli statistiliselt ebaoluline.

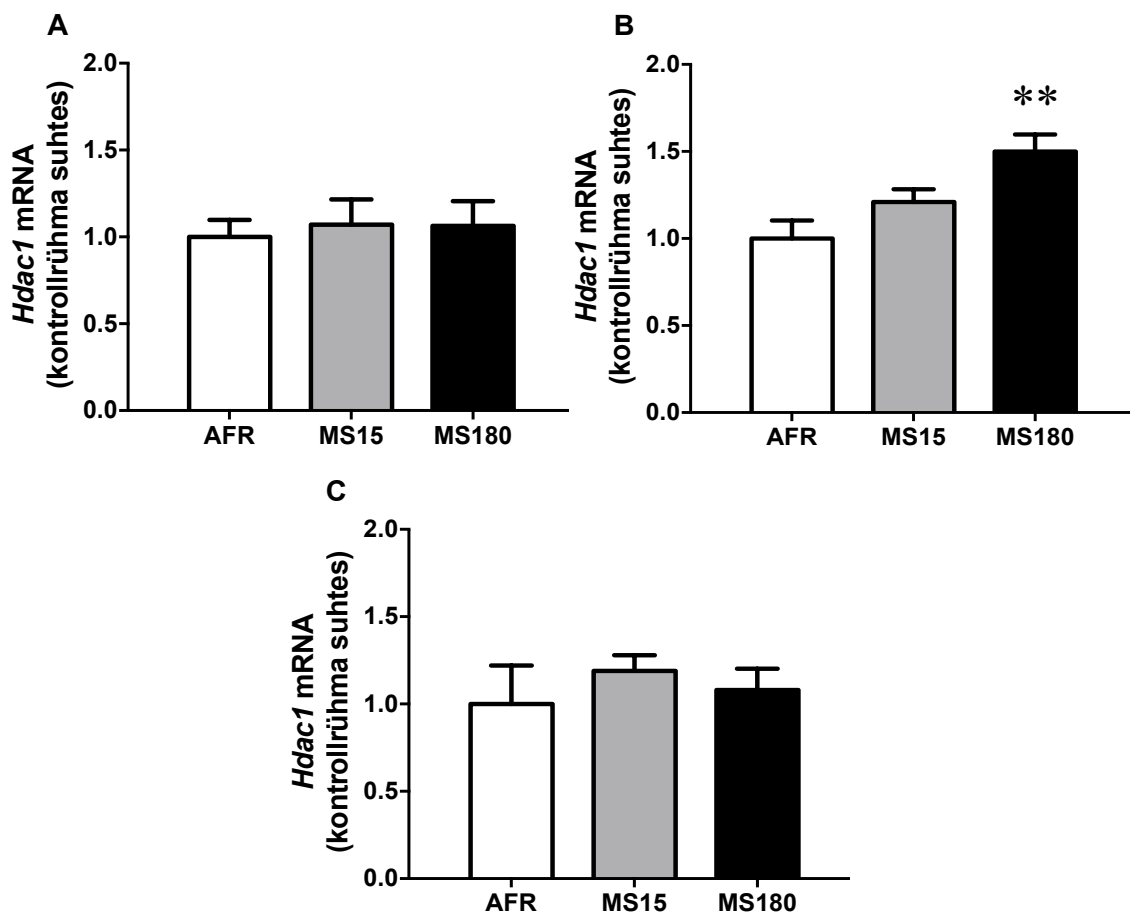


Joonis 16. *G9a* juttkehas. Maternaalse separatsiooni mõju *G9a* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipogade juttkeha (*striatum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, * $p<0.05$ võrreldes AFR rühmaga; $n=6$.

4.11. *Hdac1* mRNA tasemete muutused rotipoegade juttkehas

Järgnevalt vaadeldi (Joonis 17), kuidas maternaalne separatsioon ja ajaline dünaamika (PND3, 8, 15) mõjutab histooni deatsetülaasi mRNA tasemeid. *Hdac1* mRNA-d jälgiti vaid juttkehas, sest ei leitud märgatavaid erinevusi mRNA tasemetes. Kolme päeva (Joonis 17A) vanustel rotipoegadel jäid mRNA tasemed üsna ühele nivoole kõigis uuritavates rühmades (AFR, MS15, MS180).

Kaheksandaks päevaks (Joonis 17B) olid mRNA tasemed tõusnud statistiliselt olulisel määral vaid MS180 ($1,5 \pm 0,09$) rühmas võrreldes kontrollrühmaga ($1 \pm 0,103$), $p < 0.01$; $n=6$. Väikest, kuid mitte olulist tõusu oli märgata ka MS15 rühma ja AFR rühma võrdluses. Lisaks vaadeldi ka PND15 (Joonis 17C) päeva, kus mRNA tasemed olid jällegi võrdsustunud ja statistiliselt olulist erinevust ei leitud.

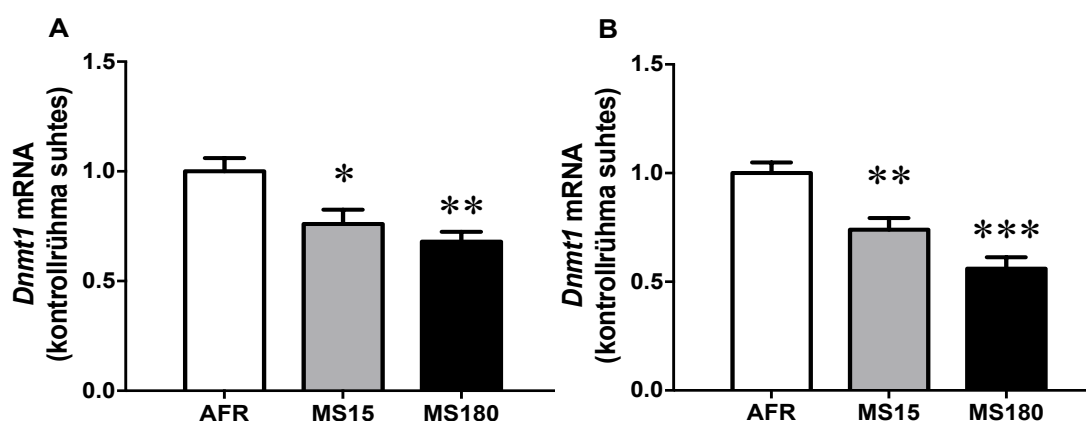


Joonis 17. *Hdac1* juttkehas. Maternaalse separatsiooni mõju *Hdac1* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND8 C) PND15 rotipoegade juttkeha (*striatum*). Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, ** $p < 0.01$ võrreldes AFR rühmaga; $n=6$.

4.12. Epigeneetiliste modifitseerijate mRNA tasemete muutused leukotsüütides

Lisaks juttkehale ja väikeajule vaadeldi mõnede (Joonised 18-21) geenide mRNA tasemeid ka leukotsüütides, et leida potentsiaalset biomarkerit. Esmalt vaadeldi *Dnmt1* mRNA tasemete varieeruvust kolme (Joonis 18A) päeva vanuste rotipogade leukotsüütides. Tulemused sarnanesid *Dnmt1* mRNA varieeruvusega rotipogade väikeajus (Joonis 8A). Ka siin leiti statistiliselt oluline langus mRNA tasemetes nii MS15 ($0,76 \pm 0,065$) kui ka MS180 ($0,68 \pm 0,045$) rühma loomadel võrreldes AFR ($1 \pm 0,061$) rühmaga, MS15 vs AFR, $p < 0,05$ ja MS180 vs AFR, $p < 0,01$; $n=6$.

PND15 (Joonis 18B) ajapunktis esines samasugune trend mRNA tasemete languse suunas, kuid tulemused olid statistiliselt suurema olulisusega. Maternaalse separatsiooni järgselt oli enim langenud MS180 ($0,56 \pm 0,053$) rühma loomade *Dnmt1* mRNA tase, võrreldes kontrollrühmaga ($1 \pm 0,049$), $p < 0,001$. Lisaks olid statistiliselt olulisel määral langenud ka MS15 ($0,74 \pm 0,053$) rühma loomade mRNA tasemed, võrreles AFR rühmaga, $p < 0,01$; $n=6$.

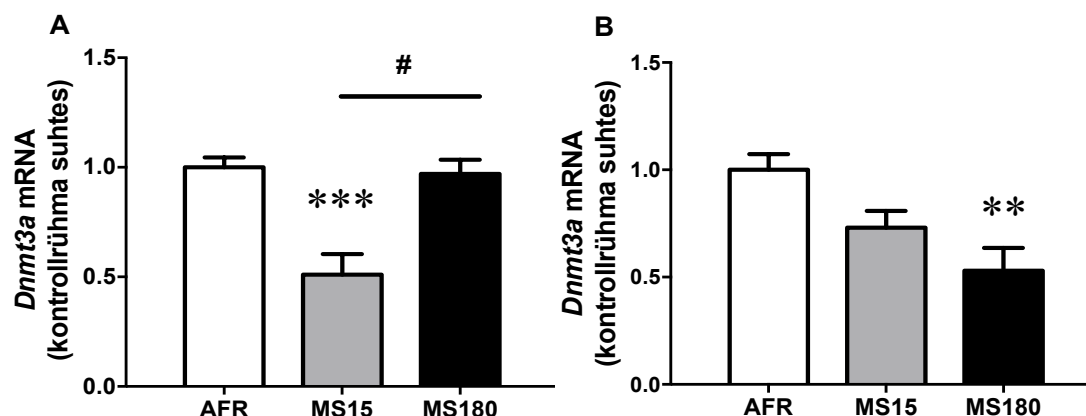


Joonis 18. *Dnmt1* leukotsüütides. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt1* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND15 rotipogade leukotsüütides. Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ võrreldes AFR rühmaga; $n=6$

Järgnevalt vaadati ka *Dnmt3a* mRNA tasemete varieeruvust kolme päeva (Joonis 19A) vanuste rotipogade leukotsüütides. Saadud tulemused sarnanevad DNMT3a WB tulemustega (Joonis 10A), ka siin esines statistiliselt oluline langus mRNA tasemets MS15 ($0,51 \pm 0,094$) rühma loomadel võrreldes AFR ($1 \pm 0,045$) rühmaga, $p < 0,001$. Lisaks leiti oluline erinevus ka MS 15 vs MS180 ($0,97 \pm 0,065$) rühmade võrdluses, $p < 0,01$; $n=6$.

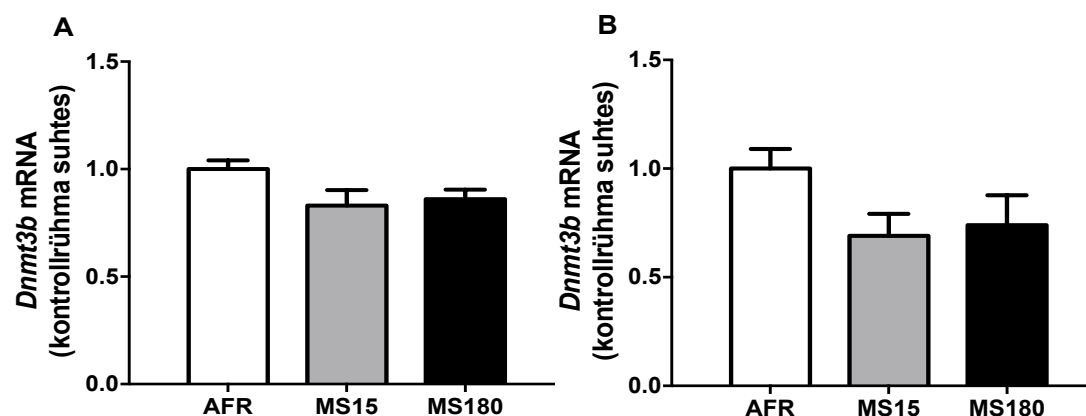
15. päeva (Joonis 19B) vanuste rotipogade *Dnmt3a* mRNA tasemed erinesid kolme päeva vanuste poegade omadest. Antud ajapunktis esines trend mRNA tasemete langusele ning

ainus statistiliselt oluline erinevus leiti MS180 ($0,53 \pm 0,106$) ja AFR ($1 \pm 0,073$) rühma loomade võrdluses, $p < 0,01$; $n = 6$.



Joonis 19. *Dnmt3a* leukotsüütides. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3a* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 B) PND15 rotipogade leukotsüütides. Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ võrreldes AFR rühmaga; # $p < 0,01$ MS15 vs. MS180; $n = 6$

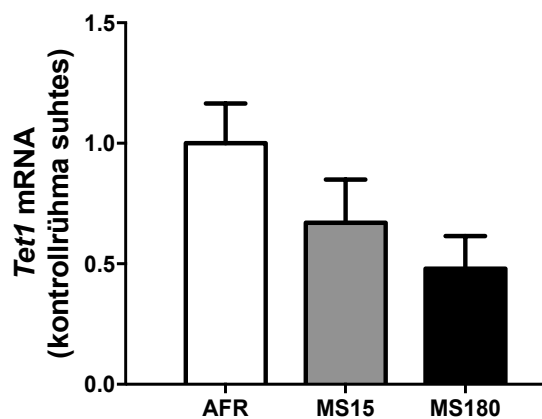
Kahjuks ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi *Dnmt3b* mRNA tasemetes kolme (Joonis 20A) ega ka 15. päeva (Joonis 20B) vanuste rotipogade leukotsüütides. Märkata oli vaid minimaalset trendi mRNA languse suunas emast eraldatud loomadel.



Joonis 20. *Dnmt3b* leukotsüütides. Maternaalse separatsiooni mõju *Dnmt3b* mRNA tasemetele ajapunktides A) PND3 C) PND15 rotipogade leukotsüütides. Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, võrreldes AFR rühmaga; $n = 6$

Lisaks ei leitud MS-i statistiliselt olulist mõju ka *Tet1* mRNA (Joonis 21) tasemetele. Küll aga esines märgatav trend mRNA tasemete langusele PND15 emast eraldatud loomadel. Suurim erinevus esines MS180 ($0,48 \pm 0,135$) rühma ja AFR ($1 \pm 0,165$) rühma loomade mRNA

tasemete vahel, kuid suure SEM variatsiooni tõttu ei tekkind statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel.



Joonis 21. *Tet1* leukotsüütides. Maternaalse separatsiooni mõju *Tet1* mRNA tasemetele PND15 rotipoegade leukotsüütides. Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest, võrreldes AFR rühmaga; $n=6$

4.13. Arutelu

Varajases elueas kogetud stressi modelleerimiseks kasutasime maternaalse separatsiooni mudelit, kus kahe esimese elunädala jooksul eraldati rotipojad emast igapäevaselt 180-minutit, kontroll rühmades käteldi loomi 15 minutit või ei häiritud pesakonda 2 nädala jooksul.

Rotipoegade kehakaalu analüüs näitas, et 3. ja 8. päeval tehtud mõõtmistel oli kõige suurem kehakaal MS15 gruppi loomadel (Joonised 5A ja 5B). Ka teised varasemad uuringud on näidanud, et kerge-mõõdukas lühiaegne stress võib mõjutada arengut stimuleerivalt (Gilles, et al., 1996). Selle põhjuseks võib olla ka see, et lühiaegse emast eemaldamise (pesa lõhkumine) järel hoolitses ema kompensatoorselt rohkem oma poegade eest. MS180 grupi loomade kehakaalus aga nägime kõigis kolmes ajapunktis kehakaalu olulist langust võrreldes AFR ja MS15 grupi loomade kehakaaluga (Joonised 5A-C), viidates, et tugev varajases elueas kogetud stress pärsib katseloomade arengut.

Kuna nägime, et tugeva stressi foonil langes oluliselt rotipoegade kehakaal, oli meie järgmiseks eesmärgiks hinnata stressihormooni kortikosterooni tasemeid rotipoegade vereplasmas. Varasemad uuringud on näidanud, et kortikosterooni taseme tõus seostub katseloomadel stressi tugevusega ning enim mõjutatavad on loomad PND2-15 päevadel (Roque, et al., 2014). Meie kortikosterooni analüüs rotipoegade vereplasmas näitas, et alates 3. postnataalsest päevast hakkas kortikosterooni tase vereplasmas suurenema nii MS15 kui ka MS180 rühmas võrreldes AFR rühma loomadega (Joonis 6). 15. postnataalsel päeval oli statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ja MS180 gruppide vahel (Joonis 6C). Nii rotipoegade kehakaalu erinevused kui ka kortikosterooni taseme suurenemine viitavad, et MS põhjustab progresseeruvat stressi süvenemist varajases postnataalses perioodis.

Selleks, et hinnata MS-i poolt põhjustatud püsivaid geeni ekspressiooni muutusi, eraldasime uuritavad koed 24 tundi peale viimast katset (separatsioon 15 või 180 minutit). Meie senised tulemused näitavad, et epigeneetilistest modifitseerijatest (*Dnmt-d*, *Tet1*, *G9a* ja *Hdac1*) mõjutab MS kõige tugevamalt erinevaid DNA metüültransferaase. Kõigi kolme metüültransferaasi puhul võis täheldada, et nii juttkehas, väikeajus kui leukotsüütides oli 3. postnataalsel päeval stressi tugevusest sõltuv *Dnmt-de* mRNA tasemete langus (Joonised 7-9 ja 11-13 A, 18-20 A). Samas kui 8. ja 15. postnataalsel päeval DNA metüültransferaaside mRNA tasemed suurenesid vastavalt stressile juttkehas ja väikeajus (Joonised 7-9 ja 11-13 A,

B). Viimased tulemused langevad kokku meie varasemate tulemustega, kus leidsime, et 15. postnataalsel päeval oli MS15 ja MS180 rühma loomadel naalduvas tuumas (juttkeha ventraalne osa) *Dnmt1*, *Dnmt3a* ja *Dnmt3b* mRNA tasemed tõusnud (Anier, et al., 2014). Mis on sellise DNA metüültransferaaside dünaamika põhjuseks, vajab veel edasisi uuringuid.

Meie poolt läbiviidud DNMT3A valgu analüüs (Joonised 10A ja 10B) ei langenud päris täpselt kokku *Dnmt3a* mRNA taseme muutustega. Samuti ei olnud kokkulangevusi erinevate katsete vahel, mistõttu tuleb *Western bloti* analüüsi kohandada ja katseid korrata.

Analüüsides varajase eluea stressi ajalise dünaamika mõju *Dnmt*-de mRNA tasemetele, leidsime *Dnmt*-de mRNA tasemetes mõningaid erinevusi võrreldes juttkeha ja väikeajuga. Valdavalt olid *Dnmt*-de mRNA tasemete erinevused kvantitatiivsed – väikeajus oli *Dnmt*-de mRNA tasemed madalamad võrreldes juttkehaga. Selle põhjuseks võib olla erinev glükokortikoid retseptorite arv ja sekundaarsete signaalradade aktiivsus erinevates aju piirkondades. Meie uurimisrühma publitseerimata tulemused viitavad, et glükokortikoidi retseptorid võivad otseselt transkriptsiooni faktoritena mõjutada *Dnmt3a* ja *Dnmt3b* transkriptsiooni *in vitro* kortikaalsetes roti neuronite primaarkultuuris ja *in vivo* roti kortikaalses ajukoos (Urb, et al., 2016).

Paralleelselt *Dnmt*-de mRNA tasemete uurimisega juttkehas ja väikeajus, hindasime mRNA tasemel muutuseid ka leukotsüütides, et selgitada, kas MS mõjutab DNA metüültransferaase sarnaselt ajukoega ka leukotsüütides. Huvitav oli, et 3. postnataalsel päeval esines langus *Dnmt1* mRNA tasemetes nii leukotsüütides (Joonis 18A) kui ajukudedes (Joonised 7A ja 8A) andes hea korrelatsiooni nii MS15 kui MS180 rühmas. *Dnmt3a* mRNA tulemused näitasid head korrelatsiooni MS15 rühmas nii leukotsüütides (Joonis 19A) kui ka juttkehas (Joonis 9A) ning väikeajus (Joonis 11A), kuid kahjuks ei esinenud korrelatsiooni MS180 rühmas võrreldes *Dnmt3a* mRNA tasemeid leukotsüütide vs ajukude. Samuti ei õnnestunud leida korrelatsiooni *Dnmt3b* mRNA tasemetes. Meie tulemused näitasid, et 15. postnataalsel päeval oli stressi suurenemisel trend pigem *Dnmt*-de mRNA tasemete vähenemisele leukotsüütides (Joonised 18B, 19B, 20B), samas kui juttkehas ja väikeajus oli trend vastupidine. Seega meie senised tulemused viitavad, et *Dnmt*-de mRNA tasemete dünaamikas ei olnud sarnasusi erinevate aju piirkonna kudede ja leukotsüütide vahel. Mistõttu hüpotees, et leukotsüütide *Dnmt*-de mRNA tasemed võiksid olla epigeneetiliste biomarkerite kandidaatideks, ei leidnud nende katsetega kinnitust.

Antud teadustöös uurisime ka kuidas mõjutab MS DNA demetülaasi *Tet1* ajalised dünaamikad nii rotipoegade juttkehas kui leukotsüütides. Meie tulemused näitasid, et *Tet1* mRNA tase suurenes statistiliselt 8. postnataalsel päeval juttkehas (Joonis 14B), kuid muutused puudusid 3. ja 15. postnataalsel päeval. Leukotsüütides oli 15. postnataalsel päeval täheldatav trend *Tet1* mRNA tasemete langusele, mis langes kokku stressi tugevusega, kuid statistiline erinevus rühmade vahel puudus (Joonis 21). Need tulemused viitavad, et MS ei mõjuta oluliselt *Tet1* mRNA taset juttkehas ega leukotsüütides. Antud töös me ei analüüsinud teisi TET perekonna ensüüme (*Tet2* ja *Tet3*), kuid senised uuringud viitavad, et erinevate stressorite toimel nende ensüümide ekspressioon muutub sarnaselt (Anier, et al., 2016).

Meie DNA metülaaside ja demetülaasi tulemused viitavad, et 15. postnataalsel päeval (24 tundi peale viimast katset) on juttkehas tekkinud DNA metüülimist ja -demetüülimist kodeerivate geenide transkriptsiooni tasemetes düsbalans – suurenenud on *Dnmt*-de mRNA tasemed samas kui *Tet1* tase ei ole muutunud (Joonis 15). Edasised uuringud peavad näitama, kas erinevused mRNA tasemetes kajastuvad erinevustega ka DNA metülaaside ja -demetülaaside ensüümaatilistes aktiivsustes ning kas see mõjutab globaalselt ka DNA metüülimise/demetüülimise tasakaalu juttkehas.

Antud projekti raames hindasime ka maternaalse separatsiooni mõju histoonide modifitseerijatele (*G9a* ja *Hdac1* mRNA tasemete ajaline dünaamika rotipoegade juttkehas). Tulemused näitasid, et *G9a* mRNA tase langes (statistiliselt oluliselt) 15. postnataalsel päeval MS15 rühmas (Joonis 16C) ning *Hdac1* mRNA tase tõusis 8. postnataalsel päeval juttkehas (Joonis 17B). Varasemad uuringud on näidanud, et maternaalne separatsioon rottipoegadel mõjutab histoonide modifikatsioone, kuid seda on veel vähe uuritud ning tulemused on ebaselged (Blaze & Roth, 2013). Ka meie esialgsed tulemused viitavad, et varajase eluea stress võib mõjutada ka histoonide modifitseerijaid, kuid stressi toime on pigem väiksem ja dünaamilisem kui maternaalse separatsiooni mõju DNA metüültransferaasidele.

5. JÄRELDUSED

Olulisemad magistritöö järeldused:

- Alates 8. PND hakkas MS180 rühma rotipogade kehakaal suurenemine (statilistiliselt oluliselt) maha jääma AFR ja MS15 rühma rotipogade kehakaalust, viidates, et tugev varajase eluea stress pärsib katseloomade arengut.
- Alates 3. PND hakkas kortikosterooni tase vereplasmas suurenema nii MS15 kui ka MS180 rühma rotipogadel võrreldes AFR grupi loomadega. 15 postnataalsel päeval oli statistiliselt oluline erinevus ka MS15 ja MS180 gruppide vahel. Nii rotipogade kehakaalu erinevused kui ka kortikosterooni taseme suurenemine viitavad, et MS varajases postnataalses perioodis põhjustab rotipogadel progresseeruvat stressi süvenemist.
- Meie esialgsed tulemused viitavad, et epigeneetilistest modifitseerijatest mõjutab MS ajus kõige enam erinevaid DNA metüültransferaase. Nii *Dnmt1*, *Dnmt3a* ja *Dnmt3b* mRNA tasemetes juttkehas ja väikeajus esines sarnane dünaamika – 3. postnataalsel päeval esines stressi tugevusest sõltuv mRNA tasemete langus, samas 8. ja 15. PND DNA metüültransferaaside mRNA tasemed suurenesid vastavalt stressi suurenemisele. Analüüsides varajase eluea stressi mõju peaju tasemel siis meie tulemused viitavad, et varajane eluea stress võib mõjutada kogu aju ning erinevused aju erinevates piirkondades on pigem kvantitatiivsed.
- Meie senised tulemused viitavad, et *Dnmt*-de mRNA tasemete dünaamikas ei olnud sarnasusi erinevate aju piirkondade ja leukotsüütide vahel. Mistõttu hüpotees, et *Dnmt*-de mRNA tasemete muutused leukotsüütides võiksid olla stressist tingitud aju muutuste epigeneetiliste biomarkerite kandidaatideks, ei leidnud nende katsetega kinnitust.
- MS ei mõjuta oluliselt *Tet1* mRNA taset juttkehas ega leukotsüütides. Meie DNA metüülaaside ja demetülaasi qPCR tulemused viitavad, et 15. PND on juttkehas tekkinud DNA metüülimist ja demetüülimist kodeerivate geenide transkriptsiooni tasemetes düsbalans – juttkehas on suurenenud *Dnmt*-de mRNA tasemed samas kui *Tet1* tase ei ole muutunud. Kas see mõjutab DNA metüülimise ja demetüülimise tasakaalu, vajab edasisi uuringuid.
- Esialgsed tulemused viitavad, et varajase eluea stress võib mõjutada ka histoonide modifitseerijaid, kuid stressi toime on pigem väiksem ja dünaamilisem kui maternaalse separatsiooni mõju DNA metüültransferaasidele.

KOKKUVÕTE

Varajases elueas kogetud stress võib esile kutsuda pikaajalisi neurobioloogilisi muutusi, mis suurendavad erinevate psühhopatoloogiate ja teiste haiguste väljakujunemise riski täiskasvanueas. Kuna sünnijärgselt on aju veel plastiline ja vastuvõtlik erinevatele muutustele, siis mõjuvadki erinevad stressorid varajases eas enamasti ajule. Mehhanismid, mis mõjutavad tugeva ja pikaajalise stressi tõttu aju erinevaid piirkondi, ei ole veel päris selged, kuid erinevate hüpoteeside kohaselt tekivad püsivad neurobioloogilised häired just püsivate muutuste tõttu raku geeniekspressiooni regulatsioonis. Geeniregulatsiooni mõjutavad aga erinevad epigeneetilised mehhanismid läbi DNA ja histoonide modifikatsioonide.

Käesoleva töö üldeesmärgiks oli hinnata varajase eluea stressi (maternaalse separatsiooni) mõju epigeneetilistele modifitseerijatele. Antud töö hõlmab ka ühte osa meie uurimisrühma suuremast teadustööst, mis uurib MS-i mõju epigeneetilistele modifitseerijatele ning seeläbi ravimisõltuvuse kujunemisele. Varajase eluea stressi tekitamiseks kasutati antud töös MS mudelit, kus rotipojad eraldati emast 2.-14. elupäeva jooksul igapäevaselt 15 või 180 minutiks. Seejärel vaadeldi maternaalse separatsiooni mõju katseloomade kehakaaludele, kortikosterooni tasemetele ja erinevatele epigeneetilistele modifitseerijatele. Epigeneetiliste modifitseerijate (*Dnmt-d*, *Tet1*, *G9a*, *Hdac1*) ekspressioonitasemete varieeruvusi vaadeldi nii katseloomade juttkehas, väikeajus kui ka leukotsüütides.

Katsete tulemused näitasid, et MS suurendas kortikosterooni taset rotipoegade vereplasmas nii MS15 kui ka MS180 rühma loomadel, mis tõestab ka, et emast eraldamine tõstab rotipoegade stressitaset. Suurenenud stressi tagajärjel vähenesid MS180 rühma loomade kehakaalud, samas kui MS15 rühma rotipoegade kehakaalud pigem tõusid. MS mõjutas märgatavalt ka erinevate *Dnmt*-de mRNA tasemeid, kus esmalt (PND3) *Dnmt*-de mRNA tase langes märkimisväärselt rotipoegade juttkehas ja väikeajus, kuid postnataalsetel päevadel 8 ja 15, tõusis. Kahjuks ei kattanud omavahel juttkeha/väikeaju ja leukotsüütide mRNA tulemused, mistõttu ei saa *Dnmt*-sid kasutada biomarkerina stressist tingitud patoloogiate hindamiseks, kuid antud teema vajaks kindlasti edasisi uuringuid. DNA demetüülijä (*Tet1*) mRNA tasemed jäid aga muutumatuks. Samas leiti, et MS-i mõjutab histoonide modifitseerijaid, kuid väiksemal määral võrreldes *Dnmt*-ga. Meie katsetulemused näitavad, et esineb seos varajase eluea stressi ja epigeneetiliste modifikatsioonide vahel, kuid antud teema vajab veel põhjalikumaid lisauuringuid.

SUMMARY

The effects of early life stress on epigenetic modifiers

Kerly Niinep

Early life stress could cause long-lasting neurobiological changes, that increase the risk of different psychopathologies and other diseases in adulthood. Since the brain is still very plastic and susceptible to various changes in the perinatal period, then in early age different stressors affect mostly the brain. The mechanisms, that affect different regions of the brain on a strong and long-term stress are not yet clear. However, different hypotheses suggest that persistent neurobiological disorders are caused by permanent changes in the regulation of cellular gene expression. Gene regulation, however is affected by various epigenetic mechanisms through DNA and histone modifications.

The general aim of this study was to investigate the role of early life stress (maternal separation) on epigenetic modifiers. This work is also one part of a larger study of our research, which examines the impact of MS on epigenetic modifiers and the drug addiction. MS model was used in this work to create early life stress, in which rat pups were separated from their mother on daily basis for 15 or 180 minutes on PND 2-15. Then the maternal separation effect was observed through body weight of the experimental animals and the levels of various epigenetic modifiers/corticosterone were measured. Variations in the expression levels of epigenetic modifiers (*Dnmts*, *Tet1*, *G9a*, *Hdac1*) were observed in the striatum, cerebellum, as well as in leukocytes on test animals.

Our data demonstrated that the MS increased corticosterone levels in the blood plasma of rat pups in both MS15 and MS180 animal groups, which also proves that separation will increase the level of stress on the rat pups. Increased stress resulted in decreased body weights MS180 group of animals, while the MS15 group's body weights rather rose. MS also influenced significantly mRNA levels of different *Dnmt*, where at first (PND3) mRNA levels of *Dnmt* were significantly reduced in pup striatum and cerebellum, but after postnatal days 8 and 15, mRNA levels rose. Unfortunately, striatum/cerebellum, and white blood cell mRNA results did not correlate with each other, therefore *Dnmts* cannot be used as a biomarker to assess stress-related pathologies, but this issue requires further studies. DNA *Tet1* mRNA levels

remained unchanged. It was found that MS affected histone modifiers, but to a lesser extent compared with *Dnmts*. Our experimental results show that there is a link between early life stress and epigenetic modifications, but this issue needs more thorough experiments.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma toredaid juhendajaid, Anti Kaldat, Kaili Anieri, kellega koostöös käesolev töö valmis ning kes alati abistasid mind. Eriti suur tänu on just sulle Kaili, et sa olid nõus mind igal ajahetkel nõustama ja abistama. Lisaks tahaks tänada ka Külli Jaakot *Western bloti* tehnika õpetamise eest, oma kaasjuhendajat Neeme Tõnissoni heade õpetussõnade eest ning oma tädi Ivi Niinepit korrektuuride eest. Mainimata ei saa ka jätta kõiki teisi toredaid Farmakoloogia osakonna liikmeid, kes tegid minu laboripäevad lõbusamaks.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Allfrey, V., Faulkner, R., & Mirsky, A. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 786-794.
- Anier, K., Malinovskaja, K., Pruus, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2014). Maternal separation is associated with DNA methylation and behavioural changes in adult rats. *European Neuropsychopharmacology*, 24, 459-468.
- Anier, K., Urb, M., Matsalu, T., Kipper, K., Herodes, K., Timmusk, T., Kalda, A. (2016). The role of DNA methylation and demethylation in the expression of cocaine-induced behavioural sensitisation in mice. *Publitseerimata andmed*.
- Bamberger, C., Schulte, H., & Chrousos, G. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine reviews*, 17(3), 245-261.
- Barbera, B. A., & Rastegara, M. (2010). Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Annals of Anatomy*, 192, 261–274.
- Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447, 407-412.
- Bierne, H., Hamon, M., & Cossart, P. (2012). Epigenetics and Bacterial Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69, 89-95.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, (6), 6-12.
- Blaze, J., & Roth, T. (2013). Exposure to caregiver maltreatment alters expression levels of epigenetic regulators in the medial prefrontal cortex. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 31(8).

- Bonasio, R., Tu, S., & Reinberg, D. (2010). Molecular Signals of Epigenetic States. *Science*, 330(6004), 612–616.
- Bourchis, D., Xu, G.-L., Lin, C.-S., Bollman, B., & Bestor, T. H. (2001). Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. *Science*, 294(5551), 2536-2539.
- Breivik, T., Gundersen, Y., Murison, R., Turner, J. D., Muller, C. P., Gjermo, P., & Opstad, P. K. (2015). Maternal Deprivation of Lewis Rat Pups Increases the Severity of Experimental Periodontitis in Adulthood. *The Open Dentistry Journal*, 9, 65-78.
- Brunton, P. J. (2013). Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction*, 146, R175-R189.
- Burke, H., Davis, M., Otte, C., & Mohr, D. (2005). Depression and cortisol responses to psychological stress: A meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 30(9), 846–856.
- Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (1999). DNA Methyltransferase Is Actively Retained in the Cytoplasm during Early Development. *The Journal of Cell Biology*, 147(1), 25-32.
- Champagne, F. A., & Curley, J. P. (2009). Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 593–600.
- Cloos, P., Christensen, J., Agger, K., & Helin, K. (2008). Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *genes & development*, 22, 1115–1140.
- Cristina, C., & Leonhardt, H. (1999). DNA Methyltransferase Is Actively Retained in the Cytoplasm during Early Development. *The Journal of Cell Biology*, 147(1), 25-32.
- Daniels, W., Fairbairn, L., van Tilburg, G., McEvoy, C., Zigmond, M., Russell, V., & Stein, D. (2009). Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 17 glucocorticoid receptor promoter region. *Metabolic brain disease*, 24, 615–627.
- Daniels, W., Fairbairn, L., van Tilburg, G., McEvoy, C., Zigmond, M., Russell, V., & Stein, D. (2009). Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 17 glucocorticoid receptor promoter region. *Metabolic Brain Disease*, 24(4), 615–627.
- De Ruijter, A., Van Gennip, A., Caron, H., Kemp, S., & Van Kuilenburg, A. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical journal*, 370(3), 737-749.

- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015, April). What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics*, 199, 887-896.
- Dupont, C., Armant, D., & Brenner, C. (2009). Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Seminars in reproductive medicine.*, 27(5), 351-357.
- Eileen, G., & Nolan, C. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105, 4-13.
- García-Giménez, J. L., Ushijima, T., & Tollefsbol, T. O. (2015). Epigenetic Biomarkers: New Findings, Perspectives, and Future Directions in Diagnostics. In J. L. García-Giménez (Ed.), *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics* (pp. 2-15). Academic Press.
- Gilles, E. E., Schultz, L., & Baram, T. Z. (1996). Abnormal Corticosterone Regulation in an Immature Rat Model of Continuous Chronic Stress. *Pediatric neurology*, 15, 114-119.
- Goll, M., & Bestor, T. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*(74), 481-514.
- Goll, M., Kirpekar, F., Maggert, K., Yoder, J., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Bestor, T. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science*, 311(5759), 395-398.
- Goosens, K., & Sapolsky, R. (2007). Stress and Glucocorticoid Contributions to Normal and Pathological Aging. In R. DR, *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms* (pp. 305-322). Florida: CRC Press/Taylor & Francis.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., & Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129(8), 1983-1993.
- Hellstrom, I., Dhir, S., JC, D., & Meaney, M. (2012). Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone–serotonin–NGFI-A signalling cascade. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 367(1601), 2495-2510.
- Herman, J., McKlveen, J., Solomon, M., Carvalho-Netto, E., & Myers, B. (2012). Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(4), 292-298.
- Hiller-Sturmhofel, S., & Bartke, A. (1998). The endocrine system - An overview. *Alcohol health & Research world* , 22, 153-164.

- Hodawadekar, S., & Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene*, 26(37), 5528–5540.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33, 245-254.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code . *Science*, 293, 1074-1080.
- Kapoor, A., Agius, F., & Zhu, J.-K. (2005). Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. . *FEBS Lett* , 579, 5889–5898.
- Klose, R., & Bird, A. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*(31), 89-97.
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502, 472-479.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128, 693–705.
- Kress, C., Thomassin, H., & Grange, T. (2001). Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted ? . *FEBS Letters*, 494, 135-140.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Meaney, M. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277, 1659–1662.
- Liu, Y., Oakeley, E., Sun, L., & Jost, J.-P. (1998). Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Research*, 26(4), 1038-1045.
- Lorenzo, A. D., & Bedford, M. T. (2011). Histone arginine methylation. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 585, 2024–2031.
- Lupien, S., B.S., M., Gunnar, M., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), 434-445.
- Macri, S., & Würbel, H. (2006). Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior*, 50, 667–680.
- Macri, S., Chiarotti, F., & Würbel, H. (2008). Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behavioural Brain Research*, 191, 227–234.

- Margot, J. B., Ehrenhofer-Murray, A. E., & Leonhardt, H. (2003). Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Molecular Biology*, 4, 7.
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 838-849.
- McGowan, P., Sasaki, A., D'Alessio, A., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., Meaney, M. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience*, 12(3), 342–348.
- Minocherhomji, S., Tollefsbol, T. O., & Singh, K. K. (2012). Mitochondrial regulation of epigenetics and its role in human diseases. *Epigenetics*, 7(4), 326-334.
- Molet, J., Maras, P., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. (2014). Naturalistic Rodent Models of Chronic Early-Life Stress. *Developmental Psychobiology*, 58(8), 1675–1688.
- Murgatroyd, C., Patchev, A., Wu, Y., Micale, V., Bockmühl, Y., Fischer, D., Spengler, D. (2009). Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature neuroscience*, 12, 1559–1566.
- Ng, S. S., Yue, W. W., Oppermann, U., & Klosea, R. J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cellular and molecular life sciences*, 66(3), 407-422.
- Nicolaides, N. C., Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G. P., & Charmandari, E. (2015). Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 22, 6-19.
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200.
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28, 1057–1068.
- Robertson, K., & Wolffe, A. (2000). DNA methylation in health and disease. *Nature reviews genetics*, 1(1), 11-19.
- Roque, S., Mesquita, A. R., Palha, J. A., Sousa, N., & Correia-Neves, M. (2014). The behavioral and immunological impact of maternal separation: a matter of timing. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, Article: 192 .
- Rudenko, A., Dawlaty, M. M., Seo, J., Cheng, A. W., Meng, J., Le, T., Tsai, L.-H. (2013). Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction. *Neuron*, 79(6), 1109-1122.

- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes and development*, 18, 1251–1262.
- Sheroy, M., Tollefsbol, T. O., & Singh, K. K. (2012). Mitochondrial regulation of epigenetics and its role in human diseases. *Epigenetics*, 7(4), 326-334.
- Smith, R., & Mill, J. (2011). *Epigenetics and Chronic Diseases: An Overview*. London: Springer London.
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 383–395.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-45.
- Tan, L., & Shi, Y. G. (2012). Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development*, 139(11), 1895–1902.
- Tucker, K. (2001). Methylated Cytosine and the Brain: A New Base for Neuroscience. *Neuron*, 30(3), 649-652.
- Urb, M., Anier, K., Matsalu, M., Aonurm-Helm, A., Timmusk, T., & Kalda, A. (2016). Corticosterone induces the expression of DNA methyltransferases in rat cortical cells. *Publitsseerimata andmed*.
- Waddington, C. H. (1942). The Epigenotype. *Endeavour*, 1, 18-20.
- Weaver, I. C. (2007). Epigenetic Programming by Maternal Behavior and Pharmacological Intervention. *Epigenetics*, 2, 22–28.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., . . . Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, 7, 847–854.
- Weiss, A., & Cedar, H. (1997). The role of DNA demethylation during development. *Genes to Cells*, 2, 481–486.
- Wong, C. C., Mill, J., & Fernandes, C. (2011). Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. *Addiction*, 106, 480–489.
- Wu, C., & Morris, J. (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293(5532), 1103–1105.

Wu, H., Wu, X., Shen, L., & Zhang, Y. (2014). Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nature biotechnology*, 32(12), 1231-1240.

Wu, S. C., & Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 607-620.

Yang, X., & Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 26(37), 5310-5318.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://elisaanalysis.com/app>

(17.08.16)

LISA 1

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kerly Niinep (sünnikuupäev: 30.10.1989)

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

Varajase eluea stressi mõju epigeneetilistele modifitseerijatele,

mille juhendaja on prof. Anti Kalda, Ph.D, Kaili Anier, Ph.D, Neeme Tõnisson, Ph.D

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.07.17 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 18.08.16