

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND

BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

FARMAKOLOOGIA OSAKOND

Kerli Sikk

**Kokaiini mõju DNA modifitseerijatele inimese perifeerse vere
mononukleaarsetes rakkudes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendaja Mari Urb, PhD

Kaasjuhendaja prof. Ants Kurg, PhD

Tartu 2021

INFOLEHT

Kokaiini mõju DNA modifitseerijatele inimese perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes

Epigeneetilised mehhanismid, nagu DNA metülatsioon, mängivad rolli ravim sõltuvuse tekkel. Kokaiin võib modifitseerida läbi DNA metülatsiooni ja demetülatsiooni geenide transkriptsiooni ajus ja potentsiaalselt ka perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes. Käesolevas töös uuritakse kokaiini akuutse ja kroonilise töötuse mõju kuue geeni ekspressioonitasemele inimese perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes (*peripheral blood mononuclear cell*, PMBC). Uuritavateks geenideks on DNA metüültransferaasid *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ja TET metüültsütosiini dioksügenaasid *TET1*, *TET2*, *TET3*. Uuringu tulemustest selgus, et inimese PMBC-de korduv kokaiiniga töötlemine langetas oluliselt *TET1* mRNA taset. Tulemus viitab, et DNA demetülatsioon võib *TET1* ekspressiooni reguleerimise kaudu olla seotud ravim sõltuvuse püsivusega.

Märksõnad: PBMC, DNMT, TET, psühhostimulant, geeniekspressioon

CERCS: B220, B640

Effect of cocaine on DNA modifiers on human peripheral mononuclear cells

Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, are involved in the development of drug addiction. Cocaine may modify gene transcription in the brain and potentially in peripheral blood mononuclear cells through DNA methylation and demethylation. This study investigated the effect of acute and chronic cocaine exposure to expression levels of six genes in human peripheral blood mononuclear cells. The genes examined are DNA methyltransferases *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* and tet methylcytosine dioxygenases *TET1*, *TET2*, *TET3*. Results showed that chronic exposure to cocaine downregulated mRNA level of *TET1*. Thus, the results suggest that DNA demethylation by downregulating *TET1* expression, may be involved in the persistence of drug addiction.

Keywords: PBMC, DNMT, TET, psychostimulant, gene expression

CERCS: B220, B640

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Epigeneetika ja epigeneetilised mehhanismid.....	8
1.1.1. Epigenoom.....	8
1.2. DNA metülatsioon.....	9
1.2.1. DNA metüültransferaasid.....	11
1.2.2. DNA demetülatsioon.....	12
1.2.3. TET metüültsütosiini dioksügenaasid.....	13
1.3. Ravimsõltuvus.....	14
1.3.1. Mesolimbiline dopamiini rada.....	15
1.3.2. Kokaiin.....	16
1.4. Psühhostimulaatorite mõju epigeneetilistele mehhanismidele.....	17
1.5. Epigeneetilised biomarkerid.....	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	20
2.1. Töö eesmärk.....	20
3. MATERJAL JA MEETODID.....	21
3.1. Valimi kirjeldus.....	21
3.2. Perifeerse vere mononukleaarsed rakud.....	21
3.2.1. PBMC-de eraldamine.....	21
3.2.2. PBMC-de töötlus kokaiiniga.....	21
3.3. Geeniekspressiooni analüüs.....	22
3.3.1. RNA eraldamine.....	22
3.3.2. cDNA süntees.....	23
3.3.3. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon.....	23
3.4. Andmete statistiline analüüs.....	25

4. TULEMUSED	26
5. ARUTELU	31
KOKKUVÕTE	34
SUMMARY	35
KASUTATUD KIRJANDUS	36
TÄNUSÕNAD	45
LIHTLITSENTS	46

KASUTATUD LÜHENDID

5-caC	5-karboksüülsütosiin, ingl. k <i>5-carboxylcytosine</i>
5-fC	5-formüülsütosiin, <i>5-formylcytosine</i>
5-hmC	5-hüdroksümetüül-tsütosiin, <i>5-hydroxymethyl-cytosine</i>
5-mC	5-metüülsütosiin, <i>5-methyl-cytosine</i>
cDNA	komplementaarne DNA, <i>complementary DNA</i>
CpG	tsütosiin-fosfaat-guaniin dinukleotiid, <i>cytosine-phosphate-guanine dinucleotide</i>
DA	dopamiin, <i>dopamine</i>
DAT	dopamiini transporter, <i>dopamine transporter</i>
DNMT1	DNA metüültransferaas 1, <i>DNA methyltransferase 1</i>
DNMT2	DNA metüültransferaas 2, <i>DNA methyltransferase 2</i>
DNMT3A	DNA metüültransferaas 3A, <i>DNA methyltransferase 3A</i>
DNMT3B	DNA metüültransferaas 3B, <i>DNA methyltransferase 3B</i>
DNMT3L	DNA metüültransferaas 3-sarnane, <i>DNA methyltransferase 3-like</i>
FBS	veise loote seerum, <i>fetal bovine serum</i>
MBP	metüül-CpG-siduva domeeni valk, <i>methyl-CpG binding protein</i>
NAc	naalduv tuum, <i>nucleus accumbens</i>
ncRNA	mittekodeeriv RNA, <i>non-coding RNA</i>
PBMC	perifeerse vere mononukleaarne rakk, <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	fosfaatpuhverdatud soolalahus, <i>phosphate-buffered saline</i>
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
SEM	keskväärtuste standardviga, <i>Standard Error of the Mean</i>

TET	<i>ten eleven translocation</i>
TET1	TET metüültsütoosiini dioksügenaas 1, <i>tet methylcytosine dioxygenase 1</i>
TET2	TET metüültsütoosiini dioksügenaas 2, <i>tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TET3	TET metüültsütoosiini dioksügenaas 3, <i>tet methylcytosine dioxygenase 3</i>
VTA	ventraalne tegmentaalne ala, <i>ventral tegmental area</i>
β -ME	2-merkaptöetanool, <i>β-mercaptoethanol</i>

SISSEJUHATUS

Epigeneetika selgitab pärilike muutusi fenotüübis, mis ei ole tingitud muutustest DNA järjestuses. Rakkudes vastutavad geenide regulatsiooni eest epigeneetilised mehhanismid, millest uurituim on DNA metülatsioon. DNA metüleerimine jätab keemiliselt modifitseeritud tsütosiini kaudu DNA-le jälje, mis takistab transkriptsioonifaktoritel DNA-ga seonduda ja viib geeni inaktiveerimiseni. DNA metülatsiooni viivad läbi DNA metüültransferaasid (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*). DNA metülatsioon on hädavajalik imetajate esmase arengu ajal, kuid regulatoorne roll püsib ka sünnijärgselt, reguleerides näiteks õppimise ja mälu seotud geenide aktiivsust ja X-kromosoomi vaigistamist raku paljunemisel. DNA demetüleerimist katalüüsivad TET metüültsütosiini dioksügenaasid (*TET1*, *TET2*, *TET3*) ning lisaks ensüümiaktiivsusele varajases arengustaadiumis, on sünnijärgselt seostatud *TET1* aktiivsust kesknärvisüsteemis geeniekspressiooni muutustega.

Psühhostimulaatorid (näit. kokaiin, amfetamiin) on sõltuvuspotentsiaaliga ained, mille regulaarne tarbimine põhjustab ajus stabiilseid molekulaarseid muutusi, mis võivad mängida rolli ravimsõltuvuse püsimisel. Ravimsõltuvuse tekkerisk on individuaalne ning kõikidel regulaarsetel tarbijatel ei kujune sõltuvust. Samas arvatakse, et psühhostimulaatorist indutseeritud püsivad muutused ajus on sõltuvusse tagasi langemise aluseks peale võõrutust. Seni pole kindlat testi ravimsõltuvuse diagnoosimiseks, samuti puudub sõltuvushäirete jaoks efektiivne ravi, mis aitaks ainest võõranduda ning minimaliseerida ohtu tagasi sõltuvusse langeda.

Täielik arusaam kokaiini epigeneetiliselt mõjust on veel puudulik. Teadaolevalt vahendab DNA metülatsioon geeniekspressiooni muutusi vastusena keskkonnamõjule. Kokaiin võib mõjutada epigeneetiliste DNA modifitseerijate geeniekspressiooni ja seeläbi mõjutada märklaudgeenide avaldumist.

Käesolev töö on osa teadusuuringust, mis uurib kokaiini mõju epigeneetilistele modifitseerijatele ning seeläbi arendab arusaamist ravimsõltuvusest ja selle tekkemehhanismidest. Antud lõputöö eesmärgiks oli uurida kokaiini mõju *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ja *TET1*, *TET2*, *TET3* mRNA tasemetele inimese PBMC-des.

Antud bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli Meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja Siirdemeditsiini instituudi Farmakoloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Epigeneetika ja epigeneetilised mehhanismid

Epigeneetikat määratles esmakordselt 1942. aastal Conrad Hal Waddington, kirjeldades seda kui rida teadmata protsesse genotüübi ja fenotüübi vahel (Waddington, 1942). Epigeneetika oli algselt seotud arengubioloogiaga ning sai inspiratsiooni mõistest „epigenees“. Tänapäeval mõistetakse epigeneetika all peamiselt mitootiliselt ja/või meiootiliselt päranduvaid muutusi geeni funktsioonides, mida ei saa selgitada muutustega DNA järjestustes (Felsenfeld, 2014). Seega organismi fenotüübilised muutused ei ole ainult selgitatavad konkreetselt muutustega DNA järjestuses, vaid fenotüüpi mõjutavad keemilised modifikatsioonid DNA järjestusel, mis reguleerivad geenide avaldumist. Geenide reguleerimisega on seostatud kolm epigeneetilist mehhanismi: histoonide modifikatsioonid, DNA metülatsioon ja mittekodeerivad RNA-d.

DNA ligipääsetavuse reguleerimiseks pakitakse rakutuumas lineaarne DNA kõrgelt organiseeritud 3D struktuuri (Chen et al., 2017). Histonide ja teiste valkude abiga pakitakse DNA kokku kromatiiniks, mille põhistruktuuriks on nukleosoom. Nukleosoomi koosneb histoonide oktameerist (2 koopiat igat histooni H2A, H2B, H3 ja H4), mille ümber keritakse 1,65 kordselt ~147 aluspaaripikkune DNA lõik (Luger et al., 1997). Histonide modifikatsioonid hõlmavad histoonide keemilist modifitseerimist N-terminaalselt või C-terminaalselt, millele on võimalik lisada näiteks atsetüül-, metüül- või fosfaatrühm (Zhao & Shilatifard, 2019). Histonide modifikatsioonidega mõjutatakse eelkõige kromatiini struktuuri, mis väljendub DNA-histooni interaktsiooni nõrgenemises või stabiliseerumises, mis viib vastavalt kas geeni aktiveerimise või vaigistamiseni (Zhao & Shilatifard, 2019).

Geeniregulatsiooni mõjutavad ka mittekodeerivad RNA-d (*non-coding RNA*, ncRNA). ncRNA on DNA-lt transkribeeritud RNA, mida ei transleerita valkudeks (O'Donnell & Meaney, 2020). ncRNA-del on mitmeid funktsioone, näiteks moodustavad ncRNA-d komplekse teiste epigeneetiliste signaalidega, mis omavad rolli imetaja X-kromosoomi inaktivatsioonil (Chen et al., 2017).

1.1.1. Epigenoom

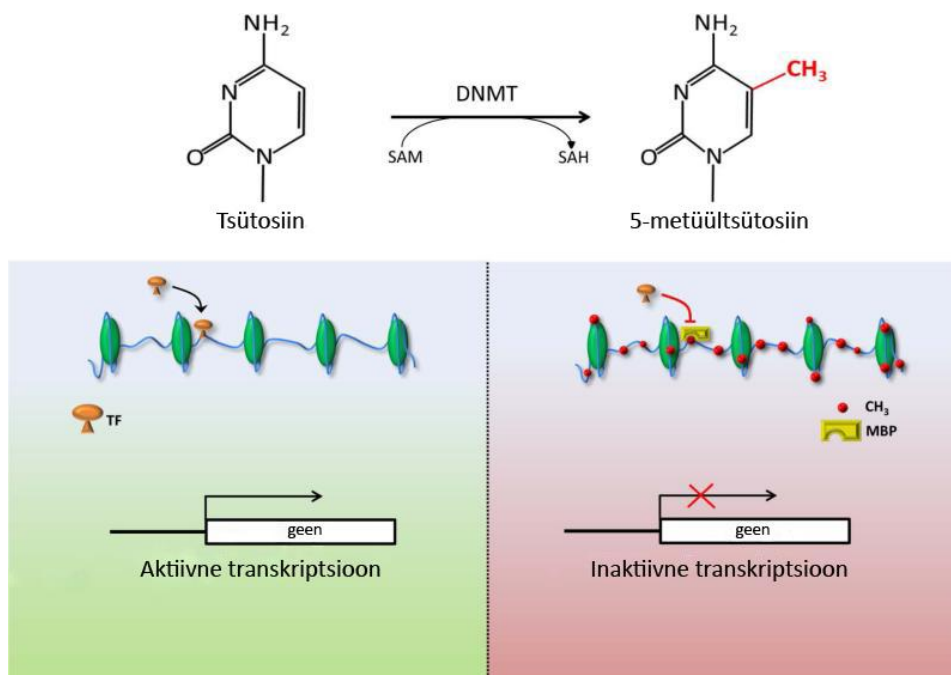
Kõik epigeneetilised märgistused üle genoomi ja modifikatsioonid kromatiinis kokku moodustavad epigenoomi, mis imetaja elu jooksul muutub nii spontaanselt kui ka keskkonna mõjul (O'Donnell & Meaney, 2020). Epigeneetilised mehhanismid vahendavad geeniekspressiooni muutusi vastusena keskkonnast tulenevatele stiimulitele nagu toitumine,

keemilised saasteained, varajases elueas kogetud stress, sõltuvust tekitavad ained (Kuehner et al., 2019). Epigenoomi kaardistamine annab tervikliku ülevaate epigeneetilistest märgistusest ja aitab paremini mõista epigeneetilisi tegureid inimese tervises ja haigustes, mistõttu on selle uurimisel tähtis koht meditsiinis (Chen et al., 2017; Rivera & Ren, 2013). See aitab paremini mõista, kuidas on näiteks reguleeritud geeniekspressioon kesknärvisüsteemis. Tänapäeval on uuringutes palju tähelepanu saanud epigeneetiliste mehhanismide roll erinevate neuropsühhiaatriliste haiguste puhul.

1.2. DNA metülatsioon

DNA metüleerimine on enim uuritud epigeneetiline mehhanism, mida üldiselt seostatakse geeniekspressiooni langusega (Holliday & Pugh, 1975; Moore et al., 2013). Modifikatsiooni DNA-l vahendavad DNA metüültransferaasid (DNA *methyltransferase*, DNMT) ning see seisneb metüülrühma (-CH₃) ülekandmisel S-adenosüül-L-metioniinilt tsütosiini 5' positsioonis olevale süsinikule (Joonis 1). Moodustuv kovalentne side on stabiilne ja seetõttu on seostatud DNA metüleerimist pikaajalise epigeneetilise märgistusega. DNA metüleerimine inhibeerib otseselt või kaudselt transkriptsioonifaktorite sidumist DNA-ga (Joonis 1). Metüleeritud DNA-ga on võimelised seonduma metüül-CpG-siduvat domeeni sisaldavad ensüümid (*methyl-CpG binding protein*, MBP), mis 5-mC-ga seondudes osalevad transkriptsiooni allasurumises ja geenide vaigistamises (Hendrich & Bird, 1998; Ludwig et al., 2016) (Joonis 1).

Suurem osa metüleeritud tsütosiine leidub tsütosiin-fosfaat-guaaniini dinukleotiidsetes (*cytosine-phosphate-guanine dinucleotide*, CpG) järjestustes, mis on inimese genoomis ~70-80% tõenäosusega metüleeritud (Chen & Riggs, 2011). Genoomis eristatakse kõrgema CpG tihedusega regioone (~1000bp), mida nimetatakse CpG saarteks (Moore et al., 2013). Umbes 50% CpG saartest paiknevad geenide 5' promootori otsas (Ioshikhes & Zhang, 2000). CpG saarte läheduses paiknevad mitmed transkriptsiooni algussaidid, milles CpG alade metüleerimine takistab transkriptsioonifaktorite seondumist ning geeni transkriptsiooni (Saxonov et al., 2006; Edwards et al., 2017).



Joonis 1. DNA metülatiooni seostatakse üldiselt inaktiivse transkriptsiooni ja vähenenud geeniekspressiooniga. Joonisel on kujutatud DNA metüleerimisega ja inaktiivse transkriptsiooniga seotud molekulaarset mehhanismi. Tsütosiin on katalüüsitud 5-mC-ks DNMT abil. MBP ensüümi seondumine metüleeritud järjestustele takistab transkriptsioonifaktoritele ligipääsu DNA-le, seeläbi surudes maha transkriptsiooni. DNMT = DNA metüültransferaas. SAM = S-adenosüülmetioniin. SAH = S-adenosüülhomotsüsteiin. TF = transkriptsioonifaktor. MBP = metüül-CpG seonduv ensüüm. (Zhong et al., 2016), kohandatud autori poolt.

DNA metüleerimisega reguleeritakse mitmeid bioloogilisi funktsioone nagu X kromosoomi vaigistamist, genoomset imprintingut, koespetsiifilist geeniekspressiooni, (Bird, 2002; Cotton et al., 2015; Moore, et al., 2013; Li & Li, 2019). Lisaks DNA metülatiooni tähtsusele embrüogeneesi ajal, on somaatilistes rakkudes metüleerimine seotud geeniekspressiooniga, kus metüleeritud tsütosiinid takistavad transkriptsioonifaktoritel DNA-ga seonduda. DNA metülatsoon määrab ajus selliste geenide aktiivsust või inaktiivsust, mille kaudu reguleeritakse õppimise ja mälu funktsioone (O'Donnell & Meaney, 2020). Seega DNA metülatsoon tagab organismi normaalse arengu, rakkude funktsionaalsuse ning vahendab geeniekspressiooni muutusi vastusena keskkonnamõjudele.

Kõrvalekalded metülatsoonimustrites võivad olla põhjuseks mitmete arenguhäirete ja kasvajate tekkel (Robertson, 2005). Epigenoomi ja metülatsoonimustrite hindamiseks on DNA keemiline töötlemine bisulfitiga üks sensitiivsemad ja kõrgeima resolutsiooniga olemasolevatest meetoditest (Frommer et al., 1992). Bisulfit reageerib modifitseerimata tsütosiiniga, kuid jätab metüleeritud tsütosiinid ehk 5-metüültsütosiinid (*5-methyl-cytosine*, 5-mC) puutumatuks, andes hea ülevaate metülatsoonimustritest. Teine võimalus globaalse

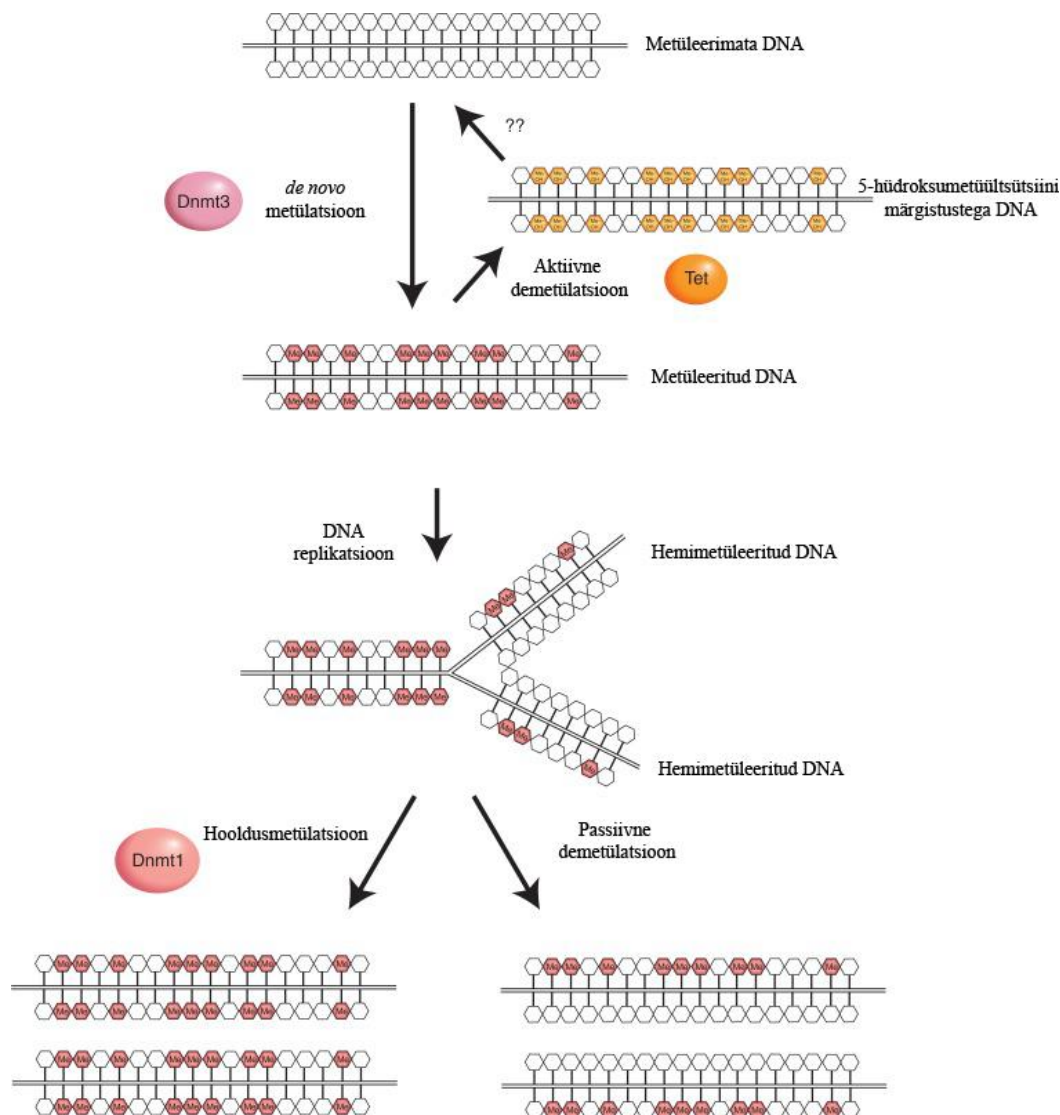
metülatsioonitaseme hindamiseks on immunoensüümmeetodiga ehk ELISA-ga, mis põhineb 5-mC antikeha spetsiifilisusel (Mizugaki et al. 1996).

1.2.1. DNA metüültransferaasid

DNMT perekonna ensüümid jagunevad kolme suuremasse gruppi: DNMT1, DNMT2 ja DNMT3. DNMT1 viib läbi hooldusmetülatsiooni, vastutades vanemahela metülatsioonimustrite säilitamise eest replikatsiooni käigus (Joonis 2). DNMT1 omab afiinsust hemimetüleeritud kaheaheelalise DNA suhtes ning kopeerib originaalahelal olevaid metülatsioonimärgistusi uuele sünteesitud DNA ahelale (Morris & Monteggia, 2014). DNMT1 ensüümiaktiivsust on märgata kõige rohkem proliferueeruvates rakkudes, mil toimub DNA metülatsioonimustrite mitootiline pärandumine, selleks on näiteks inaktiveeritud X-kromosoomi metülatsioonimustrite säilitamine raku jagunemisel (Edwards et al., 2017). DNMT1 inaktivatsioon hiirtes viis ülegenoomse CpG metülatsioonimärgistuse kadumiseni ning oli embrüotele letaalne (Li et al., 1992). DNMT1 on vajalik organismi normaalseks arenguks. DNMT2, erinevalt oma teistest perekonnaliikmetest, metüleerib tRNA-d (Goll et al., 2006).

DNMT3 jaguneb omakorda kaheks: DNMT3A ja DNMT3B, mida nimetatakse *de novo* metüültransferaasideks. Need ensüümid viivad läbi *de novo* (lad. k. „uuest“) metülatsiooni, mis tähendab uute metüülmustrite loomist metüleerimata DNA-l (Koob & Volkow, 2016) (Joonis 2). Kui uued metülatsioonimustrid on loodud, siis vastutab DNMT1 nende märgistuse säilitamise eest raku jagunemisel. DNMT3A ja DNMT3B ensüümiaktiivsus on kõrgeim embrüonaalsetes tüvirakkudes (Chen et al., 2003). Hiirtel oli *DNMT3A* ja *DNMT3B* mõlema geeni eemaldamisel *de novo* metülatsioon oluliselt häiritud ja embrüo ebanormaalne areng tõi kaasa defekte, mis olid letaalsed varajases arengustaadiumis. Samuti oli *DNMT3B* geeni deletsioon hiirte embrüotele letaalne. DNMT3A *knockout* hiired olid sigimisvõimetud ning elujõulised kuni neli nädalat peale sündi (Okano et al., 1999). Sünnijärgselt jääb DNMT3A ja DNMT3B ensüümiaktiivsus somaatilistes rakkudes madalamaks. Seega on DNMT3B vajalik varajases arengustaadiumis ja DNMT3A rakkude normaalseks diferentseerumiseks (Moore et al., 2013). DNMT3L kuulub samuti siia perekonda, olles DNMT3A ja DNMT3B homoloog, kuid sellel puudub metüültransferaasidele omane katalüütiline aktiivsus (Aapola et al., 2000). DNMT3L seondub DNMT3A ja DNMT3B ensüümidega ning stimuleerib nende aktiivsust DNA metüleerimisel (Suetake et al., 2004; Chen et al., 2005). *DNMT3L* geeni *knockout* hiired

on sigimisvõimetud (Veland et al., 2019) ning ensüüm on peamiselt vajalik ürgsete sugurakkude normaalsel arenemisel ning geenivermimisel (Bourc'his et al., 2001).



Joonis 2. DNA *de novo* ja hooldusmetülatsioon. Värvilised vertikaalsed postid tähistavad CpG järjestustes kas 5-mC või 5-hüdroksümetüültsütosiine (5-hmC). DNMT3A ja DNMT3B katalüüsivad *de novo* metülatsiooni metüleerimata DNA-l. DNA replikatsioonil luuakse hemimetüleeritud DNA, millest vanemahel on metüleeritud. Hooldusmetülatsiooni viib läbi DNMT1, mis taastab DNA-l metülatsioonimärgistuste sümmeetrilisuse. DNA demetülatsioon toimub kas aktiivsel viisil ensümaatilisel või väheneb 5-mC sisaldus genoomis replikatsiooni käigus. (Li & Zhang, 2014), kohandatud autori poolt.

1.2.2. DNA demetülatsioon

DNA demetüleerimise mehhanismid olid pikalt ebaselged. Hiljutised teadustööd viitavad, et *ten-eleven translocation* (TET) ensüümid, mille vahendusel toimub 5-mC konversioon 5-hüdroksümetüültsütosiiniks (*5-hydroxymethyl-cytosine*, 5-hmC), osalevad DNA demetülatsiooni protsessis (Tahiliani et al., 2009; Ono et al., 2002; Lorschbach et al., 2003; Wu

& Zhang, 2017). Metüülmärgistusi eemaldatakse kas passiivsel või aktiivsel teel (Joonis 2). Passiivsel viisil toimub 5-mC sisalduse vähenemine rakus mitoosi teel. DNMT1 puudumisel rakus jääb teostamata hooldusmetülatsioon ja 5-mC sisaldus genoomis väheneb replikatsiooni käigus (Joonis 2).

Aktiivne demetüleerimine viiakse läbi ensümaatilisel teel, mille tulemusena liidetakse 5-mC-le hüdroksüülrühm. 5-hmC võib olla nii demetülatsiooni vaheprodukt kui ka täiesti eraldiseisev epigeneetiline märgistus. 5-hmC sisaldus varieerub erinevates somaatilistes rakkudes, kuid on kõrgeim ajus (Kriaucionis & Heintz, 2009). Osad MBP-d tunnevad lisaks 5-mC märgistustele efektiivselt ka 5-hmC positsioone. Näiteks närvirakkudes MeCP2 seondumine 5-hmC-ga suurendab sealset geeniekspressiooni (Mellen et al., 2012).

Sarnaselt DNA metülatsioonile on DNA demetüleerimine oluline embrüogeneesi ajal. Imetajatel esineb esmase arengu vältel kaks suuremat demetülatsiooni lainet. Esimese lainega kaasneb globaalne metüülmärgistuste eemaldamine kohe peale viljastumist sügoodis ning vaibub lõigustumise ajal (Chen et al., 2003). Peale esimest lainet toimub remetüleerimine, millest võtavad osa kõik kolm DNMT-d (Chen et al., 2003). Teine demetüleerimise laine toimub embrüo ürgsetes idurakkudes enne nende liikumist gonaadi (Hajkova, 2010). Demetülatsioon on hädavajalik esmaseks arenguks, kuid aktiivne demetüleerimine toimub edasi ka sünnijärgsel. Kuigi täpne arusaam pole veel päris selge, seostatakse DNA demetüleerimist ajus näiteks mälu kujunemise funktsioonidega (Kaas et al., 2013).

1.2.3. TET metüültsütosiini dioksügenaasid

TET metüültsütosiini dioksügenaasid (*tet methylcytosine dioxygenase*, TET), milleks on TET1, TET2, TET3, omavad 5-mC suhtes katalüüsivat aktiivust. Ensüümid tunnevad ära DNA-s modifitseeritud 5-mC positsioone ja oksüdeerivad 5-mC 5-hmC-ks (Tahiliani et al., 2009). TET-id on võimelised katalüüsima 5-hmC edasi 5-formüültsütosiiniks (5-fC) ja 5-karboksüültsütosiiniks (5-caC) (Ito et al., 2011). Aktiivsel viisil lõplikuks demetüleerimiseks toimub tüümiin DNA glükosülaasi vahendusel 5-fC ja 5-caC välja lõikamine ning seejärel reparatsioonimehhanismiga (nukleotiidide väljalõikereparatsioon) asendamine modifitseerimata tsütosiiniga (Maiti & Drohat, 2011; Weber et al., 2016). Tänapäeval on uuringute põhitähelepanu seisnud 5-hmC-l kui funktsionaalsel epigeneetilisel märgistusel, seevastu demetülatsiooni teiste vaheproduktide (5-fC, 5-caC) kohta on oluliselt vähem infot.

TET-id on kõrgelt konserveerunud ensüümid (Hasin et al., 2013). Näiteks on TET1 evolutsionaalselt konserveerunud mitmetes imetajades, sh inimene ja hiir (Akahori et al., 2015). TET1 ja TET2 ensüümiaktiivsus on kõrgeim embrüonaalsetes tüvirakkudes, kus TET1 eelistatud aktiivsus seisneb promootorites ja transkriptsiooni algussaitides ning TET2 aktiivsus geenikehades (Huang et al., 2014).

Somaatilistes rakkudes on näha selgelt TET1 aktiivsust. Seda näitab kõrge 5-hmC sisaldus ajus. Võib pakkuda, et ajus toimub mõne keskkonnast saadud stiimuliga kokkupuutel vastusena DNA demetüleerimine. Epigenoomne uuring on näidanud, et üle ekspresseeritud TET1 suurendab 5-mC konversiooni 5-hmC-ks, millele järgneb aktiivne DNA demetülatsiooni ning mille tulemusena tõuseb metüleeritamata tsütosiinide sisaldus üle genoomi (Kaas et al., 2013). See viib omakorda ajus teatud geenide düsregulatsioonini. Kuna TET1 aktiivsus on ajus üsna kõrge, siis on leitud, et TET1 funktsioon seisneb mälu kujunemisega seotud geenide reguleerimises (Kaas et al., 2013).

TET2 seostatakse erinevate leukeemia vormidega, kuna somaatilised mutatsioonid TET2 geenis vähendavad selle katalüütilist aktiivust (Delhommeau et al., 2009; Ko et al., 2010). TET3 ensüümiaktiivsus on kõige rohkem märgata peale viljastumist sügoodis (Gu et al., 2011).

1.3. Ravimisõltuvus

Ravimisõltuvus (*substance use disorder*) kujutab endast ajuhaigust, mille korral psühhoaktiivsete ainete korduv kasutamine häirib fundamentaalseid neurobioloogilisi protsesse, mis väljenduvad negatiivselt indiviidi käitumisele, tervisele ja psüühikale (Leshner, 1997; Volkow et al., 2016; Hasin et al., 2013). Sõltuvushäirete tõttu langeb inimese töövõimekus, sotsiaalsus ning ressursid suunatakse sõltuvust tekitava aine kättesaamiseks. Lisaks on näha, et kroonilised tarvitajad kuritarvitavad erinevaid sõltuvust tekitavaid aineid (näit. etanool, nikotiin) kombineerituna, et saavutada intensiivsem eufooria (Goldstein et al., 2009). Ravimisõltuvus on probleemiks nii ühiskonnale kui ka sõltlasele endale ja tema tervisele.

Psühhostimulaatoritel, nagu kokaiin ja amfetamiin, on suur risk tekitada sõltuvust, kuid kõikidel regulaarsetel tarbijatel ei kujune välja sõltuvust. Antud juhul saab eristada aine kasutust aine kuritarvitamisest (*substance use vs abuse*) (McCreary et al., 2015). Ravimisõltuvuse kujunemine on järkjärguline protsess, kus korduvast impulsiivsest/akuutsest

tarvitamisest toimub üleminek krooniliseks ja kontrollimatuks kuritarvitamiseks (McCreary et al., 2015). Sellega kaasneb inimesel kontrolli kaotamine oma vabatahtlike käitumisavalduste üle ning kujuneb kompulsiivne käitumishäire, mis nõuab tegevuse pidevat kordamist hoolimata selle negatiivsetest tagajärgedest (Hyman et al., 2006; Volkow et al., 2016). Sõltuvust tekitavatest ainetest võõrandumisel on iseloomulik suur oht tagasilanguseks (ingl. k. *relapse*) ka pikka aega peale võõrutust (Koob & Volkow, 2010). See on tingitud kauakestvatest muutustest aju struktuuris molekulaarsel ja rakulisel tasandil (Koob & Volkow, 2016). Ravimsõltuvust iseloomustab aja jooksul tolerantsi teke psühhostimulaatori suhtes. Aju kohaneb korduval kokkupuutel stimulandiga, mis tähendab, et sama kontsentratsiooniga annus järgmisel korral ei pruugi enam tekitada varasemalt kogetud eufooriat ning tarvitaja suurendab doose (O'Brien, 2017).

Efektiivsete terapeutiliste strateegiate ja ravivõimaluste leidmine on oluline, et leevendada ravimsõltuvusest tingitud käitumishäireid ning mis aitaksid võõrutada efektiivselt sõltuvusest ning minimaliseerida ohtu tagasilanguseks (Mews et al., 2018). Seni pole leitud ühtset kindlat efektiivset meetodit ravimsõltuvuse diagnoosiks ja raviks. Kuna tegemist on neuropsühhiaatrilise häirega, mida ei saa efektiivselt testida aju skaneerimisega või vereprooviga, siis tavaliselt sõltuvuse diagnoosimisel lähtutakse psühhostimulaatorist tingitud käitumuslike ebanormaalsete põhjal (nt. töövõimekuse halvenemine, sotsiaalne allakäik, võõrutusnähud). Seni on ravivõimaluste leidmisel pööratud tähelepanu pigem psühhostimulaatorite akuutsele toimele. Loomudelitel peal on katsetatud katalüütilisi antikehasid kokaiini kiiremaks metaboliseerimiseks (Schindler & Goldberg, 2012) ja vaktsiini kokaiini neutraliseerimiseks vereringes, et see ei jõuaks ajuni (Kosten et al., 2014), kuid need vajavad põhjalikumat uurimist (Nestler, 2005). Hetkeseisuga on vaja paremini mõista sõltuvuse tekkemehhanisme ja selle püsivust.

1.3.1. Mesolimbiline dopamiini rada

Kõikide psühhostimulaatorite ühiseks tunnusjooneks on dopamiini neurotransmissiooni suurendamine mesokortikolimbilises dopamiini süsteemis (McCreary et al., 2015). Mesokortikolimbiline juhtetee reguleerib motivatsiooni ja tasu saamise, emotsioonide ning mälu kujunemise funktsioone (Volkow et al., 2010; Chiara et al., 1999). Dopamiin (*dopamine*, DA) on virgatsaine ehk neurotransmitter, mis liigub närvilõpmetes olevate dopamiini transporterite (*dopamine transporter*, DAT) juhtimisel dopaminergiliste sünapstena neuronite

vahel. DA vabastamine ajus stiimuliga kokkupuutel tekitab heaolutunnet ja eufooriat ning motiveerib seeläbi tegevuse kordamisele (näit. söömine) (Koob & Volkow, 2010).

Mesolimbiline DA rada (ehk tasusaamise rada) saab alguse keskajus asuvast ventraalsest tegmentaalsest alast (*ventral tegmental area*, VTA), kus sünteesitakse ja edastatakse DA juttkeha ventraalsesse osasse ehk naalduvasse tuuma (*nucleus accumbens*, NAc) (Koob & Volkow, 2016). Lisaks ravimsõltuvusele seostatakse mesolimbilise DA raja düsfunktsiooni ka skisofreenia, psühhoosi ja õppepuudujääkidega (Sibley et al., 2017). Mesokortikaalses rajas edastatakse dopamiin VTA-st eesajukoode, mis samuti omab rolli ravimsõltuvuse tekkemehhanismides (Walker & Nestler, 2018).

1.3.2. Kokaiin

Üheks levinumaks psühhostimulaatoriks on kokaiin ($C_{17}H_{21}NO_4$), mis on looduslik alkaloid, mida saadakse kokapõõsa (lad. k *Erythroxylum coca*) lehtede töötlemisel. Kokapõõsa lehtede närimine ei tekita rasket mürgistust, kuna selle toimeaeg on oluliselt aeglasem ning vereringesse jõuab väike kogus (Karch, 1999). Kokaiin isoleeriti lehtedest esimest korda 1855. aastal Friedrich Gaedcke poolt, kes nimetas selle erütroksüliiniks. Albert Niemann täiustas ja lihtsustas isoleerimisprotsessi puhtama produkti saamiseks ning tuletas alkaloidile nimetuse „kokaiin“ (Goldstein et al., 2009).

Kokaiin on meditsiinis leidnud kasutusvõimalust lokaalse tuimestina. Tegemist on ester-tüüpi lokaalanesteetikumiga, mis blokeerib närvirakkude membraanis naatriumkanaleid inhibeerides depolarisatsiooni ja närvimpulssi (Goldstein et al., 2009). Tänapäeval on kokaiini kasutus meditsiinis suhteliselt minimaalne selle toksiliste omaduste tõttu ning kasutusele on võetud mitmed alternatiivsed sünteetilised lokaalanesteetikumid nagu prokaiin, lidokaiin, bupivakaiin ja tetrakaiin (Ruetsch et al., 2001; Catterall & Mackie, 2015).

Kokaiini tarvitamisel avalduvad füsioloogilised ja psühholoogilised muutused sõltuvalt doosist. Kokaiin põhjustab veresoonte ahenemist, vererõhu tõusu, pupillide laienemist (O'Brien, 2017). Väiksem akuutne doos ergutab, tõstab meeleolu, vähendab näljatunnet ja söögiisu. Suuremad doosid tekitavad tugevamat eufooriat, mis on lühiajaline nähtus ning millele järgnevad negatiivsed kõrvalnähud nagu keskendumisraskused, hallutsinatsioonid, värisemine ja krambid. Äge intoksikatsioon ja korduv tarvitamine võib tekitada agressiivsust, insomniat, paranoiad, psühhoosi, depressiooni (McCreary et al., 2015; O'Brien, 2017). Kokaiinist põhjustatud tervisriskid on südame rütmihäired, müokardi isheemia, müokardiit,

aordi dissektsiooni, aju vasokonstruktsioon ja krambid (O'Brien, 2017). Kokaiinist tingitud kardiovaskulaarsed riskid on seotud naatriumkanalite blokeerimisega (Kim & Park, 2019).

Kokaiini farmakokineetika on üsna individuaalne. Kokaiin imendub kiiresti läbi limaskestast esmalt vereringesse ning jõuab seejärel suurema osa organiteni, sealhulgas kõrgeima kontsentratsiooniga on aju, süda, neerud, maks ja kopsud (Favrod-Coune & Broers, 2010). Plasmas ja maksas metaboliseeritakse kokaiin suhteliselt kiiresti. Kokaiini keskmine poolväärtusaeg inimese vereplasmas on umbes 50 minutit, kuid võib varieeruda poole tunni kuni kahe tunni vahel (O'Brien, 2017). Peamised metaboliidid organismis on bensoöülelekoogiin ja ekgoniini metüülester, mis on uriinis detekteeritavad keskel läbi 72 tundi (Kim & Park, 2019). Olemasolevad laboratoorsed testid kokaiini metaboliitide tuvastamiseks on mõeldud kokaiini akuutse tarvitamise kinnitamiseks, kuid mitte kroonilise kasutamise tuvastamiseks (Goldstein et al., 2009).

Sarnaselt teiste psühhostimulaatorite farmakodünaamikale, stimuleerib ka kokaiin kesknärvisüsteemi. Kokaiini kõrge afiinsus seonduda dopamiini transporteritega (DAT) blokeerib selle kaudu monoamiinide (peamiselt DA, vähemal määral ka serotoniini ja noradrenaliini) tagasiomastamist närvirakku (Sibley et al., 2017). Selle tagajärjel tõuseb ajuliselt DA ekstratsellulaarne tase aju, mis tekitab heaolu ja eufooria tunnet (Ritz et al., 1987). DAT on kõige rohkem ekspresseeritud mesokortikaalses ja meolimbilises DA radades, mis on suuresti sõltuvustega seotud regioonid. DAT aktiivust on lisaks eelnevale täheldatud ka pankreases ja lümfotsüütides (Sibley et al., 2017; Mackie et al., 2018). Kuna kokaiin puutub enne aju jõudmist kokku vereringega, siis võib olla kokaiini potentsiaalselt sihtmärgiks ka perifeerse vereringe DAT (Sibley et al., 2017).

1.4. Psühhostimulaatorite mõju epigeneetilistele mehhanismidele

Ravimsõltuvus on kompleksne fenotüüp, mida mõjutavad geneetiline taust ja keskkonnategurid. Psühhostimulaatorite korduv tarvitamine mõjutab aju neuroplastilisust ning indutseerib muutusi rakulisel ja molekulaarsel tasandil. Sõltuvusega seostatakse kõige enam geenide düsregulatsiooni aju mesolimbilises DA süsteemis (Walker & Nestler, 2018). Psühhostimulaatoritest tingitud anormaalsed DNA metüülatsioonimustrid arvatakse olevat ka põhjuseks tagasilanguseks pärast võõrutust (Walker & Nestler, 2018). DNA metüülatsiooni rolli kesknärvisüsteemis seostatakse mälu kujunemisega (Levenson et al., 2006; Kaas et al., 2013) ja tasu saamisega seotud õppimisvõimet (Day et al., 2013). Nende kaudu tekivad psühhostimulaatori korduval tarvitamisel muutused käitumises, mis on omased sõltuvusele.

Sellist fenomeni nimetatakse käitumuslikuks sensitiseerimiseks. Seniks on käitumusliku sensitiseerimise paremaks mõistmiseks kasutatud loomudele, mis modelleerivad inimese sõltuvust (Walker & Nestler, 2018; Mews et al., 2018). On näidatud, et korduv kokaiini manustamine põhjustab hiirtes suurenenud käitumusliku vastuse (Anier et al., 2010; Anier et al., 2018). Kõige rohkem psühhostimulaatorist indutseeritud epigeneetiliste muutuste kohta on uuritud histoonide atsetüülimise ja fosforüülimise rolli kromatiini modifikatsioonis, vähem aga DNA metüülatsiooni rolli (Anier et al., 2010).

Uuringud on näidanud DNMT ja TET ensüümide suurenenud aktiivsus soodustab ravimivastuse kujunemist (Anier et al., 2010; Anier et al., 2018; Urb et al., 2020; Vaher et al., 2020). Varasemates uuringutes on leitud, et kokaiini akuutne ja korduv manustamine mõjutab katseloomades epigeneetiliste DNA modifitseerijate (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1-3*) geeniekspressiooni (Anier et al., 2010, Anier et al., 2018; Feng et al., 2015). Varajases elueas kogetud stress ja trauma võib olla samuti eelsoodumuseks erinevate neuropsühhiaatriliste haiguste, sh sõltuvuse, kujunemisel (Ravi & Kannan, 2013). Varajases elueas emast eraldatud rotipojad reageerivad stressile tugevamalt ning seda mõjutavad DNA metüülatsiooni teostavate ensüümide aktiivsus. Anier et al. uuringus kirjeldati muutusi *DNMT*-de ekspressioonis ning rottide võimendunud liikumisaktiivsuses, mis modelleerib sõltuvuse aspekte inimesel (Anier et al., 2014). Seega stressist tingitud muutused DNA metüülatsioonimustrites ja geenide düsregulatsioonis võivad muuta täiskasvanud organismi vastuvõtlikumaks kokaiini suhtes.

1.5. Epigeneetilised biomarkerid

Potentsiaalsed epigeneetilised biomarkerid võiksid tulevikus abistada mitmete neuropsühhiaatriliste haiguste diagnoosimisel. Epigeneetiliste biomarkerite olulisus on haiguse varajasel diagnoosimisel või sootuks ennetada hinnates indiviidi haiguse tekkeriski (Bakulski et al., 2016). Kuigi epigeneetiliste biomarkerite leidmiseks ja hindamiseks on mitmeid tõhusaid tehnoloogilisi variante arendatud, siis limiteerivaks asjaoluks on siinkohal inimese kesknärvisüsteemi närvikoe kättesaadavus. Mitmed teadustööd on leidnud, et neuropsühhiaatriliste häiretega indiviididel esineb aju- ja vererakkude vahel epigeneetilisi korrelatsioone (Bakulski et al., 2016; Davies et al., 2012; Hahn et al., 2013), kuid need vajavad siiski veel põhjalikumat uurimist. Näiteks on demonstreeritud *in vivo*, et korduv kokaiini manustamine hiirtes suurendab DNA modifitseerijate *DNMT1* ja *DNMT3B* ekspressiooni nii ajus kui ka vererakkudes (Anier et al., 2018).

Kasutusel olevad laboratoorsed testid psühhostimulaatorite ja nende metaboliitide detekteerimiseks veres, uriinis, higis, süljes ja juustes on küll sensitiivsed, kuid seda just akuutse intoksikatsiooni hindamisel ning väga piiratud aja jooksul (Hasin et al., 2013). Hetkeseisuga ei ole kinnitatud ühtegi sobivat epigeneetilist biomarkerit diagnoosimaks ravimsõltuvust või kõrge tekkeriskiga indiviide leidmiseks. Biomarkerite leidmiseks tuleb paremini mõista ravimsõltuvuse tekkemehhanisme.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö üldeesmärgiks oli hinnata kokaiini mõju epigeneetilistele modifitseerijatele inimese PBMC-des. Töö sooritati Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakonnas läbiviidava teadusuuringu osana, mille eesmärk on tuvastada kokaiinist mõjutatud molekulaarseid markereid ning seeläbi paremini mõista ravimsõltuvust ning selle tekkemehhanisme.

Lõputööl olid järgnevad eesmärgid:

- Määrata kokaiini mõju ajaline dünaamika *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ja *TET1*, *TET2*, *TET3* geeniekspressioonile.
- Hinnata kokaiini akuutse töötuse mõju *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2*, *TET3* geeniekspressioonile.
- Hinnata kokaiini korduva töötuse mõju *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2*, *TET3* geeniekspressioonile.

3. MATERJAL JA MEETODID

3.1. Valimi kirjeldus

Uurimiseks kasutati Tartu Ülikooli Kliinikumi Verekeskuse vabatahtlike veredoonorite verd. Käesolevas töös uuriti 18 indiviidi PBMC-des *DNMT* ja *TET* geenide ekspressioonimuutusi. Valimi moodustasid terved 20-35 aastased mehed. Uuringuks saadi luba Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetika Komiteelt (nr. 300/T-22).

3.2. Perifeerse vere mononukleaarsed rakud

3.2.1. PBMC-de eraldamine

PBMC-de (monotsüüdid, T-rakud, B-rakud, NK-rakud) eraldamiseks kasutati Ficoll-Paque tihedusgradiendi tsentrifuugimist ning vastavat protokollit. 50 ml katsetuubi pipeteeriti Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, USA) lahust. Seejärel segati teises 50ml tuubis võrdses mahus verd fosfaatpuhverdatud soolalahusega (*phosphate-buffered saline*, PBS) (1x Dulbecco's PBS ilma Mg, Ca). Järgnevalt pipeteeriti ettevaatlikult Ficoll-Paque lahuse pinnale vere ja PBS-i segu. Proove tsentrifuugiti pidurduseta 30 min 400 g 20 °C juures. Ülemine kiht (plasma) eemaldati ettevaatlikult ja sellest allpool olev PBMC-de fraktsioon pipeteeriti uude tuubi. Seejärel rakke pesti PBS-ga ja tsentrifuugiti (edaspidi piduriga) 10 min 200 g 20 °C. Rakke pesti uuesti PBS-iga ja tsentrifuugiti 10 min 300 g 20 °C. Supernatant võimalike allesjäänud trombotsüütidega eemaldati ja rakud resuspendeeriti RPMI 1640 (Life Technologies, USA) 10% veiselooote seerumit (*fetal bovine serum*, FBS) (Life Technologies) sisaldavas söötmes. Rakkudele lisati trüpaansinist ja loendati Bürkeri loenduskaambris värvimata ehk elus rakke. Rakud külmutati (~20 x 10⁶ rakku /ml) krüoviaalides. Külmutussegu sisaldas 10% dimetüülsulfoksiidi ja seejärel säilitati ultrasügavkülmikus -150 °C juures.

3.2.2. PBMC-de töötlus kokaiiniga

Rakud sulatati 37 °C juures, külmutuslahus eemaldati ning resuspendeeriti antibiootikumideta RPMI 10% FBS söötmes. Rakud külvati päev enne töötlust 24-kaevuga plaadile kontsentratsiooniga ~3 miljonit rakku kaevu kohta (rakususpensiooni 0,5 ml/kaev) ning hoiti 37 °C juures inkubaatoris, milles CO₂ sisaldus oli 5%. Töötluse kokaiinilahuse saamiseks lahustati kokaiin hüdrokloriid (Sigma-Aldrich, USA) RPMI 10% FBS söötmes. Ühe kaevu rakususpensioonile lisati 4,4 µl kokaiinilahust (3 mg/L).

Katse teostati kahes osas: akuutne ja krooniline kokaiiniga töötlus (Tabel 1). Akuutsed töötled kestsid 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 24 tundi, millele järgnes rakkude lüüsimine. Lüüsimiseks oli valmistatud puhver, mis sisaldas RLT puhvrit RNeasy Mini Kitist (Qiagen, Saksamaa) ja merkaptoetanooli (*β-mercaptoethanol*, β-ME) lõppkontsentratsiooniga 1% (Sigma-Aldrich).

Rakkude krooniline kokaiiniga töötled kestsid üks tund päevas intervalliga 24 tundi nelja päeva jooksul (Tabel 1). See tähendab, et neli päeva iga 24 tunni järel lisati rakkudele 4,4 μl kokaiinilahust (3 mg/L). Korduva kokaiini proovidele teostati rakkudele peale tunnist töötlust kokaiiniga söötmevahetus järgmiselt: rakususpensioon koguti tuubidesse, fuugiti põhja 5 min 1000 g 20 °C juures, eemaldati supernatant (kokaiiniga) ning resuspendeeriti soojas RPMI 10% FBS söötmes. 24 tundi peale neljandat töötlust ehk viiendal päeval lüüsi rakud RLT 10% β-ME puhvris (ühele proovile 350 μl). Kontrollproovidel vahetati söödet ja kokaiinilahust ei lisatud. Lüsate säilitati vajadusel -80 °C külmikus kuni analüüsimiseni.

Tabel 1. PMBC-de akuutse ja kroonilise töötuse proovid ja katseplaan.

Akuutne töötlus	Korduv töötlus
kontrollproov	kontrollproov
0,5 h	1h päevas neli korda 24h intervallidega
1 h	
1,5 h	
2 h	
4 h	
24 h	

3.3. Geeniekspressiooni analüüs

3.3.1. RNA eraldamine

RNA eraldamiseks kasutati RNeasy Mini Kiti (Qiagen, Saksamaa) ja vastavat tootjafirma poolt koostatud protokoll. Lüsadile lisati üks maht (350 μl) 70% etanooli ja lahus pipeteeriti Mini Kiti eraldamiskoloni, mida tseentrifuugiti maksimum kiirusel (21 130 x g) 30 sekundit (Centrifuge 5424/5424R, Eppendorf, Saksamaa). Koloni membraanile seondunud RNA-d pesti 600 μl RW1 puhvriga ja tseentrifuugiti maksimum kiirusel 30 sekundit, läbijooks eemaldati. Järgnes 15-minutiline DNAasi töötlus toatemperatuuril: ühe proovi koloni membraanile lisati 80 μl DNAasi segu, mis sisaldas 10 μl DNase I (RNeasy Mini Kit, Qiagen) ja 70 μl RDD puhvrit (RNase-Free DNase Set, Qiagen). Kolonile lisati 600 μl RW1 pesupuhvrit, tseentrifuugiti maksimum kiirusel 30 sekundit, läbijooks eemaldati. Seejärel

teostati kaks korda pesu 500 µl RPE puhvriga, tsentrifuugiti maksimum kiirusel esimesel korral 15 sekundit, teisel korral 1 minut ning läbijooks eemaldati mõlema pesu juures. Uute kogumistuubidega proove tsentrifuugiti veel kord maksimum kiirusel 1 minut, seejärel vahetati kogumistuubid uute tuubide vastu välja. RNA elueeriti 30 µl RNAasi vaba veega, inkubeeriti 1 minut toatemperatuuril ning tsentrifuugiti 8000 g 1 minut. RNA kontsentratsioon määrati NanoDrop spektrofotomeetriga ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), kus mõõtmisel kalibreeriti spektrofotomeetri taust 1 µl RNAasi vaba vee vastu ning mõõtmiseks kasutati 1 µl proovi. Eraldatud RNA proove säilitati -80 °C juures.

3.3.2. cDNA süntees

Komplementaarse DNA (*complementary DNA*, cDNA) sünteesil kasutati RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti K1622 (Thermo Fisher Scientific, USA) ja vastava tootjafirma poolt koostatud protokoll. cDNA sünteesiks kasutati 375 ng RNA-d, millele lisati 1 µl oligo(dT)₁₈ praimerit ning RNAasi vaba vett kuni ühe proovi kogumaht oli 12 µl. Proove segati vortexil ja inkubeeriti termotsükleris (Thermomixer comfort, Eppendorf) 5 minutit 65 °C juures. Peale kuumutamist asetati proovid jääle.

Järgmisena lisati igale proovile teine reaktsioonisegu (Tabel 2), mille tulemusena oli ühe proovi lõppmaht 20 µl. Proove inkubeeriti 60 minutit 42 °C juures. Süntees inaktiveeriti kuumutamisega 70 °C juures 5 minutit termotsükleris. Proove säilitati -80 °C juures.

Tabel 2. cDNA teise reaktsioonisegu koostis.

Reagendid	Kontsentratsioon	Kogus
5x reaktsioonipuhvrit	-	4 µl
RiboLock RNase inhibitor	20 U/µl	1 µl
dNTP mix	10 mM	2 µl
RevertAid M-MulVRT	200 U/µl	1 µl
<i>Maht kokku:</i>	-	8 µl

3.3.3. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Geeniekspressioonitaseme mõõtmiseks kasutati kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) ja eelnevalt disainitud praimerid (Tabel 3). Katsete sooritamiseks oli kasutusel masin QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR Systemi

(Applied Biosystems, USA) ja tootjapoolne tarkvara QuantStudio 12K Flex Software v.1.2.2. qPCR reaktsiooniks kasutati SYBR Green RT-PCR Master Mixi reagenti (Applied Biosystems), mis annab reaalsajas fluorestsentsi seondudes kaheaheelalise DNAGA. Katse läbiviimiseks kasutati 384-kaevuga plaate (MicroAmp, Applied Biosystems), kus ühe kaevu kohta lisati lõppmahus 10 µl qPCR reaktsioonisegu (Tabel 4). Kõik reaktsioonid viidi läbi kolmes paralleelis. Käesolevas töös kasutatud inimese praimerite järjestused on esitatud allolevas tabelis (Tabel 3):

Tabel 3. Geeni ekspressiooni uurimiseks kasutatud qPCR praimerite järjestused.

Geen	Forward praimer	Reverse praimer
<i>DNMT1</i>	5'GTTCTTCCTCCTGGAGAATGTT3'	5'GTCTGGGCCACGCCGACTG3'
<i>DNMT3A</i>	5'TATTGATGAGCGCACAAAGAGAGC3'	5'GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG3'
<i>DNMT3B</i>	5'GGCAAGTTCTCCGAGGTCTCTG3'	5'TGGTACATGGCTTTTCGATAGGA3'
<i>TET1</i>	5'AATGGAAGCACTGTGGTTTG3'	5'ACATGGAGCTGCTCATCTTG3'
<i>TET2</i>	5'GTGAGATCACTCACCCATCG3'	5'CAGCATCATCAGCATCACAG3'
<i>TET3</i>	5'GAGGAGCGGTATGGAGAGAA3'	5'AGTAGCTTCTCCTCCAGCGT3'
<i>GAPDH</i>	5'TCAACGGATTTGGTCGTATTGGGC3'	5'TCCTGGAAGATGGTGATGGGATTT3'

Kõigepealt pipeteeriti plaadile qPCR reaktsioonisegu ilma cDNA-ta 9 µl või 6 µl kaupa, (vastavalt uuritavale praimerile), viimasena lisati kaevudesse cDNA (Tabel 4). PCR-i programmietapid olid järgmised: polümeraasi aktivatsioon 95 °C juures 10 minutit 1 tsüklil; denaturatsioon 95 °C juures 15 sekundit 40 tsüklit; praimerite seondumine ja ekstensioon 60 °C juures 1 minut 40 tsüklit; dissotsiatsioonikõver 95 °C sekundit, 60 °C 15 sekundit, 95 °C 15 sekundit.

Tabel 4. qPCR reaktsioonisegu koostis vastavalt uuritavale praimeripaarile.

Reagentid	<i>DNMT1, DNMT3A, TET2, TET3</i>	<i>DNMT3B, TET1</i>
Maxima SybrGreen1-Rox Master Mix (2x)	5 µl	5 µl
Forward praimer (Tabel 3)	0,5 µl	0,5 µl
Reverse praimer (Tabel 3)	0,5 µl	0,5 µl
cDNA	1 µl	4 µl
Vesi	3 µl	-
<i>Maht kokku:</i>	<i>10 µl</i>	<i>10 µl</i>

3.4. Andmete statistiline analüüs

qPCR masina programmist saadud C_T väärtustega analüüsiti $2^{-\Delta\Delta CT}$ meetodil (Livak and Schmittgen, 2001). *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ja *TET1-3* geenide ekspressioonitasemete andmeanalüüsiks kasutati ühefaktorilist variatsiooni analüüsi (*one-way ANOVA*) ning *post hoc* analüüs tehti kasutades Bonferroni järeltesti. Statistiliste analüüside läbiviimiseks ja graafikute koostamiseks kasutati GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, USA) tarkvara. Katsete tulemused on esitatud aritmeetilise keskväärtusena \pm keskväärtuste standardviga (*Standard Error of the Mean*, SEM) kujul. Statistiliselt oluliseks loeti tulemusi, mille korral $p < 0,05$.

4. TULEMUSED

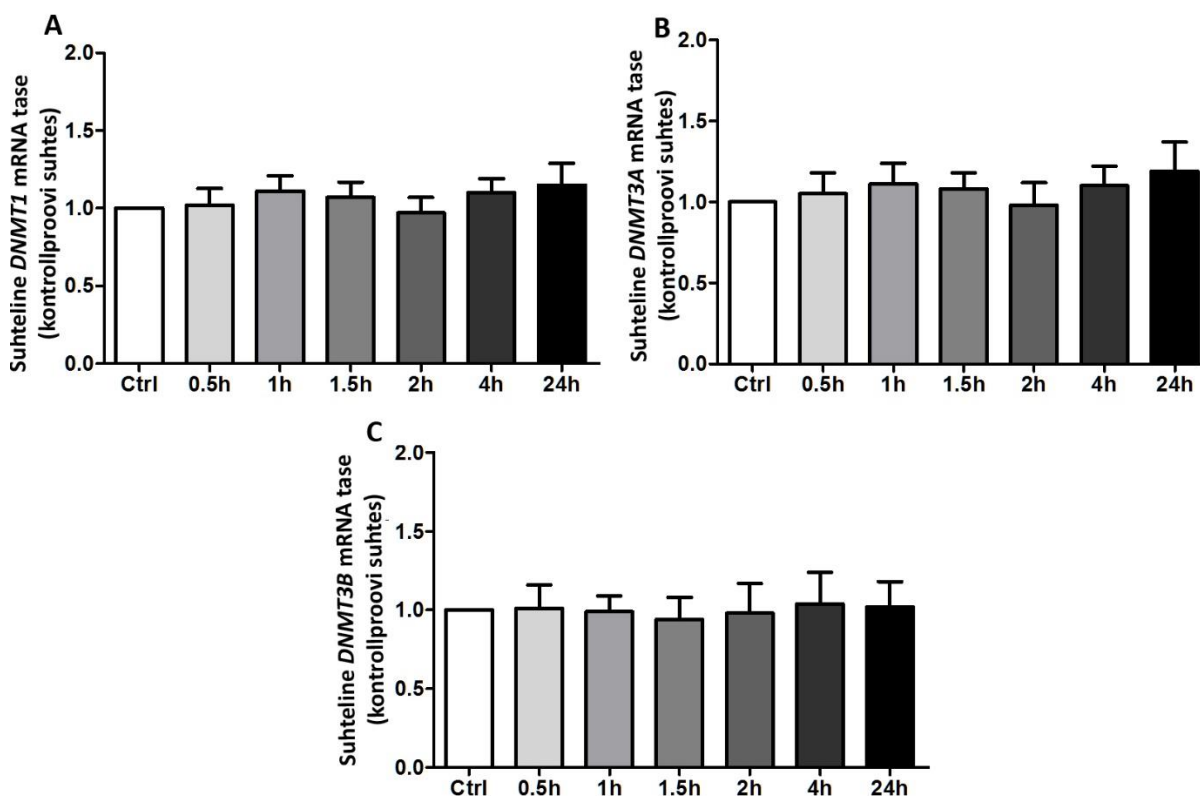
Antud töös uuriti kokaiini mõju epigeneetiliste DNA modifitseerijate geeniekspressiooni muutust inimese PBMC-des. Kokku kasutati 18 doonori verest eraldatud PBMC-sid. Kokaiini ajalise dünaamika hindamiseks jaotati igalt doonorilt eraldatud PBMC-d kahte gruppi: akuutne ja krooniline kokaiini töötlus (3 mg/L). Akuutse ja kroonilise töötluse ajapunktid ja kontsentratsioon määrati eksperimentaalselt lähtudes kokaiini poolväärtusajast inimese veres (~1 h) (O'Brien, 2017). Ühekordsed ehk akuutsete töötluste ajapunktid olid: 0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 4 h; 24 h. Uuritavate geenide ekspresioonitaset võrreldi kontrollproovidega, mida kokaiiniga ei töödeldud. qPCRi kasutati järgnevate kuue geeni mRNA tasemete analüüsimiseks: *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1-3*.

Töö esimeses pooles vaadeldi kokaiini (3 mg/L) mõju *DNMT*-de ekspresioonile inimese PBMC-des (n=18) ning võrreldi kontrollproovi suhtes (Joonised 3 ja 4).

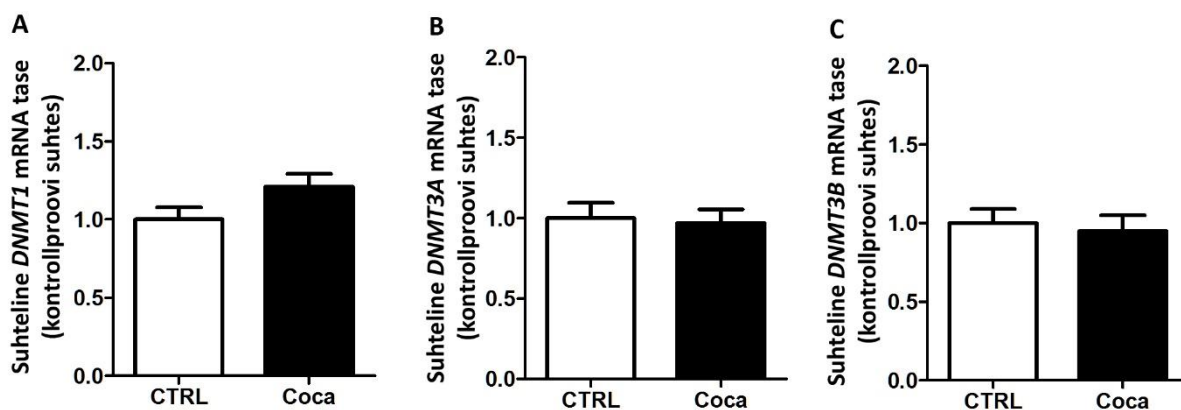
Esimesena hinnati muutusi *DNMT1* geeniekspressioonis. Varasemas töös on näidatud, et akuutse kokaiini manustamisel *DNMT1* ekspressioon hiirte PBMC-des poole tunni kokaiini mõjutuse järel langeb, kuid suureneb hilisemates ajapunktides (Anier et al., 2018). Inimese PBMC-des *DNMT1* mõõdetud mRNA tase oli poole tunni kokaiini töötluse järel 1,02; ühetunnise töötluse järel 1,11; pooleteisetunnise töötluse järel 1,07; kahetunnise töötluse järel 0,97 ja neljatunnise töötluse järel 1,10; 24-tunnise töötluse järel 1,15 (Joonis 3A). Korduva kokaiini mõjutusel oli *DNMT1* ekspresioonitase 1,21 (Joonis 4A). *DNMT1* ekspresiooni hindamiseks sooritati ühefaktoriline ANOVA analüüs ning Bonferroni järeldest doonorite ja kontrollidega. *DNMT1* mRNA tasemete muutustes kokaiini mõjul statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Teiseks vaadeldi *DNMT3A* ekspresioonitaset. Hiirte PBMC-des langeb poole tunni akuutse kokaiini mõjutusel *DNMT3A* ekspressioon, kuid tõuseb hilisemates ajapunktides (Anier et al., 2018). Inimese PBMC-des oli *DNMT3A* mõõdetud mRNA tase poole tunni kokaiini töötluse järel 1,05; ühetunnise töötluse järel 1,11; pooleteisetunnise töötluse järel 1,08; kahetunnise töötluse järel 0,98; neljatunnise töötluse järel 1,10 ja 24-tunnise töötluse järel 1,19 (Joonis 3B). Korduva kokaiiniga töötlemise järel mõõdeti *DNMT3A* mRNA tasemeks 0,98 (Joonis 4B). *DNMT3A* ekspresiooni hindamiseks sooritati ühefaktoriline ANOVA analüüs ning Bonferroni järeldest doonorite ja kontrollidega. *DNMT3A* mRNA tasemete muutustes statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Kolmandana mõõdeti *DNMT3B* geeni mRNA tasemed inimese PBMC-des. Varasemas uuringus ei leitud hiirte PBMC-del kokaiini ühekordsest ega kroonilisest manustamisest *DNMT3B* ekspressioonis olulisi muutusi (Anier et al., 2018). Inimese PBMC-des *DNMT3B* mõõdetud mRNA tase oli poole tunnise töötamise järel 1,01; ühetunnise töötamise järel 0,99; pooleteise tunni töötamise järel 0,94; kahetunnise töötamise järel 0,98; neljatunnise töötamise järel 1,04; 24-tunnise töötamise järel 1,02 (Joonis 3C). *DNMT3B* mRNA tase korduva kokaiini töötamise järel oli 0,97 (Joonis 4C). *DNMT3B* ekspressiooni hindamiseks sooritati ühefaktoriline ANOVA analüüs ning Bonferroni järeltest doonorite ja kontrollidega. *DNMT3B* mRNA tasemete muutustes statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.



Joonis 3. Akuutse kokaiini töötamise mõju *DNMT*-de mRNA tasemetele inimese PBMC-des ajapunktidel 0,5h; 1h; 1,5h; 2h; 4h; 24h: A) *DNMT1*, B) *DNMT3A*, C) *DNMT3B*. Ctrl – kontrollproov. Ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest; n=18. Veapostid väljendavad SEMi.



Joonis 4. Kroonilise kokaiini töötuse mõju *DNMT*-de mRNA tasemetele inimese PBMC-des: A) *DNMT1*, B) *DNMT3A*, C) *DNMT3B*. Ctrl – kontrollproov, Coca – kokaiiniga töödeldud proov. Ekspressiooni väärtuste erinevuste statistiliste olulisuse hindamiseks teostati ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest; n=18. Veapostid väljendavad SEMi.

Töö teises pooles hinnati kokaiini (3 mg/L) mõju *TET*-ide ekspressioonile inimese PBMC-des (n=18) ning võrreldi kontrollproovi suhtes (Joonised 5 ja 6). Varasemas töös hiire PBMC rakkudel ei täheldatud kroonilise kokaiini manustamisel olulisi muutusi *TET1-3* ekspressioonis (Anier et al., 2018).

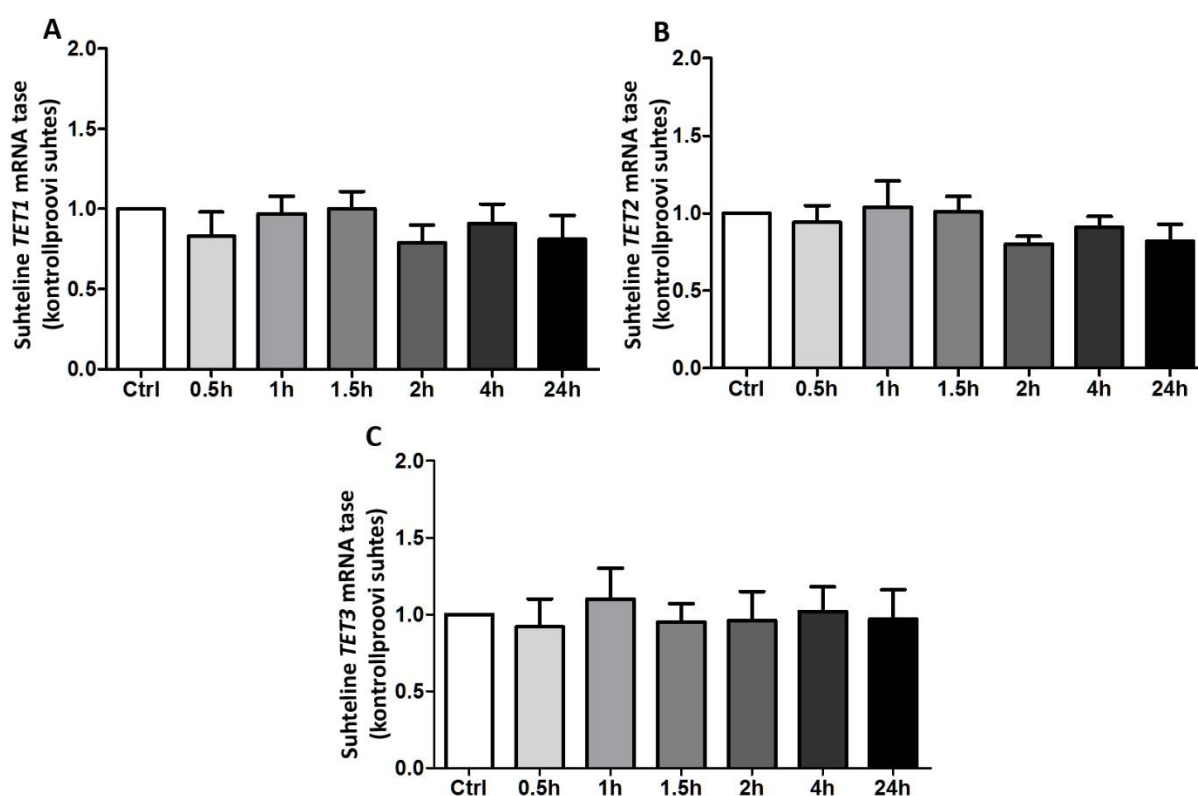
Neljanda geenina võeti hindamisele *TET1* ekspressioonitase inimese PBMC-des. Eelnevalt on teada, et akuutne kokaiini manustamine langetab *TET1* ekspressiooni hiire PBMC-des (Anier et al., 2018). *TET1* mõõdetud mRNA tase inimese PBMC-des poole tunnise töötuse järel oli 0,83; ühetunnise töötuse järel 0,97; pooleteise tunni töötuse järel 1,00; kahetunnise töötuse järel 0,79; neljatunnise töötuse järel 0,91 ja 24-tunnise töötuse järel 0,81 (Joonis 5A). Korduva kokaiini töötuse tulemusena langes *TET1* ekspressioon, mille mRNA tase oli 0,69 (Joonis 6A). *TET1* ekspressiooni hindamiseks sooritati ühefaktoriline ANOVA analüüs ning Bonferroni järeltest doonorite ja kontrollidega. Akuutne kokaiin ei mõjutanud *TET1* ekspressiooni oluliselt. Korduva kokaiini töötuse järel tuvastati *TET1* mRNA taseme muutuses statistiliselt oluline langus (Joonis 6A; ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest; $p < 0,001$; n=18).

Viiendaks, uuriti kokaiinist tingitud muutusi *TET2* ekspressioonis. *TET2* mõõdetud mRNA tasemed olid poole tunnise töötuse järel 0,94; ühetunnise töötuse järel 1,04; pooleteisetunnise töötuse järel 1,01; kahetunnise töötuse järel 0,80; neljattunnise töötuse järel 0,91; 24-tunnise töötuse järel 0,82 (Joonis 5B). Korduva kokaiini töötuse tulemusena *TET2* mõõdeti mRNA tasemeks 0,85 (Joonis 6B). *TET2* ekspressiooni hindamiseks sooritati ühefaktoriline ANOVA

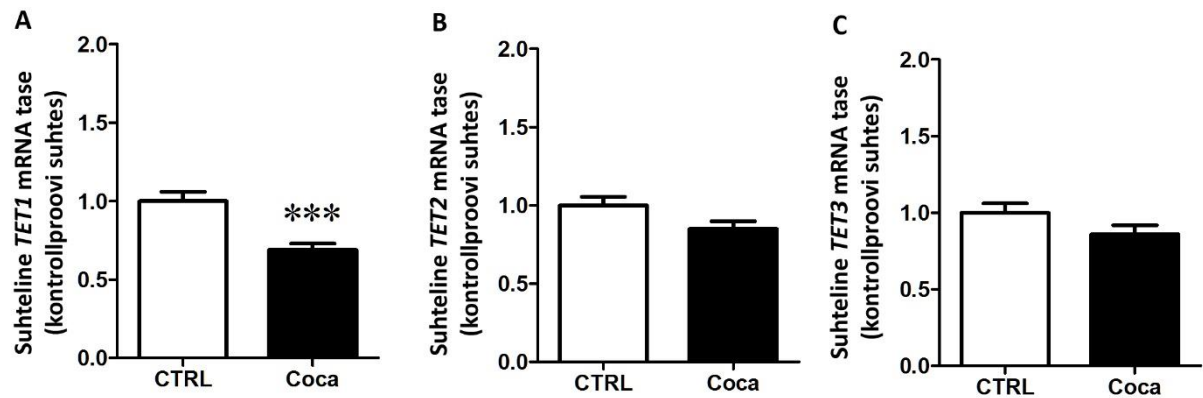
analüüs ning Bonferroni järeltest doonorite ja kontrollidega. *TET2* mRNA tasemete muutustes statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Viimane ehk kuues uuritav geen oli *TET3*. Akuutse kokaiini mõju *TET3* mRNA tasemele olid poole tunnise töötuse järel 0,92; ühetunnise töötuse järel 1,10; pooleteisetunni töötuse järel 0,95; kahetunnise töötuse järel 0,96; neljatunnise töötuse järel 1,02; 24-tunnise töötuse järel 0,97 (Joonis 5C). Korduva kokaiini mõju tulemusena oli *TET3* mõõdetud mRNA tase 0,86 (Joonis 6C). *TET3* ekspressiooni hindamiseks sooritati ühefaktoriline ANOVA analüüs ning Bonferroni järeltest doonorite ja kontrollidega. *TET3* mRNA tasemete muutustes statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud.

Kokkuvõttes ei mõjutanud akuutne kokaiiniga töötlemine *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ja *TET2-3* ekspressioonitasemeid inimese PBMC-des, ent võrreldes korduva kokaiini töötusega leiti seal oluline *TET1* ekspressiooni vähenemine.



Joonis 5. Akuutse kokaiini töötuse mõju *TET*-de mRNA tasemetele inimese PBMC-des ajapunktidel 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 24h: A) *TET1*, B) *TET2*, C) *TET3*. Ctrl – kontrollproov. Ekspressiooni väärtuste erinevuste statistiliste olulisuse hindamiseks teostati ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest; n=18. Veapostid väljendavad SEM-i.



Joonis 6. Kroonilise kokaiini töötuse mõju *TET*-de mRNA tasemetele inimese PBMC-des: A) *DNMT1*, B) *DNMT3A*, C) *DNMT3B*. Ctrl – kontrollproov, Coca – kokaiiniga töödeldud proov. Ekspressiooni väärtuste erinevuste statistiliste olulisuse hindamiseks teostati ühefaktoriline ANOVA analüüs, Bonferroni järeltest; n=18. Ekspressiooni väärtuste erinevuste statistiliste olulisuse hindamiseks p-väärtus: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; n=18. Veapostid väljendavad SEM-i.

5. ARUTELU

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida kokaiini mõju DNA modifitseerijate geeniekspressioonile inimese perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes. Meie töörühma eelnev uuring näitas hiirtel kokaiini manustamisest tingitud muutusi epigeneetiliste DNA modifitseerijate geeniekspressioonis nii sõltuvusega seotud ajukoos (NAc) kui ka sõltuvusega mittespetsiifilises koos (PBMC) (Anier et al., 2018). Kokaiin võib DNA metülatsiooni ja demetülatsiooni kaudu modifitseerida geenide transkriptsiooni ajus ja samuti ka PBMC-des, kuid viimase puhul pole täpne arusaam veel selge (Anier et al., 2018). Mesolimbilises DA süsteemis seondub kokaiin DAT-iga ning inhibeerib DA tagasihaaret neuronisse, häirides füsioloogilisi intratsellulaarsid signaaliradu. Arvatakse, et eelkirjeldatu viib transkriptsioonifaktorite aktiveerimiseni või pärssimiseni, mõjutades selle kaudu lõpuks epigeneetiliste DNA modifitseerijate ekspressioonitaset (Nestler, 2013). DAT on põhiliselt ekspresseeritud kesknärvisüsteemis, kuid vähemal määral ekspresseeritakse ka perifeerset DAT-i lümfotsüütides (T-rakud, B-rakud, NK-rakud) ja monotsüütides (Mackie et al., 2018). Kokaiin võib seonduda vereringes perifeerse DAT-iga ning blokeerida sealset DA tagasihaaret. Imetajate puhul on eluslooma ajule ligipääs oluliselt raskendatud, et näha ja testida kokaiinist tingitud molekulaarseid muutuseid, kuid kokaiin puutub enne ajju jõudmist kokku vereringega, mis oleks (inimese) puhul lihtsamalt kättesaadav. Uurida võiks ajukoe asemel inimese PBMC-de *DNMT*-de ja *TET*-ide ekspressiooni, mis aitaksid viidata molekulaarsetele muutustele sõltuvusega seotud ajuregioonides. Bakalaureusetöö on olulise tähtsusega, kuna varasemalt pole inimese PBMC-des uuritud kokaiinist indutseeritud molekulaarseid muutusi.

Akuutsest kokaiinist indutseeritud geeniekspressioon võib erineda korduvast kokaiinist (Feng et al., 2014). Kokaiini kumulatiivne toime avaldub kokaiini kuhjumisega organismis, kui kokaiini manustamine on suurem kui selle elimineerimine organismist, mis võib esile tuua täiendavaid mõjusid, mida seostatakse sõltuvuse püsivusega. Täpne põhjus, miks ravimsõltuvus püsib, pole veel lõpuni arusaadav. Akuutne ja korduv kokaiini kokkupuude võivad DNA modifitseerijate mRNA tasemeid mõjutada erinevalt ning seeläbi ka erinevaid märklaudgeenid (LaPlant et al., 2010). Anier et al. leidsid, et *DNMT1* ja *DNMT3A* ekspressioon hiirte PBMC-des langes poole tunnise akuutse töötuse järel, samas kui 24-tunnine töötust suurendas *DNMT3A* ekspressioon ning korduv kokaiini manustamine suurendas nii *DNMT1* kui ka *DNMT3A* ekspressiooni (Anier et al., 2018). Antud uuringus akuutse vs kroonilise kokaiini töötuses olulisi tulemusi ei täheldatud.

Mitmed uuringud on kokaiinisõltuvuse paremaks mõistmiseks keskendunud molekulaarsetele muutustele neuraalses koes ning leidnud, et kokaiin indutseerib DNMT-de düsregulatsiooni NAc-is (Anier et al., 2010; LaPlant et al., 2010; Vaher et al., 2020; Urb et al., 2020). Meie töögrupi eelnev uuring leidis, et nii akuutne kui ka pikaajaline kokkupuude kokaiiniga põhjustas hiirte NAc-is ja PBMC-des *DNMT1* ja *DNMT3A* mRNA tasemete tõusu ning DNMT ensümaatilise aktiivsuse suurenemist (Anier et al., 2018). *DNMT3B* ekspressiooni puhul oli muutusi märgata ainult hiirte NAcis, kuid mitte PBMC-des (Anier et al., 2018). Siinjuures võiks täpsustada, et *DNMT* ekspressioon ja DNMT ensüümiaktiivsus NAcis oli rohkem väljendunud kui väljaspool mesolimbilist DA juhteteed (Anier et al., 2018), mis võib olla seotud *DNMT* kõikuva ekspressiooniga erinevates rakutüüpides (Yue et al., 2014). Kokaiinisõltuvuse püsivus on eelnevalt seostatud *DNMT*-de ekspressiooniga katseloomade ajus. Ülesreguleeritud *DNMT3A* võib omada rolli kokaiinist indutseeritud käitumuslikus sensitiseerimises (Urb et al., 2020), milleks nimetatakse nähtust, kui korduv psühhostimulaatori manustamine põhjustab katseloomades suurenenud käitumusliku vastuse. Käesolevas uuringus ei leitud, et akuutne ja korduv kokaiini (3 mg/L) töötlus mõjutaks oluliselt *DNMT1*, *DNMT3A* ja *DNMT3B* ekspressiooni inimese PBMC-des. Kuna *DNMT3A* ja *DNMT3B* teostavad *de novo* metülatsiooni, on ensüümid seetõttu hädavajalikud imetajate postmitootilistes rakkudes (Moore et al., 2013; Okano et al., 1999). Sünnijärgselt aga langeb *DNMT3A* ja *DNMT3B* ekspressioon ning *DNMT3A* ja *DNMT3B* ensüümiaktiivsus jääb madalaks erinevates rakutüüpides (Xie et al., 1999; Yue et al., 2014). See selgitaks osati, miks ei täheldatud kokaiini mõju inimese PBMC-de *DNMT* ekspressioonis.

TET-ide rolli ravimisõltuvuses on vähem uuritud kui DNMT ensüüme. Meie tööühma varasemas uuringus *TET*-de ekspressioon katse loomades ei muutunud korduva kokaiini manustamise mõjul, kuid see-eest leiti, et just akuutne kokaiini manustamine langetab hiirte PBMC-des *TET1* ekspressiooni (Anier et al., 2018). Käesolev töö näitas, et korduv kokaiini töötlus (3 mg/L) langetab *TET1* geeniekspressiooni inimese PBMC-des (Joonis 6A; ühefaktoriline ANOVA, Bonferroni järeltest; $p < 0,001$; $n = 18$). Lisaks meie tööühma teadustööle, uurisid Feng ja kolleegid hiirte *TET1* rolli indutseeritud kokaiinisõltuvuses ja leidsid, et korduv kokaiini manustamine hiirtes langetab oluliselt *TET1* ekspressioonitaset NAc-is (Feng et al., 2015). Täiendavalt uurisid Feng et al. surmajärgselt kokaiinisõltuvuses patsientide ajukude, kus leiti NAc-is ligi 40% *TET1* mRNA taseme langus (Feng et al., 2015), mis osati sarnaneb nii Anier et al. kui ka antud uuringu tulemustega. Korrelatsiooni inimese NAc ja PBMC-de *TET1* ekspressioonis vajab edasisi uuringuid. Kuna nii eelnevates kui ka käesolevas uuringus ei täheldatud *TET2* ja *TET3* ekspressioonis olulisi muutusi, siis võib

pakkuda, et kokaiinisõltuvuses omab põhilist rolli ainult *TET1* poolt vahendatud geenide düsregulatsioon.

TET-vahendatud demetülatsioon on seotud arenguga, embrüonaalsete tüvirakkude säilitamise ja diferentseerumisega, vähiga ning neuronaalsete funktsioonidega (Wu & Zhang, 2017; Hahn et al., 2013). TET ensüümid (TET1-3) katalüüsivad 5-mC-d 5-hmC-ks, mõjutades seeläbi 5-hmC globaalset taset genoomis (Tahiliani et al., 2009). 5-hmC sisaldus on eriti kõrge neuraalses koes, mis viitab TET-ide ensümaatilisele aktiivsusele ajus (Kriaucionis & Heintz, 2009). 5-hmC võib olla nii DNA demetülatsiooni vahelüli kui ka eraldiseisev epigeneetiline märgistus, mida on rohkelt täheldatud geenikehades, promootorites ja transkriptsioonifaktori sidumissaitides, kus see võib mõjutada geeniekspressiooni (Mellen et al., 2012; Kaas et al., 2013; Hahn et al., 2013). Varasemad uuringud pakkusid, et allareguleeritud *TET1* ekspressioon vähendab 5-mC konversiooni 5-hmC-ks, mille tulemuseks on promootorite hüpermetülatsioon ja maha surutud transkriptsioon (Kaas et al., 2013; Rudenko et al., 2013; Zhang et al., 2013). Viimased uuringud demonstreerivad vastupidist efekti, kus korduva kokaiini manustamisest vähenenud *TET1* ekspressioon tõstis 5-hmC sisaldust mitmetes ravimsõltuvusega seotud geenides, mille tulemusena geene aktiveeriti, mitte ei vaigistatud (Anier et al., 2018; Feng et al., 2015). Edasised uuringuid peaksid selgitama kroonilise kokaiini mõju TET1 ensümaatilisele aktiivsusele, Esialgsed tulemused viitavad, et kokaiin võib mõjutada DNA demetülatsiooni kaudu geenide transkriptsiooni PBMC-des, kuid märklaudgeenid, mida TET1 mõjutab, vajab edasisi uuringuid.

Sõltuvuse diagnoosimiseks on vaja paremini mõista, kuidas sõltuvus molekulaarsel tasemel välja kujuneb ning millised mehhanismid on sellega seotud. Piiratud aja jooksul on võimalik kasutada mitmeid efektiivseid teste, ent mis on eelkõige sobilikud akuutse kokaiini kasutamise kindlaksmääramisel. Keerulisem on eristada pikaajalist, korduvat kokaiini tarbimist ühekordsest tarbimisest. Näiteks positronemissioontomograafia uurimismeetodiga, mille käigus skaneeritakse aju, oleks võimalik uurida ajus DA markereid, kuid selline meetod vajab radioaktiivse märkaine kasutamist (Hasin et al., 2013). Samuti tuleb arvesse võtta indiviidide eripärasid ning muid psühhiaatrilisi häireid, mis võivad kattuda ravimsõltuvusega seotud ajuregioonides, muutes diagnoosimise keerulisemaks (Hasin et al., 2013). Seega kokaiinisõltuvuse diagnoosimist hõlbustaks biomarkeri olemasolu, seetõttu oleks huvitav uurida kas *TET1* ja selle vahendatud märklaudgeenide düsregulatsioon võib olla biomarkeriks, mida saab analüüsida vedelbiopsia abil.

KOKKUVÕTE

Meie töörühma eelnevas teadustöös uuriti hiirtes kokaiinist indutseeritud epigeneetilisi muutusi ning leiti, et kokaiini akuutsest ja korduvast manustamisest tulenevad muutused geeniekspressioonis olid näha ka väljaspool sõltuvusega seotuid regioone (PBMC-d). Seetõttu võeti sihiks uurida kokaiini mõju inimese PBMC-des, et näha kas hiire PBMC-des nähtud tulemused sarnanevad ka inimese vererakkudes.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kokaiini mõju DNA modifitseerijate geeniekspressioonile inimese PBMC-des. Olulisemad järeldused:

- Akuutne kokaiini töötlus ei mõjutanud oluliselt *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ega *TET1-3* mRNA tasemeid inimese PBMC-des;
- Krooniline kokaiini töötlus ei mõjutanud oluliselt *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ega *TET2-3* mRNA tasemeid inimese PBMC-des;
- Krooniline kokaiini töötlus langetas oluliselt *TET1* mRNA taset inimese PBMC-des.

Antud töö tulemused sarnaneb eelneva uuringuga hiirtel ning näitab, et kokaiin võib mõjutada epigeneetiliste DNA modifitseerijate ekspressiooni ka inimese PBMC-des ning seeläbi reguleerida DNA metülatsiooni ja/või demetülatsiooni, mis viib märklaudgeenide aktiveerimise või inaktiveerimiseni. Käesolev töö näitab, et korduval kokaiini töötlusel langeb oluliselt *TET1* ekspressioon inimese PBMC-des.

Effect of cocaine on DNA modifiers on human peripheral mononuclear cells

Kerli Sikk

SUMMARY

Substance use disorder is a brain disease that has been characterized by a compulsion to seek and use psychoactive drugs that eventually have a negative impact on individual's psych, behavior, and sociality. Psychoactive drugs, such as cocaine and amphetamine, are highly addictive, but only some individuals make a transition from occasional, controlled substance use to loss of control in drug intake, developing a chronic relapsing disorder. The neurobiology of psychostimulant-induced addiction remains incompletely understood. Cocaine induces changes in the brain reward related circuitry as a result of chronic exposure to cocaine. These molecular alterations in the brain are believed to be stable and long-term which poses a threat to relapse even after abstinence.

Epigenetic mechanisms are involved in the development of cocaine addiction. DNA methylation regulates gene expression as a response to environmental stimuli. Evidence suggests that cocaine may modify gene transcription via DNA methylation and demethylation in addiction-specific brain structures (nucleus accumbens) and outside of the brain (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). DNA methylation is regulated by *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* and DNA demethylation by *TET1*, *TET2*, *TET3*.

Previous studies have found that cocaine alters mRNA levels in mice nucleus accumbens and PBMCs. The aim of this study was to investigate the effect of cocaine treatment on both DNA methylation and demethylation in the human PBMCs. The main focus was to determine the mRNA levels of six DNA modifiers (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2*, *TET3*) after acute and chronic exposure to cocaine (3 mg/L). Gene expression was measured by using qPCR.

Acute cocaine treatment did not affect mRNA levels of *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1-3*. Chronic cocaine treatment affected only *TET1* mRNA level, but not the rest DNA modifiers. Cocaine seems to downregulate *TET1* which could eventually alter gene regulation. Further research should give more information about enzymatic activity of *TET1* as in the previous study it was shown that *TET1* downregulation led to gene activation in mouse. It is also interesting to further research whether *TET1* downregulation could be suitable diagnostic biomarker for drug addiction.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aapola, U., Shibuya, K., Scott, H. S., Ollila, J., Vihinen, M., Heino, M., Shintani, A., Kawasaki, K., Minoshima, S., Krohn, K., Antonarakis, S. E., Shimizu, N., Kudoh, J., & Peterson, P. (2000). Isolation and Initial Characterization of a Novel Zinc Finger Gene, DNMT3L, on 21q22.3, Related to the Cytosine-5- Methyltransferase 3 Gene Family. *Genomics*, 65(3), 293–298. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6168>
- Akahori, H., Guindon, S., Yoshizaki, S., & Muto, Y. (2015). Molecular Evolution of the TET Gene Family in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28472–28485. <https://doi.org/10.3390/ijms161226110>
- Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2010). DNA Methylation Regulates Cocaine-Induced Behavioral Sensitization in Mice. *Neuropsychopharmacology*, 35(12), 2450–2461. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.128>
- 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(3), 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.07.012>
- Anier, K., Urb, M., Kipper, K., Herodes, K., Timmusk, T., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2018). Cocaine-induced epigenetic DNA modification in mouse addiction-specific and non-specific tissues. *Neuropharmacology*, 139, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.036>
- Bakulski, K. M., Halladay, A., Hu, V. W., Mill, J., & Fallin, M. D. (2016). Epigenetic Research in Neuropsychiatric Disorders: The “Tissue Issue”. *Current behavioral neuroscience reports*, 3(3), 264–274. <https://doi.org/10.1007/s40473-016-0083-4>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Bourc’his, 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. <https://doi.org/10.1126/science.1065848>
- Catterall, W. A., & Mackie, K. (2015). Local Anesthetics. L. L. Brunton, B. A. Chabner, & B. C. Knollmann (Toim), *Goodman & Gilman’s: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12. tr). McGraw-Hill Education. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1127866670
- Chen, Z., Li, S., Subramaniam, S., Shyy, J. Y.-J., & Chien, S. (2017). Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19(1), 195–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044720>
- Chen, Z.-X., Mann, J. R., Hsieh, C.-L., Riggs, A. D., & Chédin, F. (2005). Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *Journal of Cellular Biochemistry*, 95(5), 902–917. <https://doi.org/10.1002/jcb.20447>

- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z., & Li, E. (2003). Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5594–5605. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5594-5605.2003>
- Chiara, G. D., Tanda, G., Bassareo, V., Pontieri, F., Acquas, E., Fenu, S., Cadoni, C., & Carboni, E. (1999). Drug Addiction as a Disorder of Associative Learning: Role of Nucleus Accumbens Shell/Extended Amygdala Dopamine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877(1), 461–485. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09283.x>
- Cotton, A. M., Price, E. M., Jones, M. J., Balaton, B. P., Kobor, M. S., & Brown, C. J. (2015). Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Human Molecular Genetics*, 24(6), 1528–1539. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu564>
- Davies, M. N., Volta, M., Pidsley, R., Lunnon, K., Dixit, A., Lovestone, S., Coarfa, C., Harris, R. A., Milosavljevic, A., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Dobson, R., Schalkwyk, L. C., & Mill, J. (2012). Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biology*, 13(6), R43. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r43>
- Day, J. J., Childs, D., Guzman-Karlsson, M. C., Kibe, M., Moulden, J., Song, E., Tahir, A., & Sweatt, J. D. (2013). DNA methylation regulates associative reward learning. *Nature neuroscience*, 16(10), 1445–1452. <https://doi.org/10.1038/nn.3504>
- Delhommeau, F., Dupont, S., Valle, V. D., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., ... Bernard, O. A. (2009, detsember 3). *Mutation in TET2 in Myeloid Cancers* (world) [Research-article]. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa0810069](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa0810069); Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>
- Edwards, J. R., Yarychivska, O., Boulard, M., & Bestor, T. H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & Chromatin*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8>
- Favrod-Coune, T., & Broers, B. (2010). The Health Effect of Psychostimulants: A Literature Review. *Pharmaceuticals*, 3(7), 2333–2361. <https://doi.org/10.3390/ph3072333>
- Felsenfeld, G. (2014). A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018200>
- Feng, J., Shao, N., Szulwach, K. E., Vialou, V., Huynh, J., Zhong, C., Le, T., Ferguson, D., Cahill, M. E., Li, Y., Koo, J., Ribeiro, E., Labonte, B., Laitman, B. M., Estey, D., Stockman, V., Kennedy, P., Couroussé, T., Mensah, I., ... Nestler, E. J. (2015). Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nature neuroscience*, 18(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/nn.3976>

- Feng, J., Wilkinson, M., Liu, X., Purushothaman, I., Ferguson, D., Vialou, V., Maze, I., Shao, N., Kennedy, P., Koo, J., Dias, C., Laitman, B., Stockman, V., LaPlant, Q., Cahill, M. E., Nestler, E. J., & Shen, L. (2014). Chronic cocaine-regulated epigenomic changes in mouse nucleus accumbens. *Genome Biology*, *15*(4), R65. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r65>
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., & Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1827>
- Goldstein, R. A., DesLauriers, C., & Burda, A. M. (2009). Cocaine: History, Social Implications, and Toxicity—A Review. *Disease-a-Month*, *55*(1), 6–38. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2008.10.002>
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E., & Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science*, *311*(5759), 395–398. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>
- Gu, T.-P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.-P., Xu, G.-F., Liu, W., Xie, Z.-G., Shi, L., He, X., Jin, S., Iqbal, K., Shi, Y. G., Deng, Z., Szabó, P. E., Pfeifer, G. P., Li, J., & Xu, G.-L. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, *477*(7366), 606–610. <https://doi.org/10.1038/nature10443>
- Hahn, M. A., Qiu, R., Wu, X., Li, A. X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.-G., Jiang, Y., Pfeifer, G. P., & Lu, Q. (2013). Dynamics of 5-Hydroxymethylcytosine and Chromatin Marks in Mammalian Neurogenesis. *Cell Reports*, *3*(2), 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.011>
- Hasin, D. S., O'Brien, C. P., Auriacombe, M., Borges, G., Bucholz, K., Budney, A., Compton, W. M., Crowley, T., Ling, W., Petry, N. M., Schuckit, M., & Grant, B. F. (2013). DSM-5 Criteria for Substance Use Disorders: Recommendations and Rationale. *American Journal of Psychiatry*, *170*(8), 834–851. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.12060782>
- Hendrich, B., & Bird, A. (1998). Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(11), 6538–6547. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6538>
- Holliday, R., & Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, *187*(4173), 226–232. <https://doi.org/10.1126/science.187.4173.226>
- Huang, Y., Chavez, L., Chang, X., Wang, X., Pastor, W. A., Kang, J., Zepeda-Martínez, J. A., Pape, U. J., Jacobsen, S. E., Peters, B., & Rao, A. (2014). Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(4), 1361–1366. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322921111>

- Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 695–703. <https://doi.org/10.1038/35094560>
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). NEURAL MECHANISMS OF ADDICTION: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 565–598. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009>
- Ioshikhes, I. P., & Zhang, M. Q. (2000). Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nature Genetics*, 26(1), 61–63. <https://doi.org/10.1038/79189>
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., & Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6047), 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>
- Kaas, G. A., Zhong, C., Eason, D., Ross, D., Vachhani, R. V., Ming, G., King, J., Song, H., & Sweatt, J. D. (2013). TET1 Controls CNS 5-methylcytosine Hydroxylation, Active DNA Demethylation, Gene Transcription and Memory Formation. *Neuron*, 79(6). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.032>
- Karch, S. B. (1999). Cocaine: History, Use, Abuse. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92(8), 393–397. <https://doi.org/10.1177/014107689909200803>
- Kim, S. T., & Park, T. (2019). Acute and Chronic Effects of Cocaine on Cardiovascular Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030584>
- Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., An, J., Lamperti, E. D., Koh, K. P., Ganetzky, R., Liu, X. S., Aravind, L., Agarwal, S., Maciejewski, J. P., & Rao, A. (2010). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, 468(7325), 839–843. <https://doi.org/10.1038/nature09586>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: A neurocircuitry analysis. *The lancet. Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kosten, T. R., Domingo, C. B., Shorter, D., Orson, F., Green, C., Somoza, E., Sekerka, R., Levin, F. R., Mairani, J. J., Stitzer, M., Tompkins, D. A., Rotrosen, J., Thakkar, V., Smoak, B., & Kampman, K. (2014). Vaccine for cocaine dependence: A randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial. *Drug and Alcohol Dependence*, 140, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.04.003>
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base, 5-hydroxymethylcytosine is present in brain and enriched in Purkinje neurons. *Science (New York, N.y.)*, 324(5929), 929–930. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>
- Kuehner, J. N., Bruggeman, E. C., Wen, Z., & Yao, B. (2019). Epigenetic Regulations in Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Genetics*, 10, 268. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00268>

- Kumar, A., Choi, K.-H., Renthal, W., Tsankova, N. M., Theobald, D. E. H., Truong, H.-T., Russo, S. J., LaPlant, Q., Sasaki, T. S., Whistler, K. N., Neve, R. L., Self, D. W., & Nestler, E. J. (2005). Chromatin Remodeling Is a Key Mechanism Underlying Cocaine-Induced Plasticity in Striatum. *Neuron*, *48*(2), 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.023>
- Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, *11*(3), 191–203. <https://doi.org/10.1038/nrg2732>
- LaPlant, Q., Vialou, V., Covington, H. E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B., Maze, I., Dietz, D. M., Watts, E. L., Iñiguez, S. D., Koo, J. W., Mouzon, E., Renthal, W., Hollis, F., Wang, H., Noonan, M. A., Ren, Y., Eisch, A. J., Bolaños, C. A., ... Nestler, E. J. (2010). Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience*, *13*(9), 1137–1143. <https://doi.org/10.1038/nn.2619>
- Leshner, A. I. (1997). Addiction Is a Brain Disease, and It Matters. *Science*, *278*(5335), 45–47. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.45>
- Levenson, J. M., Roth, T. L., Lubin, F. D., Miller, C. A., Huang, I.-C., Desai, P., Malone, L. M., & Sweatt, J. D. (2006). Evidence That DNA (Cytosine-5) Methyltransferase Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(23), 15763–15773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511767200>
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, *69*(6), 915–926. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F)
- Li, E., & Zhang, Y. (2014). DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133>
- Li, Y., & Li, J. (2019). Technical advances contribute to the study of genomic imprinting. *PLOS Genetics*, *15*(6), e1008151. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008151>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorsbach, R. B., Moore, J., Mathew, S., Raimondi, S. C., Mukatira, S. T., & Downing, J. R. (2003a). TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*, *17*(3), 637–641. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402834>
- Lorsbach, R. B., Moore, J., Mathew, S., Raimondi, S. C., Mukatira, S. T., & Downing, J. R. (2003b). TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*, *17*(3), 637–641. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402834>
- Ludwig, A. K., Zhang, P., & Cardoso, M. C. (2016). Modifiers and Readers of DNA Modifications and Their Impact on Genome Structure, Expression, and Stability in Disease. *Frontiers in Genetics*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00115>

- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Mackie, P., Lebowitz, J., Saadatpour, L., Nickoloff, E., Gaskill, P., & Khoshbouei, H. (2018). The dopamine transporter: An unrecognized nexus for dysfunctional peripheral immunity and signaling in Parkinson's Disease. *Brain, behavior, and immunity*, 70, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.03.020>
- Maiti, A., & Drohat, A. C. (2011). Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35334–35338. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.284620>
- McCreary, A. C., Müller, C. P., & Filip, M. (2015). Chapter Four - Psychostimulants: Basic and Clinical Pharmacology. P. Taba, A. Lees, & K. Sikk (Toim), *International Review of Neurobiology* (Kd 120, lk 41–83). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.02.008>
- Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2012). MeCP2 binds to 5hmc enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 151(7), 1417–1430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.022>
- Mews, P., Walker, D. M., & Nestler, E. J. (2018). Epigenetic Priming in Drug Addiction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 83, 131–139. <https://doi.org/10.1101/sqb.2018.83.037663>
- Mizugaki, M., Itoh, K., Yamaguchi, T., Ishiwata, S., Hishinuma, T., Nozaki, S., & Ishida, N. (1996). Preparation of a Monoclonal Antibody Specific for 5-Methyl-2'-deoxycytidine and Its Application for the Detection of DNA Methylation Levels in Human Peripheral Blood Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(12), 1537–1540. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.1537>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Morris, M. J., & Monteggia, L. M. (2014). Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), 359–371. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2014.16.3/morris>
- Nestler, E. J. (2005). The Neurobiology of Cocaine Addiction. *Science & Practice Perspectives*, 3(1), 4–10. <https://doi.org/10.1151/spp05314>
- Nestler, E. J. (2013). Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15(4), 431–443. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2013.15.4/enestler>
- O'Brien, C. P. (2017). Drug Use Disorders and Addiction. L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, & B. C. Knollmann (Toim), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13. tr). McGraw-Hill Education. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1162537356

- O'Donnell, K. J., & Meaney, M. J. (2020). Epigenetics, Development, and Psychopathology. *Annual Review of Clinical Psychology*, 16(1), 327–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050718-095530>
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99(3), 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)
- Ono, R., Taki, T., Taketani, T., Taniwaki, M., Kobayashi, H., & Hayashi, Y. (2002). LCX, Leukemia-associated Protein with a CXXC Domain, Is Fused to MLL in Acute Myeloid Leukemia with Trilineage Dysplasia Having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Research*, 62(14), 4075–4080. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(02\)00534-4](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(02)00534-4)
- Ritz, M. C., Lamb, R. J., Goldberg, & Kuhar, M. J. (1987). Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science*, 237(4819), 1219–1223. <https://doi.org/10.1126/science.2820058>
- Rivera, C. M., & Ren, B. (2013). Mapping Human Epigenomes. *Cell*, 155(1), 39–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.011>
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>
- Rudenko, A., Dawlaty, M. M., Seo, J., Cheng, A. W., Meng, J., Le, T., Faull, K. F., Jaenisch, R., & Tsai, L.-H. (2013). Tet1 Is Critical for Neuronal Activity-Regulated Gene Expression and Memory Extinction. *Neuron*, 79(6), 1109–1122. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.003>
- Ruetsch, Y. A., Boni, T., & Borgeat, A. (2001). From Cocaine to Ropivacaine: The History of Local Anesthetic Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(3), 175–182. <https://doi.org/10.2174/1568026013395335>
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1412–1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
- Schindler, C. W., & Goldberg, S. R. (2012). Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity. *Future Medicinal Chemistry*, 4(2), 163–175. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.181>
- Sibley, D. R., Hazelwood, L. A., & Amara, S. G. (2017). 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) and Dopamine. L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, & B. C. Knollmann (Toim), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13. tr). McGraw-Hill Education. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1162535003
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., & Tajima, S. (2004). DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27816–27823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200>

- Zhang, R.-R., Cui, Q.-Y., Murai, K., Lim, Y. C., Smith, Z. D., Jin, S., Ye, P., Rosa, L., Lee, Y. K., Wu, H.-P., Liu, W., Xu, Z.-M., Yang, L., Ding, Y.-Q., Tang, F., Meissner, A., Ding, C., Shi, Y., & Xu, G.-L. (2013). Tet1 Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognition. *Cell Stem Cell*, 13(2), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.006>
- Zhao, Z., & Shilatifard, A. (2019). Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biology*, 20(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1870-5>
- Zhong, J., Agha, G., & Baccarelli, A. A. (2016). The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease: Methodological Aspects, Study Design, and Data Analysis for Epidemiological Studies. *Circulation research*, 118(1), 119–131. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.305206>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Urb, M., Niinep, K., Matsalu, T., Kipper, K., Herodes, K., Zharkovsky, A., Timmusk, T., Anier, K., & Kalda, A. (2020). The role of DNA methyltransferase activity in cocaine treatment and withdrawal in the nucleus accumbens of mice. *Addiction Biology*, 25(1), e12720. <https://doi.org/10.1111/adb.12720>
- Vaher, K., Anier, K., Jürgenson, M., Harro, J., & Kalda, A. (2020). Cocaine-induced changes in behaviour and DNA methylation in rats are influenced by inter-individual differences in spontaneous exploratory activity. *Journal of Psychopharmacology*, 34(6), 680–692. <https://doi.org/10.1177/0269881120916137>
- Veland, N., Lu, Y., Hardikar, S., Gaddis, S., Zeng, Y., Liu, B., Estecio, M. R., Takata, Y., Lin, K., Tomida, M. W., Shen, J., Saha, D., Gowher, H., Zhao, H., & Chen, T. (2019). DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 152–167. <https://doi.org/10.1093/nar/gky947>
- Volkow, N. D., Koob, G. F., & McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *The New England journal of medicine*, 374(4), 363–371. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1511480>
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Tomasi, D., Telang, F., & Baler, R. (2010). Addiction: Decreased reward sensitivity and increased expectation sensitivity conspire to overwhelm the brain's control circuit. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 32(9), 748–755. <https://doi.org/10.1002/bies.201000042>
- Waddington, C. H. (2012). The Epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Walker, D. M., & Nestler, E. J. (2018). Neuroepigenetics and addiction. *Handbook of clinical neurology*, 148, 747–765. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00048-X>

- Walton, E., Hass, J., Liu, J., Roffman, J. L., Bernardoni, F., Roessner, V., Kirsch, M., Schackert, G., Calhoun, V., & Ehrlich, S. (2016). Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophrenia Bulletin*, 42(2), 406–414. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv074>
- Weber, A. R., Krawczyk, C., Robertson, A. B., Kuśnierczyk, A., Vågbø, C. B., Schuermann, D., Klungland, A., & Schär, P. (2016). Biochemical reconstitution of TET1–TDG–BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10806>
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 18(9), 517–534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.-W., Okumura, K., & Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236(1), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00252-8)
- Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B. D., Shen, Y., Pervouchine, D. D., Djebali, S., Thurman, R. E., Kaul, R., Rynes, E., Kirilusha, A., Marinov, G. K., Williams, B. A., ... Ren, B. (2014). A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*, 515(7527), 355–364. <https://doi.org/10.1038/nature13992>

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada enda juhendajat Mari Urb'e panustatud aja ja kannatlikkuse eest ning igakülgse nõustamise ja abi eest töö koostamisel. Tänan Anti Kaldat, kes andis mulle võimaluse teha bakalaureusetöö farmakoloogia uurimisgrupis. Samuti soovin tänada oma kaasjuhendajat Ants Kurge asjakohaste märkuste ja praktiliste nõuannete eest.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kerli Sikk,

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

Kokaiini mõju DNA modifitseerijatele inimese perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes,

mille juhendaja on Mari Urb, PhD ja kaasjuhendaja Ants Kurg, PhD,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kerli Sikk

Tartus, 11.08.2021