

Tartu Ülikool  
Sotsiaalteaduste valdkond  
Psühholoogia instituut

Raiko Marrandi

INDIVIDUAALSETE ERINEVUSTE ROLL KROONILISE STRESSI MÕJUS RNA m<sup>6</sup>A  
EPITRANSKRIPTOOMILISELE REGULATSIOONILE ROTI HÜPOTALAMUSES

Magistritöö

Juhendaja: Jaanus Harro

Tartu 2026

## Individaalsete erinevuste roll kroonilise stressi mõjus RNA m<sup>6</sup>A epitranskriptomilisele regulatsioonile roti hüpotalamuses

### Kokkuvõte

Metülatsioon adenosiini N<sup>6</sup> positsioonis (m<sup>6</sup>A) on närvisüsteemis üks enim levinud ja olulisemaid RNA modifikatsioone, mis reguleerib mRNA splaissingut, transporti, stabiilsust ning translatsiooni. Viimastel aastatel on aina enam kogunenud tõendeid RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni rollist sünaptilise plastilisuse ja akuutse stressreaktsiooni reguleerimises ning düsfunktsioonist seoses psühhopaatoloogiatega. Selles töös uurisime 108 isasel Wistar-rotil kroonilise muutliku stressi mõju nelja m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleeriva ensüümi ja veel kahe stressiga seotud valgu ekspressioonile hüpotalamuses. Lähtudes rottide püsiomadustest suhkruarbitimises kui hedoonilises reaktsioonis (kõrge HSuc, madal LSuc) ja 50-kHz ultrahelihäälitsuste dispositsioonis kui positiivses afektiivsuses (kõrge HC, madal LC), jagati rotid sekkumise ning inter-individaalsete erinevuste põhjal kaheksasse rühma (n = 13-14). Stressirežiimi järgselt näitasid stressile allutatud loomad käitumiskatses pigem impulsiivsuse-sarnast aktiveeritust kui ärevuskäitumisi. RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooniga seotud ensüümide ekspressioonid hüpotalamuses olid omavahel kõrgelt korreleerunud ( $\rho = 0,37-0,77$ ), kuid seos puudus *Fto* ja *Mettl3* ekspressioonide vahel. Stress vähendas statistiliselt olulisel määral vaid *Fto* ekspressiooni kõrgeima haavatavusega LC-HSuc rühmas ( $p = 0,047$ ). *Bdnf*-i ja *Crf1r* ekspressioonimustrid korreleerusid oluliselt mitme RNA m<sup>6</sup>A-d moduleeriva ensüümi ekspressiooniga, kuid stress ega loomade püsiomadused ei moduleerinud korrelatsioone. Need leiud toetavad individaalsete erinevuste, positiivse afektiivsuse ning suhkruarbitimise, kasutamist psühhopaatoloogia bioloogiliste mehhanismide uurimiseks, näidates fenotüüpide interaktsiooni stressijärgses m<sup>6</sup>A demetülaasi *Fto* ekspressioonis.

Märksõnad: krooniline stress, individaalsed erinevused, positiivne afekt, suhkruarbitimine, mRNA, m<sup>6</sup>A metülatsioon, *Fto*

## Individual differences in hypothalamic RNA m<sup>6</sup>A epitranscriptomic regulation after chronic stress in rats

### Abstract

Among the most abundant and important RNA modifications in the central nervous system is methylation in the N<sup>6</sup> position of adenosine (m<sup>6</sup>A), which regulates mRNA splicing, transport, stability, and translation. Growing evidence implicates m<sup>6</sup>A in synaptic plasticity, acute stress response regulation, and psychopathology. We examined the effect of chronic variable stress (CVS) on hypothalamic expression of four RNA m<sup>6</sup>A-modulating enzymes and two stress-related proteins in 108 male Wistar rats. Rats were divided into eight groups (n = 13-14) based on CVS exposure and two stable traits: sucrose consumption as reward sensitivity (high HSuc, low LSuc) and 50-kHz ultrasonic vocalization rate as positive affectivity (high HC, low LC). Post CVS, animals subjected to stress showed more impulsivity-like activation than anxiety-like behaviours. m<sup>6</sup>A-modulating enzyme expressions were highly intercorrelated ( $\rho = .37-.77$ ), except *Fto-Mettl3*. Stress significantly reduced mRNA expression only for *Fto* in vulnerable LC-HSuc group ( $p = .047$ ). *Bdnf* and *Crf1r* expressions correlated significantly with most m<sup>6</sup>A-modulating enzymes, unmodulated by stress or phenotype. These findings support using individual differences in positive affectivity and sucrose consumption to investigate the biological mechanisms of psychopathology, demonstrating a phenotype  $\times$  stress interaction in m<sup>6</sup>A demethylase *Fto* expression.

Keywords: chronic stress, individual differences, positive affect, sucrose intake, mRNA, m<sup>6</sup>A methylation, *Fto*

## Individaalsete erinevuste roll kroonilise stressi mõjus RNA m<sup>6</sup>A epitranskriptomilisele regulatsioonile roti hüpotalamuses

Viimastel aastatel on aina enam tähelepanu saanud epitranskriptomilised muutused võimaliku tegurina psühhiaatrilises patogeneesis. Üks enam levinud mRNA modifikatsioon on metülatsioon adenosiini N<sup>6</sup> positsioonis (m<sup>6</sup>A), mis reguleerib mRNA splaissingut, transporti, stabiilsust ja translatsiooni (Zaccara et al., 2019). m<sup>6</sup>A metülatsiooni leidub närvisüsteemis ohtramalt kui teistes organites ning on leitud tõendeid selle rollist nii hiirte ja inimeste aju arengus kui ka funktsioneerimises, näiteks areneva ja täiskasvanud aju neurogeneesis, vigastusjärgselt aksonite taastumises ning hirmude tingimisel (Livneh et al., 2020). Varasem subkrooniline m<sup>6</sup>A metüültransferaasi aktivaatori manustamine rottidele suurendas liikumisaktiivsust ja vähendas ärevust (Kanarik et al., 2025). Seega võib m<sup>6</sup>A düsfunktsioon olla seotud käitumise ja neuropsühhiaatriliste häiretega, kuid seni on vähe teada m<sup>6</sup>A muutuste seostest pikaajalise stressiga. Käesolev töö uurib individaalsete erinevuste mõju kroonilise muutliku stressi (KMS) katses 108 isase roti käitumisele ning RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni reguleerivate ensüümide mRNA ekspressioonile hüpotalamuses.

RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni katalüüsib metüültransferaasi kompleks, mille tuumiku moodustavad METTL3, METTL14 ja Wilmsi kasvajaga seotud valk 1 (WTAP), ning demetülatsiooni katalüüsivad rasvamassi ja ülekaalulisusega seotud valk (FTO) ja ensüüm ALKBH5 (Oerum et al., 2021). Suurelt osalt geenidelt pärinev mRNA sisaldab vaid ühte m<sup>6</sup>A modifikatsioonisaiti, kuid mitmed geenid võimaldavad ka 15 või enam m<sup>6</sup>A saiti. Enamik mRNA m<sup>6</sup>A-jääkidest paikneb ahela 3' otsas ja stoppkoodoni vahetus läheduses (Meyer et al., 2012). Metülatsiooni ja demetülatsiooni reguleerivad molekulid kutsutakse vastavalt kirjutajateks ja kustutajateks. m<sup>6</sup>A jääkidega RNA järjestustele seonduvaid valke kutsutakse lugejateks. Neist peamised on YTH domeeni sisaldavad valgud, näiteks YTHDC1, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2 ja YTHDF3, ning eukarüootne initsiatsioonifaktor 3 (eIF3) (Meyer & Jaffrey, 2017).

Mitmed korrelatiivsed ja geneetiliste muudatustega uuringud viitavad RNA m<sup>6</sup>A ja seda moduleerivate ensüümide rollile depressiooni- või ärevuslaadsete käitumiste mediaatorina, kuid tulemused ei ole ühesed, olenedes nii ajupiirkonnast, stressiparadigmast kui ka käitumiskatsetest. Depressiooni diagnoosiga patsientide perifeerses veres on leitud nii häirunud RNA m<sup>6</sup>A-metüleerituse reaktsioon glükokortikoidide manustamisele (Engel et al., 2018) kui m<sup>6</sup>A kirjutajate, aga ka kustutajate madalam mRNA ekspressioonitase (Liu et al., 2021). Samuti

leidsid Liu jt. oluliselt langenud *FTO* ekspressioonitaseme depressiooniga patsientide hippokampuses *post-mortem* ning *Fto* ekspressiooni vähenemise KMS-i, immobilisatsioonistressi või sotsiaalse alistumise stressi järgselt hiirte hippokampuses võrreldes kontrollrühmaga. Kooskõlas Liu jt. leitudega näitasid Wu jt. (2021) tritsükliliste antidepressantide otsest mõju *Fto* ekspressiooni tõusule ventraalses tegmentaalses alas (VTA) ning toetasid seda kahesuunalise manipulatsiooniga – VTA-spetsiifiline *Fto* häirimine tekitas hiiretel haavatavuse stressile ja kaotas tritsükliliste antidepressantide mõju, kuid globaalse m<sup>6</sup>A vähendamine VTA-s *Fto* üleekspressiooni kaudu vähendas depressioonilaadset käitumist kroonilise sotsiaalse alistumise mudeli hiirtes.

Epitranskriptoomiliste muutuste ja depressiooni seostes on viiteid moduleerimisele nii mälu ja hammaskäaru neurogeneesi protsesside häirimise kui stressreaktsiooni düsregulatsiooni kaudu (Livneh et al., 2020). Spychala ja Rüter (2019) leidsid *Fto knock-out* (KO) hiirtel kõrgenenud kortikosterooni ja adrenokortikotroopse hormooni (ACTH) taseme, enam ärevuskäitumist, häirunud töömälu ning madalama ajast pärineva neurotroofse faktori (*Bdnf*) ja seda töötleva ensüümi, maatriksi-metalloproteinaas-7, ekspressiooni hippokampuses. Mitu KO-uuringut on leidnud Morrise veelabürindis õppimis- ja mäludefekte (Li et al., 2017; Shi et al., 2018; Z. Zhang et al., 2018). Sünnijärgse *Fto*-KO hiirtel oli ka hippokampuse *Bdnf*-i ekspressioon oluliselt langenud ning aju ja keha madal mass viitas neuroarengulisele peetusele (Li et al., 2017). Zhang jt. (2018) katses oli *Mettl3*-KO hiirte sooritus veelabürindis algselt häiritud, kuid paranes korduval testimisel. Samuti oli õppimise tõhusus mõõdukas seoses *METTL3* valgu tasemega basaalses hippokampuses ka metsiktüüpi (*wild-type*, WT) hiirtel. *Ythdf1*-KO hiirte õppimisvõime taastus *Ythdf1* re-ekspressioonil, kuid KO-hiirtel oli häiritud ka hirmude tingimine ning hippokampuse neuronite sünaptiline ülekanne ja pikaajaline potentseerimine (Shi et al., 2018). See-eest on mujal leitud ka hiirte mälu paremist tingitud hirmu suhtes *Fto knock-down* (KD) tulemusena mediaalses eesajukoos (Widagdo et al., 2016) ja dorsaalses hippokampuses (Walters et al., 2017).

RNA m<sup>6</sup>A-metülatsiooni seoseid stressreaktsiooni reguleerimisega on süvitsi uurinud Engel jt. (2018). Nad leidsid, et 15-minutilise akuutse stressi tagajärel langes hiirte globaalne m<sup>6</sup>A tase eesajukoos ja tõusis mandelkeha basolateraalses ja kesktuumas. Globaalse m<sup>6</sup>A-metüleerituse muutustele eelnesid mõlemas piirkonnas vastupidised muutused lugeja *Ythdc1* ning kustutajate *Fto* ja *Alkbh5* ekspressioonis, kuid kustutajate muutumismustrid ei olnud

ajaliselt kooskõlas. See-eest vähenes *Mettl3* ekspressioon stressijärgselt mõlemas ajupiirkonnas. Kõik muutused püsisid ka 24 tundi hiljem. Viidates endogeensete glükokortikoidide olulisusele stressreaktsiooni vahendamises, leidsid nad hiirte eesajukooses ja mandelkehas samasuunalisi muutuseid globaalse m<sup>6</sup>A ning *Fto* ja *Alkbh5* ekspressiooni tasemetes ka kortikosterooni, kuid mitte sünteetilise glükokortikoidretseptori agonisti deksametasooni, kõhukelmeõõnde manustamisel (Engel et al., 2018).

Stressijärgset glükokortikoidide vabanemist imetajatel reguleerib hüpotalamuse-ajuripatsi-neerupealiste (HPA) telg, mille düsfunktsiooni on järjepidevalt seostatud mitmete stressiga seotud meeleoluhäirete patofüsioloogia ja tekkega (Keller et al., 2017; Zorn et al., 2017). Vastusena stressile suureneb episoodiliselt kortikotropiini vabastava faktori (CRF) ja vasopressiini (AVP) eritumine hüpotalamuse paraventriculaartuumast (PVN) (Tsigos & Chrousos, 2002). Need stimuleerivad ajuripatsis pro-opiomelanokortiini (POMC) transkriptsiooni ning see töödeldakse osaliselt ACTH-ks (Feldman et al., 1997). ACTH omakorda aktiveerib neerupealiste koort tootma glükokortikoide, inimestel peamiselt kortisooli ja närilistel kortikosterooni (Feldman et al., 1997). Neerupealiste steroidhormoonide oluline funktsioon on vahendada organismi pikaajalist adapteerumist keskkonnas, mõjutades selektiivse tähelepanu mehhanisme, tingitud vältimiskäitumiste õppimist ja kustutamist ning ka episoodilise informatsiooni konsolideerumist (Albers & Price, 2011). Need steroidhormoonid avaldavad oma neuropaalset mõju seondudes hormoon-retseptorkompleksi moodustavatele mineralo- ja glükokortikoidretseptoritele, mis moduleerivad DNA ekspressiooni sihtgeenides (de Kloet et al., 2005). Sedasi *POMC* ja *CRF* ekspressiooni inhibeerides, reguleerivad glükokortikoidid negatiivse tagasiside ringena HPA-telje aktiivsust ning omaenda sünteesi ja vabanemist (Tafet & Nemeroff, 2020).

Varajaste traumaatiliste sündmuste või pikaajalise stressi tagajärjel võib HPA-telje negatiivse tagasiside ringe olla pidurdatud, põhjustades telje püsivat aktivatsiooni ja hüperkortisolismi (Tafet & Nemeroff, 2020). Seetõttu on uuritud CRF1-retseptori (CRF1R), PVN-s potentsiaalse autoregulatiivse ning ajuripatsis peamise CRF-i sihtmärgi (Aguilera & Liu, 2012), antagonistide kui võimalikke antidepressante või anksiolüütikume (Holsboer & Ising, 2008; Mällo et al., 2004). Kuigi kliinilised uuringud inimpatsientidel ei õnnestunud, leitakse jätkuvalt geneetilisi ja biokeemilisi seoseid CRF-CRF1R süsteemi ning meeleoluhäirete vahel (Spierling & Zorrilla, 2017). RNA modifikatsioonide andmebaasi R2MVar V2.0 (Luo et al., 2021) andmetel

on inimese *CRF1R* mRNA-s vähemalt 13 m<sup>6</sup>A modifikatsioonisaiti, millest kaheksa puhul võivad geneetilised variandid põhjustada alleelispetsiifilisi erinevusi m<sup>6</sup>A modifikatsiooni tasemetes. Kuna m<sup>6</sup>A metülatsioon mõjutab mRNA stabiilsust ja translatsiooni efektiivsust, interakteerudes ajupiirkonnaspetsiifiliselt stressiga (Engel et al., 2018), võib see allavoolu mõjuna vahendada osaliselt ka *Crf1r* mRNA stressijärgset ekspressiooni.

Pikaajaline stress vähendab ka *Bdnf*-i, mille transkript on ohtralt m<sup>6</sup>A saitidega rikastatud (Luo et al., 2021), ekspressiooni rottide hippokampuses (Macedo et al., 2015; Nibuya et al., 1999; Niknazar et al., 2016) ja prefrontaalkoores (Y. Zhang et al., 2010). *Bdnf*-i üleekspresseerivatel rottidel ei teki KMS-i tagajärjel käitumuslikku anhedooniat, samas kui *Bdnf*-KD rotid sarnanevad käitumuslikult stressile haavatavatele WT-rottidele (Taliaz et al., 2011). Kuigi BDNF-i valgu ja mRNA tasemed peaaegu on kõrgeimad just hippokampuses ning hüpotalamuses (Tapia-Arancibia et al., 2004), on hüpotalamuse *Bdnf*-i reaktiivsus stressile ebaselge: akuutne stress põhjustab ajutiselt BDNF-i valgu taseme hüppelise tõusu ning muudab mRNA ekspressiooni transkriptispetsiifiliselt (Rage et al., 2002), kolmenädalane immobilisatsioonistress tõstab basaalselt valgu taset, kuid põhjustab lisanduval akuutsel stressil valgu taseme hüppelise languse (Naert et al., 2011), ning kombineeritud stressi mudelites langeb BDNF valgu tase vaid mitmele stressitüübile allutatud loomadel võrreldes naiivse või ainult kroonilise stressiga kontrollrühmaga (Macedo et al., 2015; Sosanya et al., 2019). Kokkuvõtvalt ei ole erinevalt hippokampusest hüpotalamuse kohta selge, kas pikaajalisel stressil on mõju *Bdnf*-i ekspressioonile. Kuna muutused RNA m<sup>6</sup>A regulatsioonimehhanismides mõjutavad oluliselt ka *Bdnf*-i ekspressiooni hippokampuses (Li et al., 2017; Spsychala & Rütther, 2019), on põhjendatud uurida, kas leitud seosed on hippokampuse-spetsiifiliselt lokaliseerunud või esinevad ka mujal ajus.

Töös kasutatavas kroonilise muutliku stressi mudelis (KMS) eksponeeritakse loomi neljanädalases ajaraamis korduvalt erinevatele kergetele stressoritele, mille kumulatiivne anhedooniline mõju mudeldab depressiooni (Willner, 1997). Kuna depressioon on heterogeense etioloogilise ja neurobioloogilise taustaga häire, mille kujunemist ja kulgu mõjutavad individuaalsed erinevused (Ferrari & Villa, 2017), siis võib depressiooni modelleerimine homogeense reaktsioonina varjata olulisi haavatavus- ja kaitsemehhanisme. Seetõttu kasutame lähtepunktina rottide inter-individaalseid erinevusi kahes püsiomaduses: 50-kHz ultrahelihäälitsuste dispoitsioonid ning püsisuhkrutarbimises, mis võivad vastavalt peegeldada

rottide kalduvust positiivsele afektile (Panksepp & Burgdorf, 2003) ja „hedoonilist“ reaktsiooni (Tõnissaar et al., 2006). Mõlemad tunnused on mõõdetavalt stabiilsed (Mällo et al., 2007; Tõnissaar et al., 2006) ja iseseisvad (Sundarakrishnan & Clarke, 2022) ning nende kombineeritud kasutamine on varasemalt näidanud lisanduvat seletusjõudu rottide käitumise ja biokeemiliste muutuste kirjeldamisel KMS-is (Vares et al., 2025).

Lähtudes kirjandusest RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni rollist stressreaktsioonis ning *Crf1r*-i ja *Bdnf*-i mRNA stressitundlikkusest hüpotalamuses, seadsime neli uurimisküsimust.

1. Kas krooniline muutlik stress muudab RNA m<sup>6</sup>A kirjutajate ja kustutajate mRNA ekspressiooni hüpotalamuses?
2. Kas krooniline muutlik stress muudab *Crf1r*-i ja *Bdnf*-i mRNA ekspressiooni hüpotalamuses?
3. Kuidas mõjutavad rottide individuaalsed erinevused *Mettl3*, *Mettl14*, *Alkbh5*, *Fto*, *Crf1r* ja *Bdnf* mRNA stressijärgset ekspressiooni hüpotalamuses?
4. Kuidas korreleeruvad hüpotalamuse *Crf1r*-i ja *Bdnf*-i ekspressioonitasemed m<sup>6</sup>A metülatsiooni kirjutajate ja kustutajate ekspressioonidega ning kas stress ja loomade fenotüübid moduleerivad neid seoseid?

Töö autor eraldas RNA hüpotalamusest, sünteesis komplementaarse DNA (cDNA), määras mRNA ekspressioonitasemed ning osales samas katses monoamiinide kontsentratsiooni määramisel mandelkehast, koostas kirjanduse ülevaate, analüüsis töös esitatud andmeid ja kirjutas lõpliku töö.

## Meetod

### Loomad ja üldine protseduur

Ekspirimendis vaadeldi 108 isast RccHan®:WISTtõugu rott (Tartu Ülikooli Chemicumi vivaariumis aretatud, vanemloomad Envigo RMS B.V., Horst, Holland). Loomi majutati standardsetes polüpropeenpuurides kontrollitud valgustsükli (valgustid 08:00-20:00) ja temperatuuriga (20°–21 °C) tingimustes. Loomadel oli vaba ligipääs veele ja toidupelletitele (v1534–000 *universal maintenance diet*, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Saksamaa).

Rotid võõrutati emast 21-päevaselt ja majutati ühekaupa. Peale võõrutamist hinnati kahe nädala kestel positiivset afektiivsust, misjärel loomad majutati neljakaupa puuridesse. Püsisahharoositarbimise hindamiseks tehti neli sahharoositesti, kord nädalas, ning üheksandal

elunädalal hinnati käitumist uudiskastis. Saadud fenotüüpide ning kaalu põhjal tasakaalustatult jagati loomad kaheksasse rühma (4 KMS tingimuses ja 4 kontrolltingimuses; 13-14 isendit rühmas). Seejärel majutati nad ümber, igas puuris 2 HC ja 2 LC ning 2 HSuc ja 2 LSuc looma, kokku neli looma.

KMS režiim kestis neli nädalat, millele järgneval seitsmel päeval toimusid käitumiskatsed. Loomad eutaneeriti isofluraanianesteesias kahe võrdse grupina teisel ja kolmandal päeval peale käitumiskatsete lõppu dekapitatsiooni teel. Ajud külmutati koheselt kuival jääl olevas isopentaanis ning hoiustati  $-80^{\circ}\text{C}$  juures. Kehatüve veri koguti glükoositaseme määramiseks ning neerupealised ja tüümused dissekteeriti ning kaaluti. Hiljem dissekteeriti ajud jääl edasisteks biokeemilisteks analüüsideks.

Kõik protseduurid, v.a. sahharoositarbimine ja üleöö kestvad stressorid, viidi läbi valgustusega faasis. Uuringu on heakskiitnud Põllumajandus- ja Toiduamet, loomkatseprojekti luba nr 283. Loomkatsed olid kooskõlas Euroopa komisjoni direktiiviga nr 2010/63/EU ja ARRIVE juhistega ning katsekavand sai kinnituse Regionaal- ja Põllumajandusministeeriumilt.

### **Positiivse afektiivsuse fenotüübi määramine**

Positiivse afektiivsuse (PA) fenotüüp määrati 50-kHz ultrahelihäälitsuste põhjal, imiteerides rotipoegade mängu-müramist peale emast võõrutamist igapäevaselt kaks nädalat, mille jooksul kujuneb rottidel välja iseloomulik ja stabiilne häälitsemise tase (Mällo et al., 2007).

Mängu-müramise imiteerimisel kasutati kõdistamiseks Panksepa ja Burgdorfi (2000) kirjeldatud meetodit. Kahe minutilise testimise alguses anti loomale 15 sekundit uue puuriga ( $30 \times 15 \times 13$  cm) harjumiseks, millele järgnesid vahelduvad 15 s kõdistamise ja 15 s puhkuse kordused. Viimase kolme päeva ultrahelihäälitsused salvestati ja arvatati looma keskmine 50-kHz häälitsuste arv. Selle alusel jagati loomad võrreldes valimi mediaaniga kõrge (HC, *high chirping*) või madala (LC, *low chirping*) positiivse afektiivsuse fenotüübiga rühma.

### **Püsisuhkrutarbimise fenotüübi määramine**

Püsisuhkrutarbimise fenotüübi määramiseks testiti loomi nelja nädala jooksul kord nädalas pimedas faasis. Üksikmajutusega harjumiseks paigutati loomad ümber üks tund enne testimist. Vahetult enne pimedas faasi algust asetati puuridele pudel joogiveega ja pudel 1% suhkrulahusega. Üksiktestimine kestis 12 tundi, toit oli kättesaadav terve katse vältel ning sellele ei eelnenud toidu ega vee deprivatsiooni. Enne ja pärast katset kaaluti pudeleid ning arvatati

loomade keskmine suhkrutarbimine. Arvestades suhkruga tutvumise mõju esimesel testimisel, jagati rotid kolme viimase testimise mediaani põhjal kõrge (HSuc, *high sucrose*) või madala (LSuc, *low sucrose*) suhkrutarbimise fenotüübiga rühma. Mediaanilähedase suhkrutarbimise korral lähtuti rühmitamisel ka positiivse afektiivsuse fenotüübi tasakaalustamisest.

### Krooniline muutlik stress

Neljanädalase KMS režiimi (Kõiv et al., 2019) jooksul kogesid loomad vaheldumisi erinevaid lühikesi ja pikemaegseid stressoreid, et vältida habituatsiooni (Willner, 1997); protokoll on toodud Tabelis 1. Kõik stressorid peale kallutatud, ülerahvastatud ja märja puuri viidi läbi eraldi toas. Kontrollrühma loomi hoiti segamatult majutusruumis. Kroonilise stressi mõju hindamiseks mõõdeti loomade suhkrutarbimist ning kaalu enne režiimi algust ning igal nädalal režiimi jooksul.

**Tabel 1**

#### *Kroonilise muutliku stressi protokoll*

Päev	Stressor	Mõõtmine	Päev	Stressor	Mõõtmine
0		1. suhkur/kaal			
1	ÖV (12 h)		15	ÖV (12 h)	
2	KR (1 h)		16	TA (30 min)	
3	ÜR (12 h)		17	Märg puur (24 h)	
4	<i>Restraint</i> (5 min)		18	KR, pimedas (1 h)	
5	TA, ere valgus (30 min)		19	LP (2 h)	
6	PK (öine, 12 h)		20	PK (12 h + 4-6 h päeval)	
7	Pesulõks	2. suhkur/kaal	21	Pesulõks	4. suhkur/kaal
8	ÖV(12 h)		22	Äraspidine valgustükk (24 h)	
9	Müra (päeval, 1-2 h)		23	Müra (päeval, 1 h) / PK (12h)	
10	ÖS (12 h)		24	Külm ruum (1 h) / ÖS (12 h)	
11	ÜR (18 h)		25	TA (30 min) / ÜR (12 h)	
12	LP (1h)		26	<i>Restraint</i> / PK (öine 12h)	
13	PK (12 h)		27	LP (2 h) / märg puur (16 h)	
14	Pesulõks	3. suhkur/kaal	28	Pesulõks	5. suhkur/kaal

*Märkus.* ÖV = öine valgus; KR = külm ruum; ÜR = ülerahvastatus (8 looma); *restraint* ehk intraperitoneaalse süsti imiteerimine; TA = tõstetud alus; PK = puuri kalle (öine); ÖS = öine stroboskoop; LP = liikumise piiramine

## Käitumiskatsed

Teisel päeval peale KMS režiimi lõppu toimusid nädala jooksul käitumiskatsed liikumisaktiivsuse ja ärevuse- ning depressioonilaadse käitumise hindamiseks. Kõigis katsetes v.a. sundujumise katses puhastati aparatuuri põrand iga looma järgselt märja lapiga ning uudiskastis lindistati 22- ja 50-kHz ultrahelihäälitsusi afekti hindamiseks. Stressirežiimi mõju hoidmiseks eksponeeriti stressirühma loomi lühikesele lisastressile käitumiskatsete kolmandal (müra, 1 h), neljandal (tõstetud alus, 15 min) ja viiendal päeval (sabade triibutamine, kaalumine ja intraperitoneaalse süsti imiteerimine).

Esimesena testiti uuesti rottide ärevus- ja uudistamiskäitumist uudiskastis Otteri jt. (1997) kirjeldatud meetodil. Loomad asetati laeta metallist kasti ( $0,5 \times 1$  m; seinad 0,4 m) lühemal küljel asuvasse kaanega kambrisse ( $20 \times 20 \times 20$  cm), mille üks külg oli avatud ligipääsuks avaralale. Avarala oli jagatud kaheksaks võrdse suurusega ruuduks, kus asusid kindlatel ruutudel kolm võõrast eset (klaaspurk, pappkarp ja puitvars) ja tuttav ese (toidupellet). Eksperimentaator märkis iga looma kohta nelja käpaga (a) avaralale sisenemise aja ja (b) avaralal uudistades veedetud aja, (c) avaralale sisenemise kordused, (d) jooneületused, (e) kahele kápale tõusmised, (f) võõraste esemete uudistamise kordused. Uudistamise kvantifitseerimiseks liideti igal loomal (c) – (f) kordused üheks indeksiks. Üksiktestimine kestis 15 min ja leidis aset hämaras valguses (4-8 lx avaralal).

Järgneval päeval testiti loomade liikumisaktiivsust ja ärevuse taset avarvälja katses Matrovi jt. (2016) kirjeldatud meetodil. Rott asetati kümneks minutiks üksinda ruudukujulisse musta põranda, hallide seinte ja ilma laeta võõra kasti nurka ( $78 \times 78 \times 34$  cm). Kasti keskel oli põrandale märgitud ruut ( $39 \times 39$  cm). Horisontaalse liikumise aega ja distantssi mõõdeti automaatselt EthoVision XT8 tarkvaraga kasutades Panasonic WV-CL930/G kaamerapilti. Kahele kápale tõusmisi tähendati üles käsitsi.

Kolmandana läbisid loomad ärevuse taset hindava null-puuri katse (Shepherd et al., 1994) Matto jt. (1997) kirjeldatud meetodil. Kasutati põrandast 72 cm kõrgusel asetsevat ringikujulist ( $\emptyset 105$  cm) ja 10 cm laiuse rajaga platvormi, mille kaks vastastikust neljandikku olid varjestatud 28 cm kõrguste seintega ja neid ühendavad neljandikud 1 cm kõrguse avatud äärtega. Testimiseks asetati loom ühe avatud neljandiku keskele, misjärel hinnati viie minuti jooksul järgnevat: varjestatud neljandikku sisenemiseks kulunud aega, avatud neljandikes

veedetud aega, neljandike vahel liikumise korduseid, avatud alas või peidus olles üle ääre vaatamisi ning varjestatud alast keha välja venitades uudistamisi.

Viimasena hinnati kahel järjestikusel päeval loomade aktiivsust ja passiivsust toimetulekustrateegiatena sundujumiskatses (Porsolt et al., 1978), mille modifitseeritud meetod on varasemalt kirjeldatud (Mällo et al., 2009). Rotid asetati 25° C veega täidetud silindrisse (Ø 0,2 m, kõrgus 0,6 m). Esimesel päeval kestis protseduur 15 min ja teisel päeval 5 min. Mõlemal kordusel hinnati käitumist esimese viie minuti jooksul. Aktiivseteks käitumisteks registreeriti pea veepealhoidmisest aktiivsemat ujumist ning intensiivset kõigi käppadega rabelemist, kus esikäpad läksid üle veepiiri või vastu seina. Passiivse käitumisena registreeriti liigutusteta või pea veepealhoidmiseks vajalike minimaalsete liigutustega ulpimist.

### **RNA eraldamine ajukoest**

RNA isoleerimiseks kasutati RNeasy Mini komplekti (QIAGEN, Saksamaa). Lüüsipuhvrile lisati 10 µl β-merkaptotoetanooli 1 ml lüüsipuhvri kohta. Seejärel lisati 600 µl lüüsipuhvrit ajukoele. Proove sonifitseeriti ultrahelihomogenisaatoriga järgmiste parameetrite juures: võimsus 50%, 5 s ON, 5 s OFF, 5x (Bandelin Sonopuls HD 2070, Saksamaa). Proove tsentrifuugiti toatemperatuuril 3 minutit 13000 rpm juures. Tekkinud supernatandile lisati võrdne kogus 70% etanooli, millele järgnes suspenderimine. Seejärel pipeteeriti 700 µl lahust kolonnile ja tsentrifuugiti 15 s 13000 rpm juures. Läbijooksnud vedelik eemaldatai. Kolonnile lisati 700 µl RW1 pesupuhvrit, kolonni tsentrifuugiti 15 s 13000 rpm juures. Seejärel pipeteeriti kolonnile 500 µl RPE pesupuhvrit, millele järgnes tsentrifuugimine 15 s 13000 rpm juures. Etappe korrati kaks korda, teisel korral tsentrifuugiti kolonne 2 min 13000 rpm juures. Pesutsükli järgselt kuivatati kolonn tsentrifuugides 1 min 13000 rpm juures. Seejärel pipeteeriti RNA elueerimiseks kolonnile 30-50 µl RNAasi vaba vett, kolonni tsentrifuugiti 1 min 13000 rpm juures. Eraldatud RNA puhtust ja kontsentratsiooni mõõdeti ND-1000 spektrofotomeetriga (NanoDrop Technologies, USA). Valimist eemaldatai üks proov ebapiisava RNA kontsentratsiooni tõttu. Proove hoiustati -80 °C juures.

### **cDNA süntees**

Eraldatud RNA-st sünteesiti komplementaarne DNA (cDNA), kasutades FIREScript RT cDNA sünteesikomplekti (Solis BioDyne, Eesti) vastavalt tootja juhistele. Sünteesireaktsiooniks võeti 500 ng RNA-d, millele lisati järgnev reaktsioonisegu: 1 µl Oligo (dT) (100 µM) praimerit,

0,5 µl dNTP (20 mM) segu, 2 µl 10x RT reaktsioonipuhvrit, 1 µl FireScript pöördtranskriptaasi ning 0,1 µl RiboGrip RNAasi inhibiitorit (200 U/µl). Segu tsentrifugeeriti ning inkubeeriti 50 °C juures 30 minutit, millele järgnes inkubatsioon 85 °C juures 5 minutit. Proove hoiustati -20 °C juures.

### qPCR

Ekspressioonitasemete mõõtmiseks hüpotalamusest kasutati kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni meetodit. cDNA lahjendati nukleaasivaba veega 1/10. Seejärel segati kokku F (*forward* 5'-3') ja R (*reverse* 3'-5') praimerite lahjendused lõppkontsentratsiooniga 5 mM. Reaktsioonisegu jaoks segati kokku 18 µl SYBR™ Green PCR Master Mix-i (Applied Biosystems™, USA), 3 µl praimerite segu ja 15 µl lahjendatud cDNA-d. Praimerite järjestused sihtgeenide ja koduhoidjageeni (*Gapdh*) jaoks on toodud tabelis Lisa 1.

cDNA-d amplifitseeriti 10 µl triplikaatidena 384-süvendilisel plaadil. Kontrollina kasutati nukleaasivaba vett. Reaktsioon qPCR masinas (QuantStudio 6 Pro, Thermo Fisher Scientific, USA) kestis kaks tundi. Programmi sätted olid järgnevad: 10 min polümeraasi aktivatsiooni 95°C juures, seejärel 45 tsükliks 15 s denaturatsiooni (95°C) ja üks minut seondumist (60°C), millele järgnes üks tsükkel sulamiskõvera analüüsi.

Ebaõnnestunud reaktsioonide korral jooksutati proove korduvalt, kuid *Fto* puhul ebaõnnestusid ka mitmete proovide korduskatsed, mistõttu lõplik valimi suurus oli  $n = 80$ , teistel geenidel  $n = 95-106$ .

### Andmeanalüüs

Kõikide statistiliste analüüside ja jooniste loomiseks kasutati vabavaraprogrammi R (versioon 4.5.2). Tulemusi analüüsiti 2x2x2 (stress × suhkrufenotüüp × PA-fenotüüp) dispersioonanalüüsiga haavatavus- ja kaitsefaktorite mõju hindamiseks. Dispersioonanalüüsi eeldusi kontrolliti kasutades Levene'i testi rühmade dispersioonide homogeensuse ning kvantiilide joonist ja Shapiro-Wilki testi jääkide jaotuse hindamiseks. Kui esialgse ANOVA jääkide jaotus rikkus normaaljaotuslikkuse eeldust, siis kasutati permutatsioonipõhist ANOVA-t (lmpPerm, *exact method*). Kuna kordumõõtmistega ANOVA sfäärilisuse eeldus oli rikutud, kasutati ajaliste muutuste hindamiseks loomade kaalus ja suhkrutarbimises juhusliku vabaliikmega segamudeleid (lme4). Eeldustena kontrolliti jääkide homoskedastilisust ning kvantiilide joonistelt jääkide ja juhuslike efektide normaaljaotuslikkust.

Korrelatsioonianalüüsis arvatati Spearmani astakorrelatsioonid, jättes puuduvad vaatlused välja paarikaupa. Kui RNA m<sup>6</sup>A metüülatsiooni moduleerivate ensüümide ning *Bdnf*-i või *Crf1r* ekspressioonitasemetes esines statistiliselt oluline korrelatsioon, hinnati moderatsioonimudelites, kas stressi ja fenotüübid modereerivad neid seoseid. Selleks koostati kuus astakteisendusega permutatsioonipõhist lineaarset mudelit (lmPerm, Ca = 0,001), jättes puuduvate väärtustega vaatlused välja täielike vaatluste meetodil. Eeldustena kontrolliti Cooki distantssi meetodil mõjukate erindite puudumist ning hinnati graafikult jääkide homoskedastilisust.

Geeniekspressioonide arvutamiseks kasutati võrdlevat Ct meetodit,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Proovid normaliseeriti koduhoidjageeni suhtes (*Gapdh*, vt Lisa 1). Kalibraatorina kasutati LC-HSuc-kontrollrühma keskmist  $\Delta Ct$  väärtust. Analüüsideks logaritmiti  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  väärtused alusele 2, et andmed läheneksid normaaljaotusele, ning teisendati tagasi  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  vormi tulemuste ja jooniste esitamiseks.

Statistilise olulisuse nivooks valiti  $\alpha = 0,05$ . Arvestades uuringu eksploratiivset iseloomu, tehti *post-hoc* testid ilma täiendava korrigeerimisega kasutades Fisheri LSD testi või paarikaupa permutatsiooniteste Fisheri LSD põhimõttel.

### **Tehisaru kasutamine**

Töös kasutati generatiivseid keelemudeleid abina programmeerimisel, õppimise toetamisel töö varastes etappides ning töö mustandist keele- ja trükivigade otsimisel (Anthropic, 2026). Kirjanduse otsimisel kasutati ka tehisarupõhist otsingumootorit (Consensus, 2026).

## **Tulemused**

### **Kroonilise stressi mõju kehamassile ja suhkrutarbimisele**

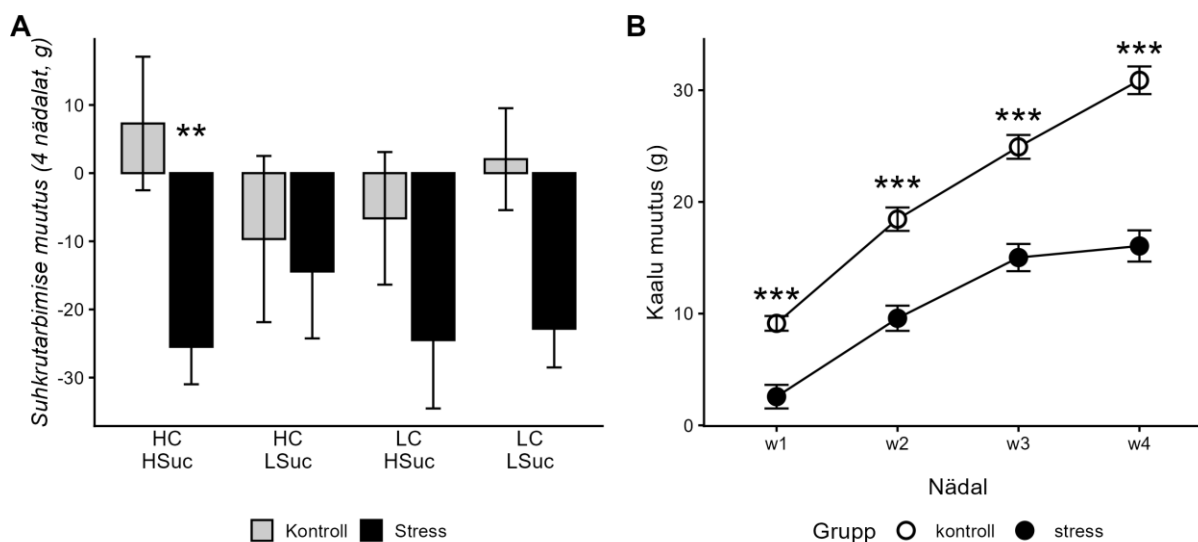
KMS vähendas suhkrutarbimist režiimijärgselt võrreldes baastasemega fenotüüpide üleselt (*Stress*  $F(1; 100) = 9,80$ ;  $p = 0,002$ ; Joonis 1A). Suhkrutarbimine vähenes statistiliselt olulisel määral HC-HSuc-stress rühmas võrreldes HC-HSuc-kontroll ( $\Delta = 32,77$  g; SE = 13,1;  $t(100) = 2,51$ ;  $p = 0,014$ ) ning langus LC-LSuc-stress rühmas võrreldes vastava kontrollrühmaga jäi napilt üle statistilise olulisuse läve ( $\Delta = 24,88$  g; SE = 12,6;  $t(100) = 1,98$ ;  $p = 0,051$ ). Samuti avaldus stressi mõju suhkrutarbimise igapäevasele absoluuttasemele (*Stress*  $\times$  *Nädal*  $F(4; 400) = 5,97$ ;  $p < 0,001$ ) – kontrollrühma suhkrutarbimine oli suurem kui stressrühmal igal

KMS-režiimi nädalal ( $p < 0,001$ ). Erinevused fenotüüpide tasemel jäid napilt üle statistilise olulisuse läve ( $Stress \times Suhkrufenotüüp \times USV\text{-fenotüüp} \times Nädal$   $F(4; 400) = 2,35$ ;  $p = 0,054$ ).

Iganädalastest kaalumistest ei selgunud fenotüübipõhiseid erinevusi, kuid KMS režiimil oli ajast sõltuv mõju kaalumuutusele ( $Stress \times Nädal$   $F(3; 300) = 4,95$ ;  $p = 0,002$ ; Joonis 1B), kus stressrühma loomad ( $M = +16,05$  g) võtsid neljanädalase režiimi jooksul kaalust oluliselt vähem juurde kui kontrollrühma loomad ( $M = +30,89$  g).

## Joonis 1

*KMS režiimi jooksul mõõdetud kaalu ja suhkrutarbimise muutus*



*Märkus.* Muutus baastasemest (w0). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  võrreldes vastava kontrollrühmaga.

## Füsioloogilised ja anotoomilised muutused

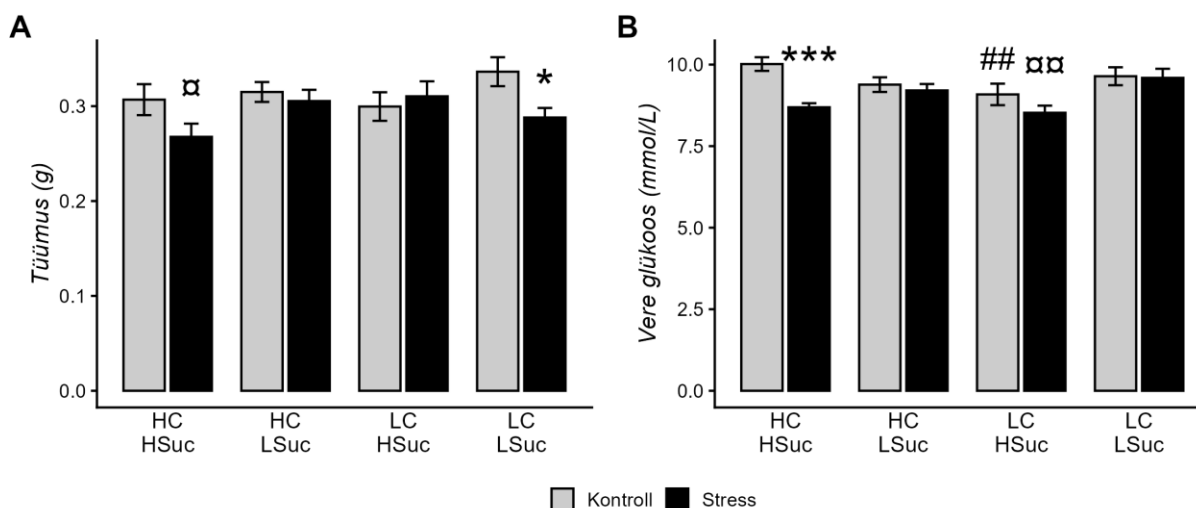
Krooniline muutlik stress avaldas tühimuse kaalule (vt Joonis 2A) mõju sõltuvalt mõlemast fenotüübist ( $Stress \times Suhkrufenotüüp \times USV\text{-fenotüüp}$   $F(1; 100) = 5,21$ ;  $p = 0,025$ ). *Post-hoc* paarikaupa võrdlused näitasid, et tühimused kaalusid vähem LC-LSuc-stress rühmas võrreldes kontrollrühmaga ( $\Delta = 0,043$  g;  $SE = 0,02$ ;  $t(100) = 2,16$ ;  $p = 0,033$ ) ning HC-HSuc-stress võrreldes LC-HSuc-stress ( $\Delta = 0,048$  g;  $SE = 0,02$ ;  $t(100) = 2,53$ ;  $p = 0,013$ ). HC-HSuc-stress loomade tühimused olid ka kontrollrühma loomadest veidi kergemad, kuid mitte

statistiliselt olulisel määral ( $\Delta = 0,039$  g; SE = 0,02;  $t(100) = 1,98$ ;  $p = 0,050$ ). Neerupealiste massilt loomad ei erinevad ( $Stress\ t(105,99) = -1,22$ ;  $p = 0,225$ ).

Rottide vere glükoositasemes erinevustes esinesid nii peamõjud ( $Stress\ F(1; 98) = 13,20$ ;  $p < 0,001$ ;  $USV\text{-}fenotüüp\ F(1; 98) = 7,02$ ;  $p = 0,009$ ) kui ka kahesuunalised interaktsioonid ( $Stress \times Suhkrufenotüüp\ F(1; 98) = 5,69$ ;  $p = 0,019$ ;  $Suhkrufenotüüp \times USV\text{-}fenotüüp\ F(1; 98) = 6,27$ ;  $p = 0,014$ ). Paarikaupa järeldused (vt Joonis 2B) näitasid glükoositaseme langust HC-HSuc-stress rühmas võrreldes kontrollrühmaga ( $p < 0,001$ ), LC-HSuc-kontroll rühmas võrreldes HC-HSuc-kontroll ( $p = 0,009$ ) ning LC-HSuc-stress loomad võrreldes LC-LSuc-stress ( $p = 0,003$ ).

## Joonis 2

### Tüümuse kaal ja vere glükoositaseme



*Märkus.* \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  võrreldes vastav kontrollrühm;  $\alpha p < 0,05$ ,  $\alpha\alpha p < 0,01$  võrreldes vastav LSuc rühm; ## $p < 0,01$  võrreldes vastav HC rühm.

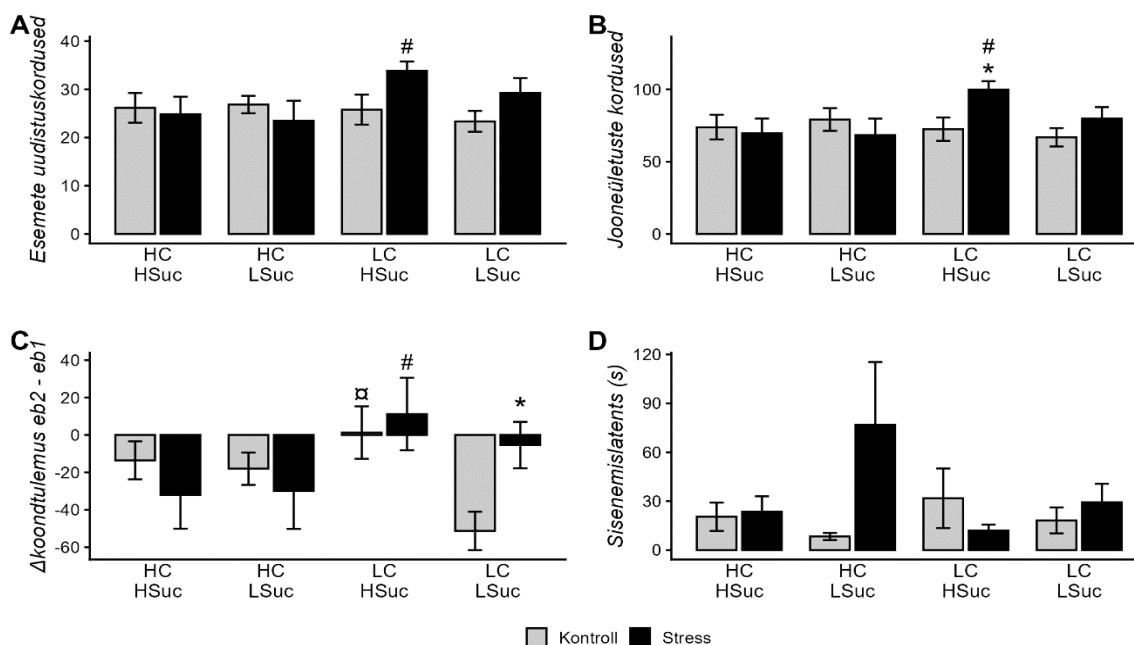
## Käitumiskatsed

Uudiskasti tulemustes kerkis esile 50-kHz USV-fenotüübi interaktsioon stressiga. Interaktsioon esines võõraste esemete uudistamises ( $Stress \times USV\text{-}fenotüüp\ F(1; 100) = 4,98$ ;  $p = 0,028$ ; Joonis 3A), kus LC-HSuc-stress rühm uudistas rohkem HC-HSuc-stress rühmast ( $p = 0,037$ ), ruudustikujoonte ületustes ( $Stress \times USV\text{-}fenotüüp\ F(1; 100) = 5,40$ ;  $p = 0,022$ ; Joonis 3B), kus LC-HSuc-stress rühm liikus rohkem nii vastavast kontroll- ( $p = 0,023$ ) kui ka HC-HSuc-stress rühmast ( $p = 0,014$ ). Samuti stressieelse ja -järgse koondskoori muutuses ( $Stress \times$

*USV-fenotüüp*  $F(1; 100) = 4,35$  ja  $p = 0,039$ ; Joonis 3C), kus LC-LSuc-stress loomade üldine uudistamine vähenes väiksemal määral kui kontrollrühmal ( $p = 0,026$ ), LC-HSuc-kontroll loomadel jäi uudistamine samale tasemele erinevalt langusest LC-LSuc-kontroll rühmas ( $p = 0,011$ ) ja LC-HSuc-stress loomadel uudistamine tõusis erinevalt langusest HC-HSuc-stress rühmas ( $p = 0,042$ ). Trend sama interaktsiooni suunas esines ka uudiskasti avaral alal veedetud ajas (*Stress*  $\times$  *USV-fenotüüp*  $F(1; 100) = 3,54$  ja  $p = 0,063$ ) ja kahele kÄpale tõusudes (*Stress*  $\times$  *USV-fenotüüp*  $F(1; 100) = 3,85$  ja  $p = 0,052$ ). Ainsa erandina sellest interaktsioonist oli avaralasse sisenemises (*Stress*  $\times$  *Suhkrufenotüüp*  $F(1; 99) = 3,54$  ja  $p = 0,038$ ; Joonis 3D), kuid *post-hoc* testides rühmad ei eristunud.

### Joonis 3

#### Uudiskasti tulemused



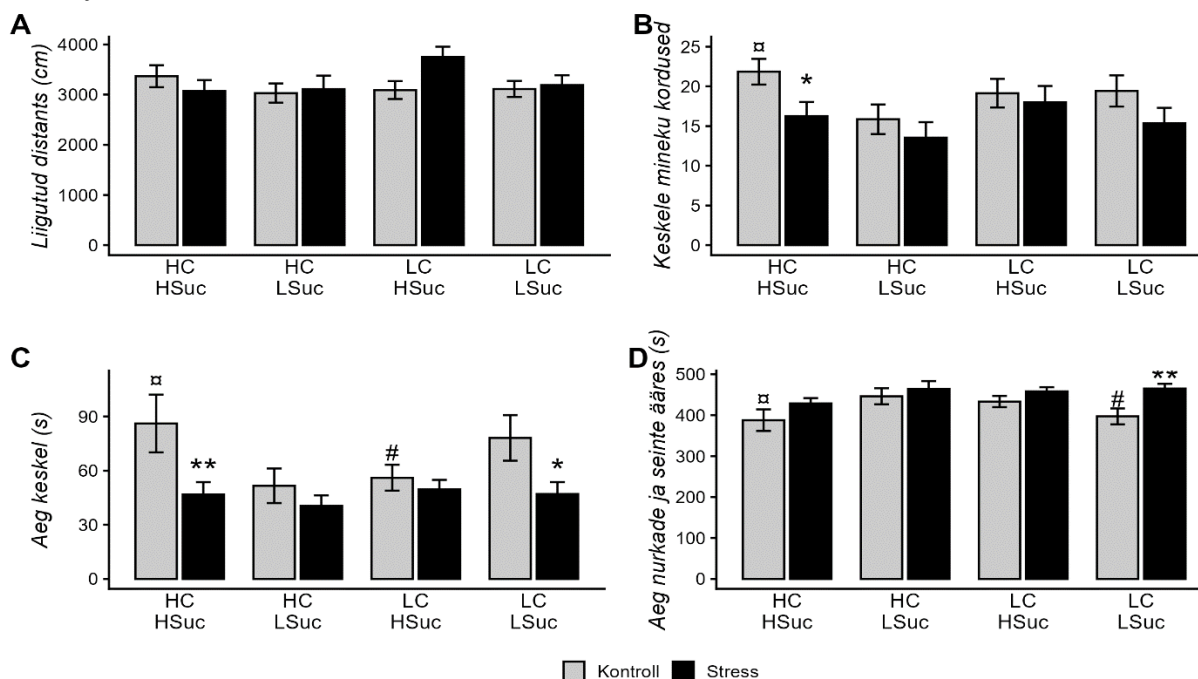
**Märkus.** Joonis C: erinevus KMS-järgse ja -eelse koondtulemustel. \* $p < 0,05$  võrreldes vastav kontrollrühm; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  võrreldes vastav HC; #p  $p < 0,05$  võrreldes vastav LSuc

Avarväljakatses ei esinenud rühmadevahelisi erinevusi liigutud distantsis (Joonis 4A), kahele kÄpale tõusmistes ega fekaalide arvus. Algpositsioonist keskrutu minekul esines stressi peamõju (*Stress*  $F(1; 100) = 8,20$ ;  $p = 0,005$ ), kuid järeltestides rühmad ei eristunud. Keskrutu mindud kordade arvus esinesid peamõjud (*Stress*  $F(1; 100) = 6,07$ ;  $p = 0,015$ ; *Suhkrufenotüüp*

$F(1; 100) = 4,22; p = 0,043$ ; Joonis 4B), mis tulenesid HC-HSuc-kontroll rühma suuremast korduste arvust võrreldes vastava stressirühma ( $p = 0,041$ ) ja HC-LSuc-kontrolliga ( $p = 0,027$ ). Keskrudus veedetud ajas esines fenotüüpide interaktsioon ning trend kolmesuunalise interaktsiooni suunas (*Suhkrufenotüüp*  $\times$  *USV-fenotüüp*,  $F(1; 100) = 5,10; p = 0,026$ ; *Stress*  $\times$  *Suhkrufenotüüp*  $\times$  *USV-fenotüüp*,  $F(1; 100) = 3,92; p = 0,051$ ; Joonis 4C). *Post-hoc* testid näitasid lühemat aega keskrudus LC-LSuc-stress loomadel võrreldes kontrolliga ( $p = 0,020$ ) ning kõrgemat aega HC-HSuc-kontroll loomadel võrreldes vastava stressrühma ( $p = 0,005$ ), LC-HSuc-kontrolli ( $p = 0,027$ ) ning LC-LSuc-kontrolliga ( $p = 0,011$ ). Nurkades ja seinte ääres veedetud ajas esines peamõju ja interaktsioon (*Stress*,  $F(1; 100) = 9,55; p = 0,003$ ; *Suhkrufenotüüp*  $\times$  *USV-fenotüüp*,  $F(1; 100) = 6,31; p = 0,014$ ; Joonis 4D). Järeldused peegeldasid keskel veedetud aja tulemusi, näidates lühemat peitumist LC-LSuc-kontroll rühmas võrreldes vastava stressrühma ( $p = 0,006$ ) ning HC-LSuc-kontrolliga ( $p = 0,044$ ) ja pikemat peitumist HC-HSuc-stress rühmas võrreldes kontrolliga ( $p = 0,019$ ).

## Joonis 4

### Avarvälja katse tulemused

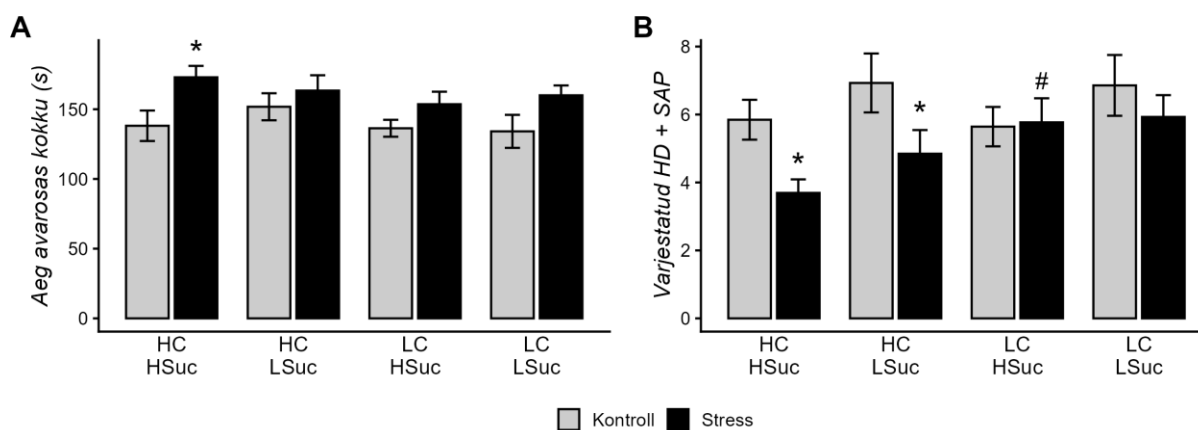


*Märkus.* \* $p < 0,05$  ja \*\* $p < 0,01$  võrreldes vastav kontrollrühm; # $p < 0,05$  võrreldes vastav HC; # $p < 0,05$  võrreldes vastav LSuc

Nullpuurikatses fenotüüpide-vahelisi erinevusi ei esinenud, kuid stressrühma loomad ( $M = 162$  s;  $SE = 4,74$ ) veetsid enam aega avatud neljandikes kui kontrollrühma loomad ( $M = 140$  s;  $SE = 4,65$ ), ( $Stress F(1; 100) = 11,27$ ;  $p = 0,001$ ; Joonis 5A), kus selgeim stress-kontroll erinevus esines HC-HSuc rühmas ( $p = 0,012$ ) ning jäi LC-LSuc rühmas napilt üle statistilise olulisuse piiri ( $p = 0,050$ ). Kontrollrühma loomad venitasid end rohkem varjestatud neljandikes olles välja avatud alale ja üle ääre vaatamiseks, ( $Stress F(1; 100) = 4,95$ ;  $p = 0,028$ ; Joonis 5B). Paarikaupa järeldused näitasid kõrgemat varjestatud uudistamist nii HC-HSuc-kontroll võrreldes vastav stressrühm ( $p = 0,034$ ) kui ka HC-LSuc-kontroll võrreldes HC-LSuc-stress ( $p = 0,037$ ) ning LC-HSuc-stress rühmal võrreldes HC-HSuc-stress rühmaga ( $p = 0,041$ ).

## Joonis 5

### Nullpuuri tulemused



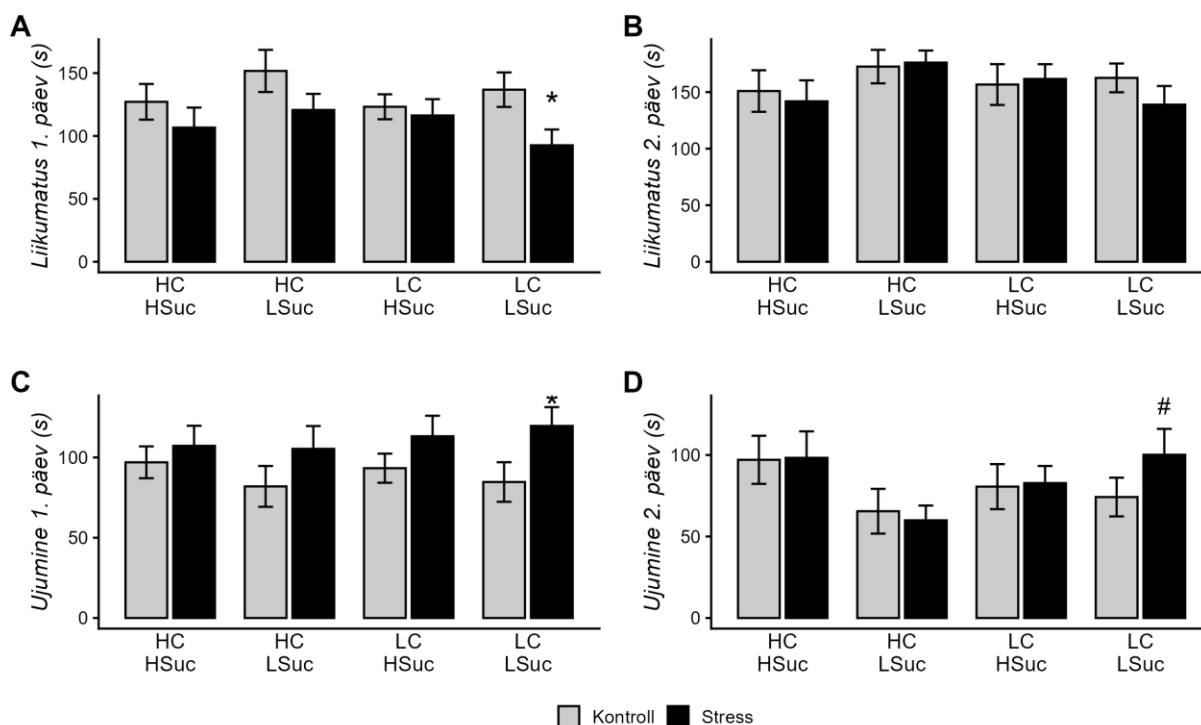
Märkus. \* $p < 0,05$  võrreldes vastav kontrollrühm; # $p < 0,05$  võrreldes vastav HC

Sundujumiskatses esines stressi peamõju esimese päeva immobiilsuses ( $Stress, F(1; 100) = 7,10$ ;  $p = 0,009$ ; Joonis 6A), kus LC-LSuc-stress loomad püsisid liikumatuna vähem vastavast kontrollrühmast ( $p = 0,023$ ), kuid teise päeva immobiilsuses stressi mõju kadus (Joonis 6B). Stressi peamõju kerkis esile ka esimese päeva ujumisel ( $Stress F(1; 100) = 6,96$ ;  $p = 0,010$ ; Joonis 6C), kus LC-LSuc stressrühma rotid ujusid oluliselt kauem kontrollrühma rottidest ( $p = 0,038$ ), ning teisel päeval oli oluline interaktsioon ( $Suhkrufenotüüp \times USV\text{-fenotüüp}, F(1; 100) = 4,49$ ;  $p = 0,037$ ; Joonis 6D), kus LC-LSuc-stress loomad ujusid kauem LC-HSuc-stress

loomadest ( $p = 0,044$ ). Kummalgi päeval eraldivõetuna gruppidevahelisi erinevusi rabelemises ei esinenud.

## Joonis 6

### Liikumatus ja ujumine sundujumiskatses



Märkus. \* $p < 0,05$  võrreldes vastav kontrollrühm; # $p < 0,05$  võrreldes vastav HC

## Geeniekspressioon hüpotalamuses

Uurisime hüpotalamuses mitme RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleeriva ensüümi ning stressiga seotud *Bdnf* ja *Crf1r* geeni ekspressiooni. Korrelatsioonanalüüs (Tabel 2) näitas ootuspäraseid paarikaupa astakseoseid kirjutajate vahel (*Mettl3-Mettl14*  $\rho = 0,77$ ) ning kustutajate vahel (*Fto-Alkbh5*  $\rho = 0,65$ ). Tugevalt korreleerusid ka kustutaja *Alkbh5* ja mõlemad kirjutajad ( $\rho = 0,48-0,65$ ), kuid *Fto* ei korreleerunud *Mettl3*-ga. *Bdnf* ekspressioon korreleerus kõikide ensüümidega peale *Fto*. *Crf1r* korreleerus positiivselt *Mettl3* ning negatiivselt mõlema kustutajaga.

**Tabel 2**

*Uuritud geenide suhteliste ekspressioonide Spearmani astakorrelatsioonid*

Muutuja	N	M	SD	1	2	3	4	5	6
1. <i>Mettl3</i>	106	0	2,11	—					
2. <i>Mettl14</i>	98	-0,12	2,16	0,77***	—				
3. <i>Alkbh5</i>	95	-0,71	2,21	0,48***	0,65***	—			
4. <i>Fto</i>	80	-1,62	2,07	0,03	0,37**	0,65***	—		
5. <i>Crflr</i>	103	0,37	2,53	0,40***	0,09	-0,28**	-0,46***	—	
6. <i>Bdnf</i>	105	0,03	1,72	0,71***	0,56***	0,60***	-0,01	0,36***	—

*Märkus.* M ja SD on esitatud log<sub>2</sub>-skaalal. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

Korrelatsioonidest lähtuvalt koostasime kuus moderatsioonimudelit, hindamaks *Bdnf*-i (*Mettl3*, *Mettl14*, *Alkbh5*) ja *Crflr*-i (*Mettl3*, *Alkbh5*, *Fto*) seoste moderatsiooni stressi, suhkruarbitamise ning 50-kHz USV fenotüüpide kaudu. Kuuest mudelist neljal oli mudeli üldine sobivus statistiliselt oluline (Tabel 3), kuid stressirühma ega fenotüüpidega olulisi interaktsioone ei esinenud (kõik p > 0,05). Tulemused viitavad, et uuritud fenotüübid ega KMS ei modereerinud RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleerivate ensüümide ning *Bdnf*-i ja *Crflr*-i vahelisi seoseid.

**Tabel 3**

*Moderatsioonimudelid Bdnf-i ja Crflr-i ning m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleerivate ensüümide vahel*

Sihtgeen	Ensüüm	F	df	p	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
<i>Bdnf</i>	<i>Mettl3</i>	6,54	(15; 88)	< 0,001	0,45
	<i>Mettl14</i>	2,73	(15; 81)	0,002	0,21
	<i>Alkbh5</i>	2,12	(15; 77)	0,017	0,15
<i>Crflr</i>	<i>Mettl3</i>	1,77	(15; 86)	0,052	0,10
	<i>Alkbh5</i>	1,13	(15; 75)	0,346	0,02
	<i>Fto</i>	3,31	(15; 60)	< 0,001	0,32

*Märkus.* Korrigeeritud determinatsioonikordaja (R<sup>2</sup><sub>adj</sub>).

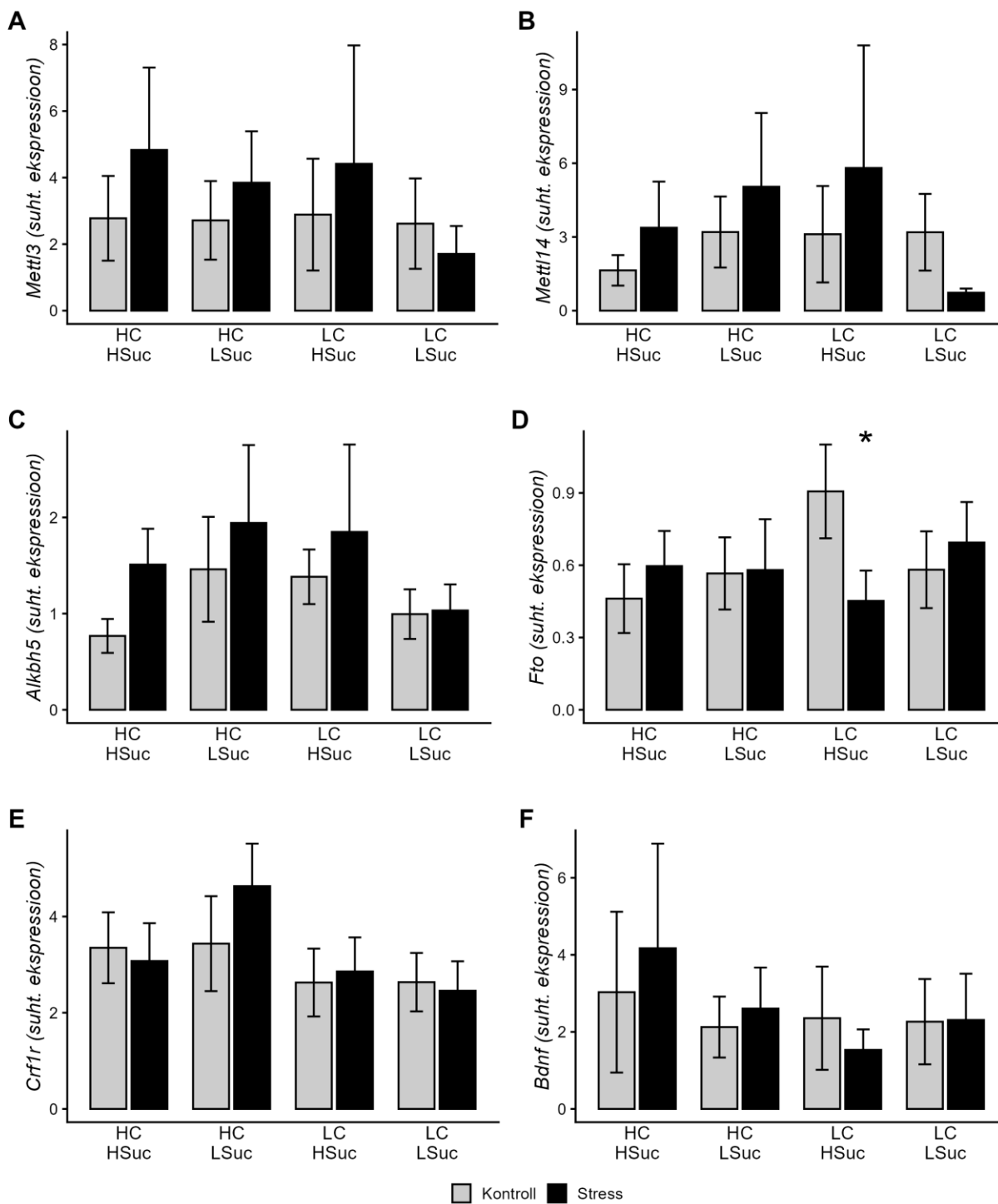
Nii *Crfl* retseptori (Joonis 7E) kui ka *Bdnf*-i (Joonis 7F) ekspressioonis ei esinenud suure isenditevahelise varieeruvuse tõttu olulisi erinevusi gruppide vahel. Statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud ka m<sup>6</sup>A kirjutajate *Mettl3* ja *Mettl14* ega kustutaja *Alkbh5* mRNA tasemetes, kuid

ühise joonena on nende ekspressioonimustrites aimatav trend kõrgema suhtelise ekspressiooni suunas stressirühmades, välja arvatud LC-LSuc rottidel, kelle stressi- ja kontrollrühmades oli ekspressioon pigem madalam (vt Joonis 7A-C).

Esialgne ANOVA mudel m<sup>6</sup>A-demetülaasi *Fto* suhtelisest ekspressioonist näitas olulist interaktsiooni, kuid mudeli jäägid ei olnud normaaljaotuslikud. Seetõttu arvutati dispersioonanalüüs permutatsioonipõhiselt. Tulemus viitas jätkuvalt olulisele interaktsioonile (*Stress* × *Suhkrufenotüüp* × *USV-fenotüüp*  $F(1;72) = 3,86$ ;  $p = 0,030$ ; Joonis 7D). *Post-hoc* testid näitasid statistiliselt olulist stressijärgset langust LC-HSuc-stress rühma tasemes võrreldes LC-HSuc-kontrolliga ( $p = 0,047$ ) ning napilt läveülest erinevust HC-HSuc ja LC-HSuc kontrollrühmade vahel ( $p = 0,060$ ).

## Joonis 7

## Uuritud geenide suhtelised mRNA ekspressioonid



Märkus. Andmed esitatud kujul keskmine $\pm$ SE. \*p < 0,05 vs vastav kontrollrühm.

## Arutelu

Mõistmaks epitranskriptomiliste muutuste rolli psühhopatoloogias, uurisime RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleerivate ensüümide mRNA ekspressiooni kroonilise muutliku stressi järgselt. Käesolevas töös uuriti esmakordselt stressi mõju m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleerivate ensüümide ekspressioonile *rattus norvegicus* hüpotalamuses. Lähtusime kahest peamisest eesmärgist. Esiteks, kirjeldasime pikaajalise stressi mõju *Mettl3*, *Mettl14*, *Fto* ja *Alkbh5* ekspressioonile lähtuvalt rottidele omastest kaitse- ning haavatavusfaktoritest. Teiseks, kirjeldasime nende seost *Bdnf*-i ja *Crflr-i* ekspressiooni ning rottide käitumisega. Uurimus arendas senist kirjandust epitranskriptomika ja stressi seostes, allutades rotte kroonilisele muutlikule stressile ning analüüsid muutusi individuaalsete erinevuste kontekstis kahes püsiomaduses. Peamiste tulemustena leidsime stress × suhkrufenotüüp × USV-fenotüüp interaktsiooni *Fto* suhtelises ekspressioonis ning korrelatsioonimustrid RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleerivate ensüümide ning stressiga seotud geenide ekspressioonide vahel, mis ei olnud vahendatud stressist ega ka rottide püsiomadustest. Järgnevalt arutleme neid seoseid individuaalsete erinevuste ning psühhopatoloogia bioloogiliste mehhanismide kontekstis.

Korduva muutliku stressi režiim õnnestus ning stressrühma loomadel tekkis suhkruarbitamise langusena mõõdetud anhedoonia. Sellega seonduvalt oli vere glükoositaseme langus märgatavam HSuc stressiloomadel. HPA-telje üliaktiivsuse markerina neerupealiste hüpertroofiat erinevalt varasematest katsetest ei täheldatud (nt. Vares et al., 2025), kuid LC-LSuc stressirühmas esines oluline tüümuse atroofia, mis võib tuleneda glükokortikoidide mõjust ning kirjanduse põhjal viidata stressi ja kõrgeenenud põletikuliste protsesside interaktsioonile (Cohen, 1992; Zunszain et al., 2011).

Käitumiskatsete tulemused ei olnud üksüheselt tõlgendatavad. Kui mõnes testis näitasid stressrühma loomad rohkem ärevus- ja vältimiskäitumist, nagu avarvälja katses, kus stressile eksponeeritud loomad vältisid välja keskosa rohkem kui kontrollrühm ning eelistasid hoida enam seinte lähedusse, siis teised katsed viitasid kõrgeenenud aktiveeritusele või pidurdamatusele. Uudiskastis näitasid suurimat aktiveeritust LC-HSuc stressrühma loomad, kes koos sama fenotüübi kontrollrühma ja LC-LSuc stressrühmaga kippusid stressijärgsel testimisel uudistama enam kui esimesel korral. Nullpuuris näitasid stressrühma loomad vähem ettevaatlikku uudistamist varjestatud neljandike seinte kattest ning veetsid kontrollrühma loomadest enam aega seinteta neljandikes. Sarnaselt varasemale katsele plusspuuriga, oli mõju eriti märgatav HC-

HSuc-stress rühmas (Vares et al., 2025). Ka sundujumiskatses oli stressrühm kontrollist lühemat aega immobiilne esimesel, kuid, tähelepanuväärselt, mitte teisel päeval. Kas tulemustest võib välja lugeda stressi anksiolüütilist mõju või on tegemist mõne muu kognitiivse nähtusega? Esiteks, sarnast paradoksaalset käitumist on täheldatud lisaks kroonilisele stressile ka näiteks *Locus Coeruleuse* (Häidkind et al., 2003) või 5-HT (Harro et al., 2001) närviprojektsioonide kahjustusega rottides. Teiseks, on LC-stress rotid ka mitmetes varasemates katsetes näidanud oluliselt kõrgemat aktivatsiooni uudiskastis (Mällo et al., 2007, 2009). Kolmandaks, võivad stressijärgselt olla loomad muutunud mitteadaptiivselt impulsiivsemaks või reaktiivsemaks testimisele (Harro, 2002). Seega võivad käitumiskatsed peegeldada mitte niivõrd stressi anksiogeenset mõju, kui stressi poolt esile kutsutud konteksti- ja fenotüübipõhist reorganiseeritust.

Kuigi stressi peamõju *Mettl3*, *Mettl14* ja *Alkbh5* ekspressioonile ei olnud statistiliselt oluline, oli see trendina kõigis fenotüüpides peale LC-LSuc visuaalselt aimatav. Mainitud ensüümide ekspressioonitasemed olid samuti omavahel tugevalt korreleeritud, samas kui *Fto* ekspresseerus *Mettl3*-st iseseisvalt ja korreleerus *Mettl14*-ga vaid mõõdukalt. *Fto* suurem eraldiseisvus teiste ensüümide ekspressioonist võib tuleneda selle mitmekesisemast rollist nii stressi- kui metaboolsete protsesside integreerimisel. Hüpotalamuse tuumad erinevad funktsionaalsetelt rollidelt märkimisväärselt, vastutades muuhulgas nii stressreaktsiooni kui isu reguleerimise eest (Pop et al., 2018), ning *Fto* ekspressioon võib nende tuumade vahel oluliselt varieeruda. Sellega kooskõlas puudus *Fto* ja *Bdnf*-i vahel korrelatsioon, ehkki varasemalt on leitud hüpotalamusest mõõdetud BDNF-i valgu taseme seoseid ülekaalulisusega (Macedo et al., 2015). Terve hüpotalamuse homogenaadist mõõdetuna võivad tuumaspetsiifilised ekspressioonimustrid olla tasandatud, mistõttu vajaks *Fto* ja *Bdnf*-i seos uurimist tuumade tasemel. *Bdnf*-i ekspressioon korreleerus kirjutajate ning *Alkbh5*-ga, kuid erinevalt leidudest hippokampuses (Li et al., 2017; Spychala & Rütther, 2019) ei varieerunud ekspressiooni tase ega korrelatsioonid stressi või fenotüüpide põhiselt. Samas oli ka *Crf1r* ekspressiooni tase positiivses korrelatsioonis kirjutaja *Mettl3* ning kustutajatega, milles võib peituda edasiuurimist vajav seos m<sup>6</sup>A metülatsiooni rollist *Crf1r* mRNA stabiliseerimisel rottides.

Ainsa statistiliselt olulise erinevusena suhtelises ekspressioonis leitud langus *Fto* LC-HSuc-stressrühmas võrreldes kontrollrühmaga on kooskõlas varasemate leidudega, kus stressi ja depressioonilaadsed seisundid seostuvad madalama *Fto* ekspressiooniga hippokampuses ja VTA-

s (Liu et al., 2021; Wu et al., 2021). Huvitava tulemusena oli LC-HSuc-stress *Fto* suhteline ekspressioon kõigist rühmadest madalaim, samas kui LC-HSuc-kontrolli ekspressioon oli rühmadest kõrgeim. Varasemalt on eraldiseisvalt näidatud madala positiivse afektiivsusega rottide (Mällo et al., 2009) ja kõrge suhkrutarbimisega ehk „hedonistlike“ rottide (Kanarik et al., 2011) haavatavust stressile ning nende kombineerimisel leidsid Vares jt. (2025) kõige selgemaid KMS-järgseid muutuseid just LC-HSuc rottidel. Arvestades hüpotalamuse kesket rolli HPA-telje reguleerimises, võime oletada, et tulemus ei peegelda mitte ainult stressiga seotud langust, vaid ka haavatavaima fenotüübi kõrge *Fto* baastaseme kadumist stressiga kohanedes. Samasuguse mõju puudumine teiste ensüümide ekspressioonis võib osaliselt tulla madalast katseloomade arvust, kuid viidata ka m<sup>6</sup>A aparatuuri ebaühtlasele adapteerumisele kroonilise stressiga, sarnaselt akuutse stressiga (Engel et al., 2018).

Katse tulemuste võrdlemist teiste uuringutega piirab madalam ärevuskäitumiste baastase, kuna katseloomade kōdistamine emast võõrutamise järgselt vähendab täiskasvanud loomades ärevust (LaFollette et al., 2017; Mällo et al., 2007) ning tekitab neis positiivse kallutatuse määramatuse ees (Rygula et al., 2012). *Fto* väiksem valimi suurus (n = 80) ebaõnnestunud qPCR reaktsioonide tõttu vähendas statistilist jõudlust ja tulemuste üldistatavust. Samuti ei kasutatud statistilisel analüüsimisel korrektsioone perekondliku veamäära vähendamiseks, kuna uuring oli kompleksse eksploratiivse disainiga, mistõttu vajavad tulemused replitseerimist tulevastes kõrgema statistilise võimsusega katsetes.

Loomudelite käsitlemine rottide individuaalsete erinevuste tasemel aitab meil täpsemalt mõista psühhopatoloogia bioloogilisi mehhanisme. Käesolev uuring demonstreeris rottide positiivse afekti ning suhkrutarbimise omaduste võimalusi stressi käitumuslike ja neurokeemiliste mõjude seletamisel. Me leidsime olulise kroonilise stressi järgse languse hüpotalamuse *Fto* suhtelises ekspressioonis haavatavates, madala positiivse afektiivsuse ning kõrge hedoonilise reaktsiooniga rottides. Samuti viitas *Crf1r* korrelatsioonimuster võimalikule seosele RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooniga, kuid hüpotalamuse *Crf1r* ja *Bdnf*-i ekspressioonid ei näidanud stressi- ega fenotüübipõhiseid erinevusi. Senised uuringud m<sup>6</sup>A epitranskriptomika ja stressi seostest on keskendunud eelkõige lühiajalistele stressoritele, mille tagajärjel tekkivad muutused globaalses metüleerituses ja seotud ensüümide ekspressioonis on suured, kuid mööduvad. Lähenemaks m<sup>6</sup>A rolli mõistmisele psühhiaatrilistes häiretes, mis on heterogeensed ning pikaajalised protsessid, näitab käesolev uuring, et neljanädalase anhedoonilise mõju

saavutanud stressirežiimi järgselt ei erine rotid hüpotalamuse *Mettl3*, *Mettl14* ja *Alkbh5* suhtelise ekspressiooni tasemelt ning *Fto* ekspressiooni tase muutub vaid haavatavamates loomades. Tulevased uuringud saaksid analüüsida fenotüübispetsiifilisi muutusi m<sup>6</sup>A metülatsiooni moduleerivate ensüümide ekspressioonis hüpotalamuse tuumades. Eraldi vääriks käsitlemist RNA m<sup>6</sup>A metülatsiooni epitranskriptomiliste mehhanismide roll *Crf1r*-i reguleerimises hüpotalamuse paraventriculaartuumas ja hüpofüüsis.

### Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajat, Jaanus Harrot, ning Margus Kanarikku, Karita Laugust, Marcella Laura Polverinot, Rein Urmas Murakat ja Simona Raagi nende juhendamise, mõtete, tagasiside või koostöö eest.

### Viidatud kirjandus

- Aguilera, G., & Liu, Y. (2012). The molecular physiology of CRH neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(1), 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.08.002>
- Albers, R. W., & Price, D. L. (2011). *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. Academic Press.
- Anthropic. (2026). *Claude Sonnet 4.6; Claude Opus 4.6* [Keelemudel]. <https://claude.ai/new>
- Cohen, J. J. (1992). Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Seminars in Immunology*, 4(6), 363–369.
- Consensus. (2026). *Consensus AI* [Tehisaru-põhine otsingumootor]. <https://consensus.app/search/>
- de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Engel, M., Eggert, C., Kaplick, P. M., Eder, M., Röh, S., Tietze, L., Namendorf, C., Arloth, J., Weber, P., Rex-Haffner, M., Geula, S., Jakovcevski, M., Hanna, J. H., Leshkowitz, D., Uhr, M., Wotjak, C. T., Schmidt, M. V., Deussing, J. M., Binder, E. B., & Chen, A. (2018). The Role of m<sup>6</sup>A/m-RNA Methylation in Stress Response Regulation. *Neuron*, 99(2), 389-403.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.009>
- Feldman, R. S., Meyer, J. S., & Quenzer, L. F. (1997). *Principles of neuropsychopharmacology*. Sinauer Associates.

- Ferrari, F., & Villa, R. F. (2017). The Neurobiology of Depression: An Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. *Molecular Neurobiology*, *54*(7), 4847–4865. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0032-y>
- Häidkind, R., Eller, M., Harro, M., Kask, A., Rincken, A., Oreland, L., & Harro, J. (2003). Effects of partial locus coeruleus denervation and chronic mild stress on behaviour and monoamine neurochemistry in the rat. *European Neuropsychopharmacology*, *13*(1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(02\)00076-7](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(02)00076-7)
- Harro, J. (2002). Long-term partial 5-HT depletion: Interference of anxiety and impulsivity? *Psychopharmacology*, *164*(4), 433–434. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1265-1>
- Harro, J., Tõnissaar, M., Eller, M., Kask, A., & Oreland, L. (2001). Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: Effects on behavior and monoamine neurochemistry. *Brain Research*, *899*(1), 227–239. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02256-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02256-9)
- Holsboer, F., & Ising, M. (2008). Central CRH system in depression and anxiety—Evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology, Stress Hormone Actions in Brain, in Health and Disease*, *583*(2), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.032>
- Kanarik, M., Althoa, A., Matrov, D., Kõiv, K., Sharp, T., Panksepp, J., & Harro, J. (2011). Brain responses to chronic social defeat stress: Effects on regional oxidative metabolism as a function of a hedonic trait, and gene expression in susceptible and resilient rats. *European Neuropsychopharmacology, NewMood (New Molecules for Mood Disorders)*, *21*(1), 92–107. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.06.015>
- Kanarik, M., Liiver, K., Norden, M., Teino, I., Org, T., Laugus, K., Shimmo, R., Karelson, M., Saarma, M., & Harro, J. (2025). RNA m6A methyltransferase activator affects anxiety-related behaviours, monoamines and striatal gene expression in the rat. *Acta Neuropsychiatrica*, *37*(e52). <https://doi.org/10.1017/neu.2024.36>
- Keller, J., Gomez, R., Williams, G., Lembke, A., Lazzeroni, L., Murphy, G. M., & Schatzberg, A. F. (2017). HPA axis in major depression: Cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular Psychiatry*, *22*(4), 527–536. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.120>

- Kõiv, K., Vares, M., Kroon, C., Metelitsa, M., Tiitsaar, K., Laugus, K., Jaako, K., & Harro, J. (2019). Effect of chronic variable stress on sensitization to amphetamine in high and low sucrose-consuming rats. *Journal of Psychopharmacology*, *33*(12), 1512–1523. <https://doi.org/10.1177/0269881119856000>
- LaFollette, M. R., O’Haire, M. E., Cloutier, S., Blankenberger, W. B., & Gaskill, B. N. (2017). Rat tickling: A systematic review of applications, outcomes, and moderators. *PLOS ONE*, *12*(4), e0175320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175320>
- Li, L., Zang, L., Zhang, F., Chen, J., Shen, H., Shu, L., Liang, F., Feng, C., Chen, D., Tao, H., Xu, T., Li, Z., Kang, Y., Wu, H., Tang, L., Zhang, P., Jin, P., Shu, Q., & Li, X. (2017). Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis. *Human Molecular Genetics*, *26*(13), 2398–2411. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx128>
- Liu, S., Xiu, J., Zhu, C., Meng, K., Li, C., Han, R., Du, T., Li, L., Xu, L., Liu, R., Zhu, W., Shen, Y., & Xu, Q. (2021). Fat mass and obesity-associated protein regulates RNA methylation associated with depression-like behavior in mice. *Nature Communications*, *12*(1), 6937. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27044-7>
- 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>
- Livneh, I., Moshitch-Moshkovitz, S., Amariglio, N., Rechavi, G., & Dominissini, D. (2020). The m6A epitranscriptome: Transcriptome plasticity in brain development and function. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(1), 36–51. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0244-z>
- Luo, X., Li, H., Liang, J., Zhao, Q., Xie, Y., Ren, J., & Zuo, Z. (2021). RMVar: An updated database of functional variants involved in RNA modifications. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D1405–D1412. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa811>
- Macedo, I. C., Rozisky, J. R., Oliveira, C., Oliveira, C. M., Laste, G., Nonose, Y., Santos, V. S., Marques, P. R., Ribeiro, M. F. M., Caumo, W., & Torres, I. L. S. (2015). Chronic stress associated with hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats. *Neuropeptides*, *51*, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.01.002>
- Mällo, T., Berggård, C., Eller, M., Damberg, M., Orelund, L., & Harro, J. (2004). Effect of long-term blockade of CRF1 receptors on exploratory behaviour, monoamines and

- transcription factor AP-2. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 77(4), 855–865.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.02.016>
- Mällo, T., Matrov, D., Herm, L., Kõiv, K., Eller, M., Rincken, A., & Harro, J. (2007). Tickling-induced 50-kHz ultrasonic vocalization is individually stable and predicts behaviour in tests of anxiety and depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 184(1), 57–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.06.015>
- Mällo, T., Matrov, D., Kõiv, K., & Harro, J. (2009). Effect of chronic stress on behavior and cerebral oxidative metabolism in rats with high or low positive affect. *Neuroscience*, 164(3), 963–974. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.041>
- Matrov, D., Kõiv, K., Kanarik, M., Peet, K., Raudkivi, K., & Harro, J. (2016). Middle-range exploratory activity in adult rats suggests higher resilience to chronic social defeat. *Acta Neuropsychiatrica*, 28(3), 125–140. <https://doi.org/10.1017/neu.2015.64>
- Matto, V., Harro, J., & Allikmets, L. (1997). The Effects of Cholecystokinin A and B Receptor Antagonists on Exploratory Behaviour in the Elevated zero-maze in Rat. *Neuropharmacology*, 36(3), 389–396. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00011-7)
- Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2017). Rethinking m6A Readers, Writers, and Erasers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(Volume 33, 2017), 319–342.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060758>
- Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and Near Stop Codons. *Cell*, 149(7), 1635–1646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>
- Naert, G., Ixart, G., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L., & Givalois, L. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.006>
- Nibuya, M., Takahashi, M., Russell, D. S., & Duman, R. S. (1999). Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 267(2), 81–84.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00335-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00335-3)
- Niknazar, S., Nahavandi, A., Peyvandi, A. A., Peyvandi, H., Akhtari, A. S., & Karimi, M. (2016). Comparison of the Adulthood Chronic Stress Effect on Hippocampal BDNF

- Signaling in Male and Female Rats. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 4026–4033.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9345-5>
- Oerum, S., Meynier, V., Catala, M., & Tisné, C. (2021). A comprehensive review of m6A/m6Am RNA methyltransferase structures. *Nucleic Acids Research*, 49(13), 7239–7255. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab378>
- Otter, M. H., Matto, V., Sõukand, R., Skrebuhhova, T., Allikmets, L., & Harro, J. (1997). Characterization of rat exploratory behavior using the exploration box test. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 19(10), 683–691.
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2000). 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: Effects of social housing and genetic variables. *Behavioural Brain Research*, 115(1), 25–38. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00238-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00238-2)
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2003). “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiology & Behavior, A Tribute to Paul MacLean: The Neurobiological Relevance of Social Behavior*, 79(3), 533–547. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00159-8)
- Pop, M. G., Crivii, C., & Opincariu, I. (2018). Anatomy and Function of the Hypothalamus. In *Hypothalamus in Health and Diseases*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.80728>
- Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, 47(4), 379–391. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8)
- Rage, F., Givalois, L., Marmigère, F., Tapia-Arancibia, L., & Arancibia, S. (2002). Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience*, 112(2), 309–318. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00072-6)
- Rygula, R., Pluta, H., & Popik, P. (2012). Laughing Rats Are Optimistic. *PLOS ONE*, 7(12), e51959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051959>
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., & Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116(1), 56–64. <https://doi.org/10.1007/BF02244871>

- Shi, H., Zhang, X., Weng, Y.-L., Lu, Z., Liu, Y., Lu, Z., Li, J., Hao, P., Zhang, Y., Zhang, F., Wu, Y., Delgado, J. Y., Su, Y., Patel, M. J., Cao, X., Shen, B., Huang, X., Ming, G., Zhuang, X., ... Zhou, T. (2018). m6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature*, *563*(7730), 249–253. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0666-1>
- Sosanya, N. M., Garza, T. H., Stacey, W., Crimmins, S. L., Christy, R. J., & Cheppudira, B. P. (2019). Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in chronic intermittent stress-induced enhanced mechanical allodynia in a rat model of burn pain. *BMC Neuroscience*, *20*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0500-1>
- Spierling, S. R., & Zorrilla, E. P. (2017). Don't stress about CRF: Assessing the translational failures of CRF1 antagonists. *Psychopharmacology*, *234*(9), 1467–1481. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4556-2>
- Spychala, A., & Rüther, U. (2019). FTO affects hippocampal function by regulation of BDNF processing. *PLOS ONE*, *14*(2), e0211937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211937>
- Sundarakrishnan, A., & Clarke, P. B. S. (2022). Stable long-term individual differences in 50-kHz vocalization rate and call subtype prevalence in adult male rats: Comparisons with sucrose preference. *PLOS ONE*, *17*(10), e0276743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276743>
- Tafet, G., & Nemeroff, C. (2020). Pharmacological Treatment of Anxiety Disorders: The Role of the HPA Axis. *Frontiers in Psychiatry*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00443>
- Taliaz, D., Loya, A., Gersner, R., Haramati, S., Chen, A., & Zangen, A. (2011). Resilience to Chronic Stress Is Mediated by Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neuroscience*, *31*(12), 4475–4483. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5725-10.2011>
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., & Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: Focus on hypothalamic function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *25*(2), 77–107. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2004.04.001>
- Tönissaar, M., Herm, L., Rinken, A., & Harro, J. (2006). Individual differences in sucrose intake and preference in the rat: Circadian variation and association with dopamine D2 receptor function in striatum and nucleus accumbens. *Neuroscience Letters*, *403*(1), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.023>

- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, *53*(4), 865–871.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4)
- Vares, M., Kanarik, M., Kõiv, K., Vares, M., Anja, K., Metelitsa, M., Laugus, K., Tigro, H., Korulu, S., Shimmo, R., & Harro, J. (2025). Vulnerability to chronic stress in male rats: Additive effect of low positive affectivity and high hedonic response as measured by sucrose intake. *Behavioural Brain Research*, *494*, 115749.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2025.115749>
- Walters, B. J., Mercaldo, V., Gillon, C. J., Yip, M., Neve, R. L., Boyce, F. M., Frankland, P. W., & Josselyn, S. A. (2017). The Role of The RNA Demethylase FTO (Fat Mass and Obesity-Associated) and mRNA Methylation in Hippocampal Memory Formation. *Neuropsychopharmacology*, *42*(7), 1502–1510. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.31>
- Widagdo, J., Zhao, Q.-Y., Kempen, M.-J., Tan, M. C., Ratnu, V. S., Wei, W., Leighton, L., Spadaro, P. A., Edson, J., Anggono, V., & Bredy, T. W. (2016). Experience-Dependent Accumulation of N6-Methyladenosine in the Prefrontal Cortex Is Associated with Memory Processes in Mice. *Journal of Neuroscience*, *36*(25), 6771–6777.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4053-15.2016>
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, *134*(4), 319–329.  
<https://doi.org/10.1007/s002130050456>
- Wu, P.-F., Han, Q.-Q., Chen, F.-F., Shen, T.-T., Li, Y.-H., Cao, Y., Chen, J.-G., & Wang, F. (2021). Erasing m6A-dependent transcription signature of stress-sensitive genes triggers antidepressant actions. *Neurobiology of Stress*, *15*, 100390.  
<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100390>
- Zaccara, S., Ries, R. J., & Jaffrey, S. R. (2019). Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(10), 608–624.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0168-5>
- Zhang, Y., Gu, F., Chen, J., & Dong, W. (2010). Chronic antidepressant administration alleviates frontal and hippocampal BDNF deficits in CUMS rat. *Brain Research*, *1366*, 141–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.095>

- Zhang, Z., Wang, M., Xie, D., Huang, Z., Zhang, L., Yang, Y., Ma, D., Li, W., Zhou, Q., Yang, Y.-G., & Wang, X.-J. (2018). METTL3-mediated N6-methyladenosine mRNA modification enhances long-term memory consolidation. *Cell Research*, 28(11), 1050–1061. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0092-9>
- Zorn, J. V., Schür, R. R., Boks, M. P., Kahn, R. S., Joëls, M., & Vinkers, C. H. (2017). Cortisol stress reactivity across psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 77, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.036>
- Zunszain, P. A., Anacker, C., Cattaneo, A., Carvalho, L. A., & Pariante, C. M. (2011). Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(3), 722–729. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.04.011>

## Lisad

## Lisa 1. mRNA ekspressiooni uurimiseks kasutatud praimerite järjestused

Geen	Praimeri järjestus
<i>Mettl3</i>	F: ATGTGCAGCCCAACTGGATT R: CTGTGCTTAAACCGGGCAAC
<i>Mettl14</i>	F: GGAGGAGGGTTTGCGTTTTG R: CACTCTCAGCTCCCAACTGC
<i>Fto</i>	F: GCAGAGATCCCGATACGTGG R: CTGTGAGCCAGCCAAAACAC
<i>Alkbh5</i>	F: TTCCAGTTCAAGCCCATCCG R: CATCAGCAGCATAACCCACTGA
<i>Crflr</i>	F: CTGGTCGGAAGTTGGTTATAGG R: GATGAGAAGCAGTCTGGATGAG
<i>Bdnf</i>	F: GGCCCAACGAAGAAAACCAT R: AGCATCACCCGGGAAGTGT

Märkus. F ehk *forward* (5' → 3') praimer; R ehk *reverse* (3' → 5') praimer.

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Raiko Marrandi \_\_\_\_\_ ,  
(*autori nimi*)

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

Individuaalsete erinevuste roll kroonilise stressi mõjus RNA m<sup>6</sup>A \_\_\_\_\_ ,  
epitranskriptomilisele regulatsioonile roti hüpotalamuses  
\_\_\_\_\_  
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_ Jaanus Harro \_\_\_\_\_ ,  
(*juhendaja nimi*)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, 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.

Raiko Marrandi

**11.05.2026**