

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2905.

DÓRA FANNI

Neuromorfológia és sejtbiológia
című program

Programvezető: Dr. Alpár Alán, egyetemi tanár

Témavezetők: Dr. Palkovits Miklós, professor emeritus
Dr. Dobolyi Árpád, tudományos tanácsadó

A dorsomediális prefrontális kéreg transzkriptom szintű vizsgálata öngyilkos személyekben

Doktori értekezés

Dóra Fanni

Semmelweis Egyetem
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Palkovits Miklós, az MTA rendes tagja, professor emeritus
Dr. Dobolyi Árpád, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók: Dr. Alpár Donát, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Hrabovszky Erik, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, az MTA doktora, egyetemi tanár
Tagok: Dr. Réthelyi Miklós, az MTA doktora, professor emeritus
Dr. Dénes Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2023

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	11
1.1. A depresszió és öngyilkosság előfordulása a társadalomban	11
1.2. A depresszió és öngyilkosság neuroanatómiai alapjai.....	12
1.3. Az emberi agy nyugalmi állapot hálózatai	14
1.4. A default mode hálózat	17
1.5. A dorsomediális prefrontális kéreg.....	18
1.5.1. A DMPFC topológiája és kapcsolati rendszere	18
1.5.2. A DMPFC funkciója.....	19
1.5.3. A DMPFC pszichiátriai betegségekben betöltött szerepe	20
1.6. A depresszió és öngyilkosság neurobiológiai hátterének rövid ismertetője... 22	
1.6.1. A neurotranszmitter rendszerek	22
1.6.2. Endokrinológiai vonatkozások depresszióban.....	23
1.6.3. Depresszió és a Diabetes mellitus	24
1.6.3. Az öngyilkosság neurobiológiája	26
1.7. Nagy áteresztőképességű módszerek	29
1.7.1. Nagy áteresztőképességű génexpressziós vizsgálatok depresszió és öngyilkosság vonatkozásában	30
2. CÉLKITŰZÉSEK	32
3. MÓDSZEREK	33
3.1. Humán agyszöveti minták forrása	33
3.2. Az agyszövet feldolgozása	33
3.3. RNS szekvenálás és adatfeldolgozás	37
3.4. Az RNS szekvenálási adatok bioinformatikai értékelése.....	38
3.4.1. A DEG-ek funkcionális annotációja.....	39

3.4.2. A DEG-ek fehérje-fehérje interakciós hálózatának a vizsgálata	39
3.4.3. Gén ko-expressziós hálózat analízis	40
4.4.4. Betegség-asszociált elemzés	41
3.5. Az RNS szekvenálási adatok összevetése az Allen Human Brain Atlas adatbázis adataival	41
3.6. A változó gének expressziójának validálása valós idejű kvantitatív PCR technikával	42
3.7. A NECAB2 hisztológiai vizsgálata	44
3.7.1. In situ hibridizáció	44
3.7.2. Immunhisztológiai vizsgálatok.....	45
3.8. A GLP-1R expressziójának vizsgálata 2-es típusú cukorbetegekben	46
3.8.1. A hipotalamusz paraventriculáris magjának preparációja.....	46
3.8.2. RNS extrakció és RT-qPCR analízis	49
3.8.3. Fehérje extrakció	49
3.8.4. Western blot analízis	49
3.9. Mikroszkópia	50
3.10. Statisztikai analízis	50
4. EREDMÉNYEK.....	51
4.1. Öngyilkos személyek DMPFC mintáinak transzkriptomikai vizsgálata RNS szekvenálással	51
4.1.1. A minta adatok elemzése	51
4.1.2. Az öngyilkos és kontroll csoportok közötti DEG-ek azonosítása	52
4.1.3. A DEG-ek funkcionális annotációja és osztályozása	56
4.2. A DEG-ek közötti fehérjekapcsolat vizsgálata és a hub fehérjék azonosítása	61
4.3. A DEG-ek ko-expressziós hálózat analízise és a hálózaton belüli hub gének azonosítása.....	62

4.4. Depresszióban érintett gének azonosítása	65
4.5. A szignifikánsan változó gének expressziójának validálása	69
4.6. A NECAB2 eloszlása a DMPFC-ben	71
4.7. GLP-1R expresszió T2DM betegek posztmortem PVN mintáiban	74
5. MEGBESZÉLÉS	76
5.1. Következtetések az egyes DEG-ek alapján.....	76
5.2. A biológiai útvonalelemzés funkcionális vonatkozásai	78
5.3. A DEG-ek fehérje interakciós hálózatának elemzése.....	80
5.4. A DMPFC génexpressziójának funkcionális klaszteranalízise	82
5.5. A depresszióhoz és társbetegségekhez tartozó gének bemutatása	84
5.6. A NECAB2 potenciális funkciói	85
5.7. Emelkedett GLP-1R expresszió a T2DM betegek PVN régiójában	86
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	88
7. ÖSSZEFOGLALÁS	90
8. SUMMARY	91
9. IRODALOMJEGYZÉK	92
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	130
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	132

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-HT1A	szerotonin 1A receptor
ACC	elülső cinguláris kéreg
ACTB	béta-aktin
ACTL6B	aktin-szerű fehérje 6B
AHBA	Allen Human Brain Atlas
ALDH1L1	acetaldehid dehidrogenáz 1
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propánsav
AQP1	aquaporin 1
ATP	adenozin-trifoszfát
ATP1A2	Na ⁺ /K ⁺ transzport ATP-áz alfa 2 alegység
ATP4A	Na ⁺ /K ⁺ transzport ATP-áz alfa alegység
BCA	bicinchoninsav
BCL2	B-sejtes lymphoma apoptózis regulátor 2
BDNF	agyi eredetű neurotrofikus faktor
BOLD	vér oxigénszint-függő
BGI	Pekingi Genomikai Intézet
CACNA1G	feszültség-függő kalciumcsatorna alegység alfa1 G
CACNG8	feszültség-függő kalciumcsatorna segédegység gamma 8
CALY	calcyon neuron specifikus vezikuláris protein
CARTPT	kokain és amfetamin-regulált transzkript prepropeptid
CCD	töltés-csatolt eszköz (charge coupled device)
CCK	kolecisztokinin
CD31	differenciálódási klaszter 31 molekula
CD44	differenciálódási klaszter 44 molekula
CEN	central executive control hálózat
COL24A1	24-es típusú kollagén alfa 1 lánc
CRH	kortikotropinfelszabadító hormon
CRHR1	kortikotropinfelszabadító hormon receptor 1
CSF3	kolónia-stimuláló faktor 3
CTD	Összehasonlító Toxikogenomikai Adatbázis
DAB	diamino-benzidin

DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DB	adatbázis (database)
DEG	differenciáltan expresszázó gén
DLPFC	dorsolaterális prefrontális kéreg
DMN	default mode hálózat
DMPFC	dorsomediális prefrontális kéreg
DNA-seq	DNS alapú szekvenálás
DNS	dezoxiribonukleinsav
DRN	dorsális raphe mag
DTI	diffúziós tenzor képalkotás
EAAT	excitatórikus aminosav transzporter
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ERBB2	Erb-B2 receptor tirozin kináz 2
ETT-TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács - Tudományos és Kutatásértékelési Bizottság
FASTQ	nem leképezett (unmapped) olvasási adatok
FC	egy adott gén expresszió változása a csoportok között (fold change)
FDR	hamis felfedezési arány
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
fMRI	funkcionális mágneses rezonanciavizsgálat
FN1	fibronektin 1
FTL	ferritin könnyű lánc
GABA	gamma-amino-vajsav
GABRD	gamma-amino-vajsav A típusú receptor delta alegység
GAD	Genetic Association Database
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GAT	GABA transzporter
GFAP	gliális fibrilláris savas protein
GJA1	gap junction protein alfa 1
GLUL	glutamát-ammónia ligáz
GLP-1	glukagon-szerű petid-1
GLP-1R	glukagon-szerű petid-1 receptor

GO	gén ontológia (Gene Ontology)
GR- α	glukokortikoid receptor alfa
GRIK1	kainát-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 1
GRIK2	kainát-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 2
GRIK3	kainát-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 3
GRIN1	NMDA-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 1
GRIN2A	NMDA-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 2A
GRIN2C	NMDA-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 2C
GRM2	metabotróp glutamát receptor 2
GRM7	metabotróp glutamát receptor 7
GWAS	genomszintű asszociációanalízis (genome wide association study)
HPA	hipotalamusz-hipofízis-mellékvese
HBTB	Humán Agyszövet Bank
hg19	humán referencia genom 19
HKG	háztartási gén (housekeeping gene)
IBA1	ionizált kalcium-kötő adaptor molekula-1
IDT	Integrated DNA Technologies
IL1R2	interleukin 1 receptor 2-es típus
IL6	interleukin-6
iPSC	indukált pluripotens őssejt
iTBS	intermittáló théta burst stimuláció/ingerlés
ITGB1	integrin beta alegység 1
ITGB4	integrin beta alegység 4
ITPKB	inozitol-triszfoszfát 3-kináz B
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LAMP5	lizoszóma-asszociált membránlikoprotein 5
LDHA	laktát dehidrogenáz A
log2FC	az expresszió változás (fold change) kettes alapú logaritmus
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
Mb	megabázis
MCC	maximális klikk-centralitás (Maximal Clique Centrality)
MDD	súlyos depressziós zavar

MGD	Egér Genom Adatbázis
mGluR	metabotróp glutamát receptor
mGluR1	metabotróp glutamát receptor 1
mGluR5	metabotróp glutamát receptor 5
ML-GWAS	multilókusz genomszintű asszociációanalízis
MNI	Montreali Neurológiai Intézet
MPFC	mediális prefrontális kéreg
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
mRNS	hírvivő RNS
MSI2	Musashi-2
MTL	mediális temporális lebeny
NECAB2	neuronális kalcium-kötő fehérje 2
NECAB2-ir	NECAB2-immunreaktív
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NOTCH1	neurogén lókuszt notch homológ fehérje 1
NRGN	neurogranin
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man adatbázis
P2RX2	purinerg receptor P2X 2
p75NTR	p75 neurotrofikus receptor
PAX6	páros dobozfehérje 6
PBS	foszfát puffer
PCC	hátsó cinguláris kéreg
PCR	polimeráz-láncreakció
PECAM1	vérlemezkék és endothel sejt adhéziós molekula 1
PI3K-Akt	foszfatidil-inozitol 3 kináz - protein kináz B
PMI	posztmortem idő
PPI	fehérje-fehérje interakció
PRKCH	protein kináz C éta
PROC	protein C, az Va és VIIIa alvadási faktorok inaktivátora
PVN	hipotalamusz paraventriculáris magja
REST	random episodic silent thinking
RGD	Patkány Genom Adatbázis

RNA-seq	RNS alapú szekvenálás
RNS	ribonukleinsav
RSFC	nyugalmi állapotú funkcionális konnektivitás
RS-fMRI	nyugalmi funkcionális mágneses rezonancia képalkotás
RSN	nyugalmi állapot hálózat (Resting State Network)
rTMS	repetitív transzkraniális mágneses stimuláció/ingerlés
RT-qPCR	valós idejű kvantitatív PCR
S100	S100 kalcium-kötő fehérje
S100B	S100 kalcium-kötő fehérje B
SCN3B	feszültség-függő nátrium csatorna béta 3 alegység
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SERPINA3	serpin A család 3 tag
SERPINF1	serpin F család 1 tag
SERT	szerootonin transzporter
SLCO2B1	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1
SN	salience hálózat
SNTA1	alpha-1-syntrophin
SOCS3	citokin jelátvitel szuppresszor 3
SORBS3	SH3 domént tartalmazó adaptor fehérje (vinexin)
SSRI	szelektív szerotonin visszavétel gátló
SST	szomatosztatin
STAT3	jelátvivő és transzkripció aktivátor 3
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
SYT5	synaptotagmin 5
T2DM	2-es típusú diabetes mellitus; 2-es típusú cukorbetegség
TARP- γ 8	transzmembrán AMPA receptor szabályozó fehérje gamma 8
TBS	théta burst stimuláció/ingerlés
TDCS	transzkraniális direkt egyenáram ingerlés
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF	tumor nekrozis faktor
TPH2	triptofán-hidroxiláz 2
TRPM2	transziens receptor potenciál melastatin 2

UTP	uridin-trifoszfát
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
VMPFC	ventromediális prefrontális kéreg
ZAN	zonadhezin

1. BEVEZETÉS

1.1. A depresszió és öngyilkosság előfordulása a társadalomban

A súlyos depressziós zavar (MDD) világszerte az egyik legelterjedtebb megváltozott munkaképességgel járó betegség, amely magas morbiditással és korai mortalitással társul (1). Az MDD-t egyszeri vagy visszatérő súlyos depressziós epizódok jellemzik, amelyek során gyakori tünet a nyomott hangulat, az örömtelenség, a motiváció és érdeklődés elvesztése, vegetatív tünetek (pl. táplálkozás és a cirkadián ritmus megváltozása, fáradtság), valamint a kognitív és végrehajtó funkciók jelentős zavara (2). Az öngyilkos magatartás nagyobb valószínűséggel fordul elő depressziós zavarban, mint más pszichiátriai rendellenességben (3). Az öngyilkosság jelentős egészségügyi probléma. Becslések szerint évente több mint 700 000 ember hal meg öngyilkosság elkövetésében, emellett 2019-ben az öngyilkosság globálisan a halálesetek 1,3%-át tette ki (4). Az MDD az öngyilkosságban elhunyt személyek közel 87%-át érinti (5). A befejezett öngyilkosságon kívül az öngyilkosság egyéb aspektusai is gyakoriak MDD-ben. Például egy közelmúltbéli metaanalízis által végzett vizsgálat alapján az öngyilkos gondolatok prevalenciája 42–63%, míg az öngyilkos kísérletek prevalenciája 20–28% volt MDD-ben (6). Az öngyilkosságra hajlamos pszichés betegek 43-50%-a szenved depresszióban, valamint az öngyilkosságot már megkísérlet és az akciót túlélő személyek 46%-a ismét meg újabb öngyilkossági kísérletet. Az ismételt öngyilkossági kísérleteket főleg nők követik el, illetve a főbb kockázati tényezők között szerepel a nem megfelelő orvosi ellátás, az érzelmi vagy kognitív hanyatlás, 1 éven belül kialakult öngyilkos magatartás, stresszhelyzetek és stresszes események, rossz impulzuskontroll és alkohollal való visszaélés (7). Az öngyilkosság összetett jelenség, amelyben számos tényező szerepet játszhat. Az öngyilkos viselkedés nem biológiai kockázati tényezőinek prediktív értéke korlátozott (8), továbbá megbízható biomarkert még nem sikerült azonosítani. Az öngyilkosság hatékony megelőzése érdekében jobban meg kell értenünk azokat a funkcionális anatómiai és molekuláris biológiai mechanizmusokat, amelyek növelik az öngyilkos viselkedések kockázatát. Megoldásként szolgálhat a megváltozott struktúrájú és aktivitású agyi régiók azonosítása, továbbá ezen agyi régiókban bekövetkező neurobiológiai és molekuláris biológiai változások elemzése.

1.2. A depresszió és öngyilkosság neuroanatómai alapjai

Jelenleg a depresszió súlyosságának és az öngyilkosság rizikójának diagnosztikai felmérése pszichiátriai interjúkon és a betegek önbevallásán alapul, azonban a jobb és pontosabb diagnosztikához szükség van egy objektív és számszerűsíthető eljárásra. Az emberi agy széleskörű funkcionális és strukturális jellemzésére gyakran használt képalkotó eljárás a mágneses rezonancia képalkotás (MRI). Az MRI képalkotás fejlődésének köszönhetően ma már komplex funkcionális MRI (fMRI) és diffúziós tenzor képalkotó (DTI) vizsgálatok lehetségesek, melyek segítségével nem csak vizsgálhatók a szürke- és fehérállományi struktúrák, de pontosan lokalizálhatóak a különböző agyi hálózatok, meghatározhatók a hálózatokon belüli főbb agyi központok, illetve lekövethetők a régiók közötti idegpályák is. Ezek a képalkotó eljárások lehetővé teszik a mentális betegségekben érintett agyi hálózatoknak a korábbiaknál sokkal informatívabb és pontosabb leírását.

Az elmúlt évtizedben exponenciálisan nőtt a depresszióval és öngyilkos viselkedéssel kapcsolatos strukturális, funkcionális és metabolikus agyi folyamatok MRI technikákkal történő vizsgálatok száma (9, 10). Korábbi képalkotó vizsgálatok igazolták, hogy az MDD alapvető tüneteit, illetve az öngyilkos kogníciót olyan agyi áramkörök megváltozott működése okozza, amelyek főként az érzelmek szabályozásában és a kognitív kontrollban játszanak szerepet (11-13). Így igazolást nyert, hogy az ezekért a funkciókért felelős kérgi és szubkortikális régiók strukturális változása, beleértve a bazális ganglionokat (14), az amigdalát és az orbitofrontális kérget (15), a dorsolaterális és dorsomediális prefrontális kérget, illetve az insulát (16, 17), a fronto-limbikus hálózatot (18) és a temporális-parietális-limbikus rendszert (19), hozzájárulnak az öngyilkos viselkedéshez. További, funkcionális képalkotó vizsgálatok kimutatták, hogy a mediális és laterális prefrontális kéregben fellépő funkcionális aktivitás változásai összefüggésben állnak az öngyilkosság elkövetésével (20, 21). Számos tanulmány bizonyította, hogy a végrehajtó funkciók, a figyelem, a memória és a döntéshozatal károsodása is megfigyelhető az öngyilkosságot tervező és megkísérzők körében (22-25). Ezeknek a kognitív funkcióknak, különösen a viselkedést szabályozó és a végrehajtó folyamatokat irányító funkcióknak a zavara, a környezeti információk pontatlan értelmezéséhez, visszakereséséhez és reagálásához vezethetnek, ami önmagukról és a

jövőképükről alkotott rugalmatlan, pesszimista gondolkodásmódot eredményez, amely magasabb öngyilkossági kockázatot jelenthet.

Az elmúlt években egyre nagyobb szerepet töltött be a nyugalmi vagy más néven *resting state* fMRI (RS-fMRI), amellyel képesek vagyunk az agy nyugalmi állapotú belső aktivitásának vizsgálatára. A RS-fMRI vizsgálat során az alany nem hajt végre semmilyen kognitív vagy motoros feladatot, épp ellenkezőleg, mozdulatlanul, csendben fekszik a mérés során. A RS-fMRI elemzések kimutatták, hogy egészséges alanyoknál a nyugalmi fázisban kimutatható agyi aktivitás mértéke csökken bizonyos agyterületeken kognitív feladatok végzése során. Korábbi tanulmányok, melyek az öngyilkos viselkedéshez kapcsolódó nyugalmi hálózatokat vizsgálták, összefüggést találtak több agyterület megváltozott funkcionális kapcsolata és az öngyilkos gondolatok között. Ezek a funkcionális hálózatok magukba foglaltak olyan frontális régiókat, mint az elülső cinguláris kéreg (ACC), a felső frontális és orbitofrontális gyrusok, de olyan különböző régiókat is, mint az occipitális és felső parietális gyrus, a talamusz és a caudatus mag (26, 27). Más hasonló, az öngyilkos gondolatokkal rendelkező és nem rendelkező depressziós betegeket összehasonlító tanulmányok megnövekedett nyugalmi állapotú funkcionális konnektivitásról (RSFC) számoltak be a bilaterális hippokampusz (26), az amigdala illetve a precuneus (28), valamint a bal habenula és a bal kisagy (29) között. Ezzel szemben csökkent RSFC-t figyeltek meg az öngyilkos gondolatokkal rendelkező betegek jobb elülső cinguláris kérgé, a jobb középső temporális pólusa és az orbitofrontális kérgé (30) között, valamint hasonlóan csökkent konnektivitás volt megfigyelhető a jobb habenula, jobb precuneus és a bal oldali alsó frontális gyrus (29) között az öngyilkos gondolatokkal nem rendelkező depressziós betegek illetve kontroll személyekhez képest. Eddig csak kevés tanulmány vizsgálta a nyugalmi agyi aktivitást öngyilkosságot megkísérlet depressziós betegekben. A közelmúltban Northoff és mtsai. (31) által végzett nyugalmi fMRI vizsgálatok megmutatták, hogy a depressziós tünetek a nyugalmi agyi aktivitás térbeli és időbeli zavaraiaként értelmezhetők. Ezen javaslat alapján a depressziós betegek ruminációit és fokozott önfókuszát a nyugalmi aktivitás kóros térbeli szerveződésekként, míg az anhedóniát és az öngyilkos gondolatokat a múlton való fokozott összpontosítással a nyugalmi aktivitás időbeli zavaraként képzelik el. Az öngyilkos gondolatok neurális korrelációinak vizsgálata céljából fMRI-t végeztek olyan depressziós betegeknél, akik nemrégiben öngyilkosságot kíséreltek meg. A lelki fájdalom és az

öngyilkos akció felelevenítése során a frontális kérgi területek deaktiválódását, míg csak az öngyilkosság felidézése során a mediális prefrontális kéreg (MPFC), az ACC és a hippokampusz idegi aktivitásának növekedését figyelték meg (12). Felvetették, hogy az öngyilkos cselekvés állapotfüggő jelenség, amelyet egy adott inger válthat ki, és a traumatikus állapot minőségétől is függ. Más RS-fMRI alapú vizsgálatok szinkron változást mutattak ki az öngyilkosságot elkövetők frontális, temporális és parietális területeinek belső aktivitásában (32, 33). Egy következő tanulmány arról számolt be, hogy az öngyilkosságot megkísérlő depressziósokban emelkedett funkcionális kapcsolat volt megfigyelhető az amigdala, az insula, az orbitofronális kéreg és a középső temporális gyrus területén (34).

Ezek az eredmények mind arra utalnak, hogy az öngyilkos viselkedés az agyban széles körű strukturális és funkcionális változásokkal jár. Bár a képalkotó vizsgálatok több agyterületet érintő funkcionális elváltozásokat tártak fel, még nem ismert, hogy az MDD-ben az öngyilkosság hogyan kapcsolódik a különböző agyi hálózatokhoz és azok kölcsönhatásaihoz.

1.3. Az emberi agy nyugalmi állapot hálózatai

Az elmúlt évtized meghatározó jelentőségű volt az emberi agy ideghálózatainak topográfiai megismerésében. Ebben döntő szerepet játszott az fMRI és a traktográfiai technikák óriási fejlődése, amely vizsgálatok először nyújtottak képet az élő emberi agyról. Ezáltal számos korábban ismert agypálya nyert finomabb topográfiai bizonyítást, ugyanakkor új dimenziók is nyíltak az agy kutatásában.

Az emberi agy összetett dinamikus rendszer. A funkcionális agyi hálózatok nyugalomban is dinamikusan, jól szervezett módon rendeződnek újra, annak érdekében, hogy a régiók között hatékony kommunikációs rendszert tudjanak létrehozni. A mindennapi élet információinak belső feldolgozása a mentális tevékenység során, külső ingerek hiányában megy végbe. Ebben a tudatállapotban a gondolatok szabad asszociációját végezzük, amely magában foglalja az emlékezést és a jövő tervezését is. Külső ingerek hiányában az elme gördülékenyen ugrik egyik gondolatról a másikra. Ezt a spontán agyi tevékenységet *random episodic silent thinking*-nek (REST) is nevezik (35). Agyi képalkotó vizsgálatok során kimutatták, hogy a REST alatt az agy spontán módon újraszerveződik és önszervező rugalmas rendszerként működik, amely

folyamatok során főleg asszociációs kérgi régiók aktiválódnak (35). Az agy mentális rugalmassága azon a képességen alapul, hogy a különféle hálózatok nyugalmi állapotban képesek dinamikusan változni, újra konfigurálódni az alternatív tér-időbeli állapotok között, amely a kognitív rugalmasság és tanulás bizonyos korrelátumainak tekinthetők.

Kezdetben a fMRI technikát két állapot aktivitásának, például feladathoz kötött vagy feladat nélküli állapotok mérésére használták (36). Azonban az utóbbi évtizedben a feladatspecifikus agyműködés vizsgálata mellett egyre inkább előtérbe került az emberi agy nyugalmi állapotban történő funkcionális vizsgálata, amely segít megérteni a nyugalmi állapotban egymással átfedő kapcsolatokat (37). A neuronok nem rendelkeznek saját energiatároló tulajdonságokkal. Amikor az idegsejtek intenzíven működnek, a nagymértékű glükóz felhasználás mellett a véráramlás is nagymértékben megemelkedik az aktiválódás helyén. Így a neuronális aktiválódás által kiváltott hemodinamikai válasz több energiával látja el a neuronokat. Ennek a folyamatnak az eredménye a mágneses rezonancia képalkotással kimutatható oxihemoglobin és dezoxihemoglobin relatív szintjének változása azok mágneses tulajdonságaik alapján. Ezt a technikát vér oxigénszint-függő (BOLD) kontrasztos képalkotásnak nevezzük, amelyet gyakran alkalmaznak a feladathoz kötött fMRI mérések során. Ilyenkor a beteg különböző feladatokat hajt végre, amelyek során az adott funkcióért felelős agyi régiók aktiválódnak, aminek a következménye a megnövekedett vérátáramlás. RS-fMRI mérések során az agy spontán alacsony frekvenciájú fluktuációi (0,01-0,1 Hz) mérhetők (37), amelyek időben szinkronizáltan jelentkeznek, ha az alany nem végez semmilyen kognitív vagy motoros feladatot (37, 38). Ilyen agyi aktivitás akkor is mérhető, amikor az alany csukott szemmel éber állapotban pihen (39). A nyugalmi állapotban, illetve specifikus feladatvégzés alatt aktív agyi területeken mért jelek közötti korrelációk meghatározásával képet kaphatunk az agy bizonyos részeinek összeköttetéseiről, a kapcsolatok erősségéről és szerepéről, így lehetőségünk adódik a különböző agyi hálózatok feltérképezésére. A nyugalmi állapotban aktív és átfedő hálózatokat nyugalmi állapot vagy *resting state hálózatoknak* (RSN) is nevezik (40). A leggyakrabban vizsgált nyugalmi állapot hálózatok közé tartozik az alapértelmezett módú vagy *default mode hálózat* (DMN), a kiemelő vagy *saliency hálózat* (SN) és a központi végrehajtó vagy *central executive control hálózat* (CEN) (41, 42). A nyugalmi állapot hálózatok kiemelkedő szerepet játszanak az érzelmi és kognitív folyamatokban is. A DMN-t először „feladat negatív” agyhálózatként azonosították (43),

amely akkor aktív, amikor az egyén belső mentális állapotára összpontosít (önéletrajzi emlékek előhívása, a jövő elképzelése, mások nézőpontjának megértése) (44). Míg a DMN-hoz társított régiók valóban deaktiválódnak számos célirányos feladat során, ma már több funkció is ismert, amely megnövekedett DMN aktivitáshoz társítható. Például ez a hálózat erősen aktiválódik a memória, a tudatelmélet (*theory of mind*), az önreferenciális, illetve a szociális kogníciót érintő feladatok során (45-48), ami arra utal, hogy az önmagunk és mások megismerését végrehajtó idegrendszeri elemek jellemzően nyugalmi állapotban aktívak (49). A DMN magában foglalja a MPFC-t, a hátulsó cinguláris kéreg (PCC), a precuneust és a mediális temporális lebeny (MTL) egyes részeit (50), amelyek deaktiválódnak a kognitív feladatok végrehajtása során (49, 51, 52). A CEN részt vesz a munkamemória működtetésében, valamint a célirányos viselkedés során kiemelkedő szereppel bír a döntéshozatalban és a problémamegoldásban (41, 53). Míg a DMN nyugalmi ébrenléti állapot alatt aktív, a CEN kognitív és érzelmileg kihívást jelentő tevékenységek során aktívabb. A CEN kulcs régiói közé tartozik a dorsolaterális prefrontális kéreg (DLPFC) és a laterális hátsó parietális kéreg (54). A laterális hátsó parietális kéreg szenzoros és interoceptív információkat integrál, míg a DLPFC a munkamemória szabályozásában vesz részt, illetve mérlegeli a lehetséges viselkedési válaszokat. A döntéshozatalban való részvétel mellett a CEN részt vesz az érzelmi folyamatok szabályozásában is (41). Kimutatták, hogy a SN fontos szerepet játszik a külső és belső ingerek feldolgozásában, például az autonóm és érzelmi információk monitorozásában, azonosításában és kiemelésében, valamint a kognitív funkciók szabályozásában, továbbá a külső és belső ingerekre történő összpontosítás érdekében átkapcsoló szereppel bír a DMN és CEN között (42, 53, 55). A hálózat kulcs régiója az elülső insula, mely kritikus fontosságú a viselkedés szempontjából releváns ingerek észlelésében, valamint az ingerekre adott válasz koordinálásában. A hálózat további elemei a dorsális ACC, az amigdala és a temporális pólus (54). Érdekes módon a DMN, CEN és SN közötti funkcionális konnektivitás megváltozása szerepet játszik számos pszichiátriai és neurológiai rendellenesség kialakulásában, például figyelemhiányos hiperaktivitás-zavarban (56), pszichózisban (57) és depresszióban (58, 59), emellett több tanulmány is kimutatta, hogy a hálózatok közötti abnormális konnektivitás hatással van az öregedésre, így részt vesz a neurodegeneratív kórképek, pl. az Alzheimer-kór megjelenésében is (60).

1.4. A default mode hálózat

A fMRI vizsgálatok kimutatták, hogy a figyelemigényes feladatok során inaktív agykérgi régiók egy csoportja nyugalomban időbeli korrelációt mutat (61, 62). Azonban több végrehajtó funkció, mint például a döntéshozatal, a tervezés vagy a munkamemória során is megfigyelhető a RSN-ok aktív működése (63). Az egyik ilyen széles körben tanulmányozott nyugalmi állapotú hálózat a DMN, amely aktívabb pihenés közben, azonban deaktiválódik a figyelem igényes és exekutív-motoros feladatok végrehajtása során (44, 64). A DMN számos, az agykéreg mediális felszínén elhelyezkedő és magas szintű kognitív funkciót ellátó területet foglal magában, mint például a MPFC, a PCC, a precuneus és a MTL (64). A DMN-t gyakran három alhálózatra osztják, egy dorsomediális prefrontális alhálózatra, amelynek központi régiója a dorsomediális prefrontális kéreg (DMPFC), egy *core* alhálózatra, amelynek két főbb központi régiója van, a PCC és a precuneus, valamint egy MTL alhálózatra (48, 50, 65-67). Míg a DMN alhálózatok időbeli dinamikája hasonló, specifikus funkciójukat tekintve eltérnek egymástól (48, 50). A DMPFC és *core* alhálózatok inkább az önreferenciális információfeldolgozáshoz és az érzelem regulációhoz kapcsolódnak, amely részben a limbikus területekkel, például az amigdalával való erős kapcsolatuk révén valósul meg, míg a MTL alhálózat a tudat és az emlékezet feldolgozásában játszik szerepet, amelyet a hippocampális formációval való kapcsolatán keresztül valósít meg (48, 50, 65, 68, 69).

A DMN kezdeti felfedezése óta számos kutatás igyekezett tisztázni a hálózat pontos funkcióját. Leírták, hogy a DMN részt vesz a mentális folyamatok lebonyolításában, például a külső ingerek önmagunkra való vonatkoztatásában, beleértve a jelen és jövőképet (70), illetve a nézőpont kialakítását (71), az önvizsgálatot, önkontrollt (44, 71-73), az elkalandozást (65, 74) és a kreativitást (75). A disszociatív folyamatok, mint például az elkalandozás vagy az önreferenciális információfeldolgozás, többnyire a PCC-nek és a DMPFC-nek tulajdoníthatók, amelyek, mint fentebb is olvasható, a DMN kulcsfontosságú régióit alkotják (44, 49, 51). A DMN funkciójában bekövetkező abnormalitásokat számos neuropszichiátriai rendellenességgel hozták összefüggésbe (76), különösen a ruminációt, az MDD egyik fő tünetét, amely súlyossága a DMN aktiválódásának függvényében emelkedik depressziós betegekben (77). Azt is megfigyelték, hogy a DMN kulcsfontosságú régiói kevésbé aktívak a tapasztalt meditálók körében, amely a meditáció lehetséges antidepresszáns hatására is utal (78). A DMN

kimenete kapcsolódik a kortiko-striato-thalamo-kortikális körhöz, így a DMN összeköti a DMPFC-t és a precuneust a jutalom-asszociációs rendszerrel (79, 80). Irodalmi adatok alapján ismeretes, hogy a jutalom-asszociációs rendszer diszfunkciója hozzájárul a súlyos depresszió kialakulásához (29, 79, 81).

1.5. A dorsomediális prefrontális kéreg

1.5.1. A DMPFC topológiája és kapcsolati rendszere

A DMPFC a felső frontális gyrus mediális felületén, a ventromediális prefrontális kéreg (VMPFC) és a premotoros kéregtől elválasztó precentrális sulcus között található (lásd 1. ábra). A DMPFC a DMN egyik fő központi régiója (65, 82), amely erős funkcionális kapcsolatban áll a DMN többi régiójával, a precuneussal, az inferior parietális lebenyel (anguláris kéreg), a hátsó cinguláris/retrosplenialis kéreggel és a temporális lebeny mediális struktúráival (82, 83). A DMPFC-nek több afferens bemenete van, például direkt kapcsolatban áll a külvilágból érkező ingerek feldolgozását végző laterális prefrontális, orbitofrontális és ventromediális kérgi részekkel (84-86). A látási és részben hallási információk a fasciculus uncinatuson keresztül jutnak el az orbitofrontális, ventro- és dorsomediális kérgi részekbe (87-89). A VMPFC közvetlen kapcsolatban áll a ventro- és dorsolaterális prefrontális kéreggel (90, 91), ezáltal a prefrontális kéregbe érkező látási és hallási szignálok további emocionális és motivációs töltetet kapnak. A hallási és vizuális-térbeli tájékozódásból származó információk a *fasciculus longitudinalis superior* pályán keresztül a DLPFC-be kerülnek (92, 93), ahol a beérkező inputok további kognitív feldolgozása történik. Mind ezen külső ingerek közvetetten, feldolgozott formában jutnak el a DMPFC-be. A külső ingerek feldolgozása mellett a DMPFC részt vesz a zsigeri szenzoros jelek feldolgozásában is, amely információk az insulán és az ACC pars dorsálisán (paracinguláris kéreg) keresztül érkeznek a DMPFC-be (54, 94). A DMPFC a VMPFC-vel együttműködve részt vesz a munkamemória működtetésében, a megfordított tanulásban (*reversal learning*) és a jutalommal kapcsolatos döntéshozatalban (95, 96). Hasonlóan a DLPFC-hez, a szenzoros jelek feldolgozását követően a DMPFC végrehajtó motoros programokat készít, amelyet továbbít a szupplementer és preszupplementer motoros kérgi részekhez (97-99), ezáltal részt vesz a célirányos mozgás szabályozásában (100). A *core* DMN központi régiója a hátsó mediális parietális kéreg, amely magában foglalja a precuneust és a hátsó cinguláris

kérget (67, 68, 101, 102). A precuneus jelentős szerepet játszik a kognitív folyamatok individualizálásában, mint pl. a külső világból érkező jelekre adott reflexiók, önvizsgálat, öntudat, kreativitás és intelligencia (102-106). A *central executive control hálózat* szabályozó régiójaként (107) egyedi kapcsolattal rendelkezik a végrehajtó funkciókat szervező és irányító frontoparietális régiókkal, mint pl. a DLPFC-vel, DMPFC-vel és a laterális inferior parietális kéreggel, mind nyugalomban, mind végrehajtó kontroll folyamatokat igénylő feladatok során (108-110). Mint ilyen, a precuneus központi régióként működik a funkcionálisan összekapcsolt CEN és DMN hálózatok között, ezáltal kiemelt szerepe van a célirányos megismerésben (111). A precuneus közvetlenül a szupplementer és preszupplementer motoros kéregbe vetül (69, 112, 113), így képes befolyásolni, akár le is állítja a motoros választ. Összességében a DMPFC funkcionális szerepét tekintve kiemelkedik a többi prefrontális régió közül, mivel a DMPFC-be érkező feldolgozott információk alapján képes felmérni és megfelelő program kialakításával reagálni az azonnali figyelmet igénylő helyzetekre.

1.5.2. A DMPFC funkciója

A prefrontális kéreg dorsomediális részének funkcionális szerepe különbözik a laterális felszín hasonló részeitől, mivel azok elsősorban a felismerő, feldolgozó és választ adó folyamatok elvégzésében játszanak szerepet, a DMPFC központi szerepe azonban a külvilágból érkező információk integrálásában teljesedik ki, ami első sorban egyéniségünk, gondolkodásunk, viselkedésünk és önértékelésünk alapja (114-116). A DMPFC egy olyan központi asszociációs régió, amely információs csatornaként működik a kognitív kontroll és az érzelmi folyamatokat irányító régiók között, ezáltal fontos szerepet játszik az érzelmi folyamatok generálásában és szabályozásában is (117). Kimutatták, hogy az érzelmi információk feldolgozása során a DMPFC erősebb aktivitást mutat, ha a résztvevők pozitív affektív töltettel rendelkező képet néznek a negatív affektív töltetű helyett (118), ezenkívül a DMPFC kulcsfontosságú a negatív érzelmek gátlásában is (119). A DMPFC nem csak a DMN, de a CEN központi régiója is, ezáltal számos kognitív funkcióban vesz részt, beleértve a figyelmet, a végrehajtó funkciókat, a munkamemóriát és a döntéshozatalt (44, 69, 120-123). Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a DMPFC részt vesz a kognitív-orientált mentalizációs folyamatokban is, mint pl. a szociális kogníció (124, 125), az önértékelés (114, 115, 126), a közelgő események kimenetelének megítélése és kiértékelése (127), más emberek preferenciájának becslése

(128), az érzelmi reakciók megítélése és kiértékelése (49), valamint a morális ítékezés (129, 130). A DMPFC szerves részét képezi a tudatelméletnek (*theory of mind*) (131, 132), amelyet úgy határoznak meg, mint az a képesség, amely során saját mentális állapotunkon kívül képesek vagyunk megérteni mások mentális állapotát, például mások hitét, szándékát, vágyait, gondolatait és nézőpontját. Mivel mások mentális állapota kevésbé kiszámítható, mint önmagunké, így a mások gondolataiban történő olvasás eredendően bizonytalan folyamat. A DMPFC központi szerepet játszik abban, hogy a megfigyelés útján és bejövő információk alapján folyamatosan értékelje a többi ember pillanatnyi mentális állapotát, vagyis személyes interakciók és viselkedési jelek segítségével a DMPFC által pontosabban tudunk olvasni mások gondolataiban (131-133). A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a DMPFC aktiválása növeli az önzetlen magatartást (134). Ez a megállapítás összhangban van azzal az elmélettel, amely szerint a DMPFC olyan mechanizmusokat irányít, amelyek a nézőpont kialakítására szolgálnak. Egy másik friss közlemény szerint a DMPFC aktivációja támogatja a célirányos mentális erőfeszítések iránti motivációt (135).

1.5.3. A DMPFC pszichiátriai betegségekben betöltött szerepe

Több nyugalmi állapotú funkcionális konnektivitást elemző vizsgálat számolt már be a DMN-on belüli és más hálózatok közötti abnormális kapcsolatról depressziós betegekben (136). Depressziós betegekben a DMPFC fokozott funkcionális konnektivitást mutatott a szenzomotoros, vizuális és SN hálózatok régióival (137). Ezenkívül a depresszió egyik fő tünete, az anhedónia megnövekedett konnektivitással társult a kétoldali nucleus accumbens területei és a jobb DMPFC területei között (138). A szülés utáni depresszióban szenvedő betegekben a DMPFC fokozott funkcionális kapcsolatot mutatott a DMN többi régióival (139). Ezenkívül arról is beszámoltak, hogy a kétoldali DMPFC intrinzik funkcionális konnektivitása negatívan korrelál a depresszió klinikai súlyosságával (140). A DMPFC funkcionális kapcsolata más agykérgi középvonali struktúrákkal (pl. PCC, precuneus), valamint temporális és parietális régiókkal fontos szerepet játszik az önreferenciális folyamatok működtetésében, a társadalmi megismerésben, az önéletrajzi emlékezésben és a jövőkép kialakításában (44, 70, 141-143). Egy korábbi nyugalmi aktivitást vizsgáló tanulmány beszámolója szerint a DMPFC és precuneus közötti emelkedett funkcionális konnektivitás pozitívan korrelált a depresszió súlyosságával (144). Bár a depresszió a leggyakoribb pszichiátriai

rendellenesség az öngyilkosságban elhunyt személyek körében (8, 145, 146), a mögöttes mechanizmusokban eltérések lehetnek. Egy tanulmány bizonyítékot talált arra, hogy a DMN-on belül a funkcionális konnektivitás erősségének különböző mintázatai jelennek meg az öngyilkosságot megkísérelt és öngyilkos viselkedéssel nem rendelkező depressziós felnőtt résztvevők között (147). Megfigyelték, hogy az öngyilkosságot megkísérelt depressziósokban a precuneus és DMPFC régiók abnormális funkcionális konnektivitása összefüggésbe hozható a vizsgált egyének közelmúltban elkövetett öngyilkossági kísérleteikkel (147). Így feltételezhető, hogy a DMPFC szerepe az öngyilkosságban az önreferenciális gondolkodásban betöltött kulcsszerepén alapul. Egy korábbi, kognitív és emocionális feladatokat alkalmazó funkcionális aktivációs vizsgálat során kimutatták, hogy az öngyilkosságot megkísérelt depressziós egyének körében a lelki fájdalom felelevenítése nem, de az öngyilkos akcióra történő emlékezés a DMPFC fokozott aktivációját mutatta (12). Egy másik fMRI vizsgálat szerint az öngyilkossággal nem járó önsebesítésben szenvedő serdülőkben a társadalmi kirekesztés neurális feldolgozása során kifejezett aktiváció volt mérhető a DMPFC-ben (148). Ezen eredmények alapján tehát feltételezhető, hogy affektív zavarban az öngyilkosság elkövetése, mint következmény, a DMN, azon belül is két régió, a DMPFC és a precuneus megváltozott integritásból adódik (149, 150).

A non-invazív neuromodulátoros technikák, mint a repetitív transzkraniális mágneses stimuláció (rTMS), a theta burst stimuláció (TBS) és a transzkraniális direkt egyenáram ingerlés (TDCS) ígéretes technikáknak bizonyulnak az affektív zavarok kezelésében. Közelmúltbéli kutatások a DMPFC-n történő rTMS-t sikerrel alkalmazták gyógyszeres kezelésre nem reagáló depressziós betegekben, így ez alapján joggal feltételezhető, hogy a DMPFC szerepet játszhat a depresszió patofiziológiájában (151, 152). Egy másik újonnan bevezetett kezelés, az intermittáló (facilitáló) TBS (iTBS) a rTMS-hoz hasonlóan biztonságos, tolerabilitással és hatékonysággal alkalmazható (153, 154). Az iTBS alkalmazása a DMPFC felett ugyancsak ígéretesnek bizonyult nyílt elrendezésű depressziós vizsgálatokban, azonban skizofrén betegekben nem váltott ki szignifikáns hatást (155). Ezenkívül a kétoldali DMPFC-n végzett rTMS hatékonyan csökkentette az öngyilkos készletést borderline személyiségzavarban (156). Egy kognitív viselkedésterápiát alkalmazó vizsgálat során kimutatták, hogy a más személyek perspektívája szerinti önreferens feldolgozás megnövelte a DMPFC aktivációját

depressziós betegekben, továbbá ehhez kapcsolódóan azt is megfigyelték, hogy a DMPFC aktivációja a depressziós tünetek és az önvizsgáló funkció javulásával járt (157). Hasonló eredményeket találtak egy farmakoterápia után végzett RS-fMRI vizsgálat során is (158).

1.6. A depresszió és öngyilkosság neurobiológiai hátterének rövid ismertetője

1.6.1. A neurotranszmitter rendszerek

Az elmúlt évtizedekben számos tanulmány vizsgálta a depressziós tünetek kialakulásához és a depresszió progressziójához hozzájáruló etiológiai és patofiziológiai tényezőket. Ezek a kutatási erőfeszítések jelentős betekintést nyújtottak a depresszió hátterében zajló folyamatokba, beleértve a gének szintjén történő változásokat, a neurotranszmitter és neuroendokrin rendszereket, az agy funkcionális és szerkezeti anatómiáját, valamint a kognitív rendellenességeket. Klinikai szempontból a depresszióval kapcsolatos legkiemelkedőbb neurobiológiai felfedezések a neurotranszmitter rendszerrel kapcsolatos neurokémiai rendellenességek, amelyek közül a monoaminok (szerotonin, noradrenalin és dopamin) kapták a legtöbb figyelmet. Az egyik korai elmélet, amely régóta elismert a depresszió biológiai hátterében, a monoamin elmélet, amely azt feltételezte, hogy a depresszió a szerotonin és a noradrenalin csökkent elérhetőségének eredménye a központi idegrendszerben (159). A szerotonin transzporter (SERT) a szerotoninszint elsődleges szabályozója az agyban, és kulcsfontosságú célpontja a széles körben használt antidepresszánsoknak, például a szelektív szerotonin visszavétel gátlóknak (SSRI). Bár kezdetben a monoaminerg funkció károsodásának vizsgálata technikai hiányosságok miatt meglehetősen korlátozott volt, ma már a továbbfejlesztett módszerek segítségével, pl. radioaktívan jelölt receptor ligandumokkal történő képalkotó vizsgálatokkal képesek vagyunk több információt begyűjteni (160). Így például kimutatható volt, hogy a depresszió a középgagyban és az amigdalában csökkent SERT kötődéssel (161), emelkedett monoamin oxidáz A szinttel (162), valamint szerotonin 1A receptor (5-HT1A) csökkenésével jár a frontális, temporális és limbikus régiókban (163).

Annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedekben a fő hangsúlyt a monoaminokra helyezték, egyre több bizonyíték áll rendelkezésre a depresszióhoz köthető egyéb neurotranszmitter rendszerek esetében, különösen a gamma-amino-vajsav (GABA) és

(164, 165) és glutamát rendszert illetően (166). Depressziós betegek plazmájában és agygerincvelői folyadékában a GABA csökkent szintjét találták (164). Ezenkívül a GABAerg interneuronok csökkent sűrűségéről is beszámoltak depressziós betegek prefrontális és occipitális kérgi régióiban (160, 167, 168). A glutamát fontos szerepet játszik a szinaptikus plaszticitásban és a jelátvitel modulálásában. Számos vizsgálat által igazolást nyert, hogy a perifériás és centrális glutamát szintjének változásai összefüggésbe hozható depresszióval (169, 170). Emellett a glutamáterg rendszer lehetséges szerepét depresszióban alátámasztják az NMDA (N-metil-D-aszpartát) antagonisták antidepresszáns hatásának preklinikai bizonyítékai is (171-174). Az egyik lehetséges patofiziológiai mechanizmus, amely összefüggésbe hozható a megváltozott GABA és glutamát neurotranszmitter rendszer abnormalitásával depresszióban, az asztrocita funkció károsodása. Az asztrociták biztosítják a glutamát és a GABA kiürülésének elsődleges eszközt az excitatorikus aminosav transzporterek (EAAT), illetve a GABA transzporterek (GAT) révén (175, 176), emellett kritikus szerepet játszanak a glutamát és a GABA metabolizmusában is. A preklinikai vizsgálatok eredményei azt is kimutatták, hogy az asztrocita glutamát felvételének blokkolása a prefrontális kéregben és az amigdala központi magjában anhedónia és szorongás kialakulásához vezet (177, 178). Ezen túlmenően depressziós egyéneket vizsgáló posztmortem és mágneses rezonancia képalkotó tanulmányokból származó eredmények bemutatták a glutamáttal kapcsolatos gének megváltozott expresszióját, a glutamát emelkedett szintjét, a glutamin/glutamát arány csökkenését számos olyan agyi régióban, amelyeket depressziós tünetekkel hoznak összefüggésbe (pl. a mediális prefrontális kéreg, dorsolaterális prefrontális kéreg, elülső cinguláris kéreg) (179-181).

1.6.2. Endokrinológiai vonatkozások depresszióban

A klinikusok régóta felfigyeltek arra, hogy a különféle endokrin betegségekben szenvedő betegeknél gyakran jelentkeznek depressziós tünetek (160). Ismert, hogy a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely számos hangulati és kognitív rendellenesség patofiziológiájában szerepet játszik. Neuroendokrin vizsgálatok kimutatták a HPA tengely túlműködését, illetve a perifériás és centrális glükokortikoid receptorok számának csökkenését súlyos depresszióban (160). Ezenkívül a depressziós rendellenességek gyakran társulnak társbetegségekkel (pl. diabetes mellitus, szív- és

érrendszeri betegségek) és olyan hosszú távú következményekkel járnak, mint például a hippocampusz térfogatcsökkenése és kognitív károsodások, melyek kapcsolatban állnak a megnövekedett hosszú távú glükokortikoid expozícióval (182). Ebben az összefüggésben érdekes az a megállapítás is, hogy a korai stresszes élethelyzetek potenciálisan a HPA tengely hiperaktivitását okozhatják, amely felnőttkorig is fennáll (183). Újabban kimutatták, hogy más endokrin rendszerek, például a vazopresszin, oxitocin vagy melatonin is szerepet játszanak a depressziós tünetek kialakulásában (160, 184, 185), azonban sem patofiziológiai szerepük, sem klinikai jelentőségük nem tisztázott részletesen.

1.6.3. Depresszió és a Diabetes mellitus

A depresszió kialakulását és kiújulását sokféle anyagcserezavarral hozták összefüggésbe, ideértve a hiperglikémiát, a diszlipidémiát és az inzulinrezisztenciát (186-188). A depresszió mellett számos más társbetegség megjelenhet, beleértve a 2-es típusú diabetes mellitust (T2DM) és az elhízást (189, 190). A depresszió és a cukorbetegség komorbid megjelenése gyakori, azonban e két kórállapot közötti kapcsolat még nem teljesen tisztázott. Mind a cukorbetegség, mind a depresszió igen elterjedtek, a nyugati világ két legnagyobb közegészségügyi problémájának tekinthetők. A glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) receptor agonisták a T2DM és az elhízás kezelésére elterjedten használt gyógyszerek egy csoportja. Érdekes módon a GLP-1 analógok ismertén pro-kognitív és neuroprotektív tulajdonságokkal is rendelkeznek (191-193), illetve moduláló hatást fejtenek ki az immun-, endokrin- és metabolikus folyamatokra a központi idegrendszerben (194, 195). A GLP-1 a belekben, illetve az agytörzsi régiókban szintetizálódó glükoregulációs hormon, amely az energia homeosztázis fenntartásában vesz részt, főként az inzulinszekréció serkentése és az étvágy szabályozása révén (196). Egy közelmúltban végzett tanulmány kimutatta, hogy a GLP-1 neurotróf hatással rendelkezik, és elősegíti a neurotróf folyamatokat az agyban (197). Ezen felül azt is kimutatták, hogy a GLP-1 orális adagolása csökkentheti a hiperglikémia okozta depresszió kockázatát T2DM betegeknél (198). A GLP-1 biológiai hatásait egy specifikus G-protein-kapcsolt receptorhoz, a GLP-1 receptorhoz (GLP-1R) kötve fejti ki, amely különböző típusú perifériás szövetben és a központi idegrendszerben expresszálódik (195). Mivel a GLP-1R agonisták lokalizált intrakraniális injekciója a hipotalamusz paraventriculáris magjába (PVN) nagymértékben csökkentette a táplálékfelvételt kísérleti

állatoknál, mint más injektált hipotalamikus régiókban, ezért a csökkent táplálékfelvétel és az ebből eredő testtömeg csökkenés a PVN-ben elsősorban a GLP-1R aktiválódásának tudható be (199-201). Egy korábbi tanulmány beszámolója szerint a GLP-1R nem csak az energiaegyensúly szabályozásért felelős agyi régiókban, hanem a hangulatszabályozásban érintett agyi régiókban is megtalálható, mint például az amigdalában, a hippokampuszban és a dorsális raphe magban (DRN) (202). Azt is megfigyelték, hogy a GLP-1 endogén ligandumokat termelő neuronok beidegzik az agytörzsi Raphe magokat (203). Egy másik tanulmány arról számolt be, hogy a GLP-1R agonista exendin-4 befolyásolja a dopaminrendszert, és csökkenti a táplálékkal kapcsolatos jutalmazási viselkedést patkányokban (204). A dopamin neurotranszmitterről kimutatták, hogy csökkenti a depresszióhoz hasonló viselkedéseket, például a szorongást rágsálókban (205-208). A GLP-1 a dopaminreceptor 2 jelátvitelén keresztül fokozhatja a dopamin forgalmát a striátumban és az amigdalában (207, 209). Ezenkívül a GLP-1R-ról kimutatták, hogy képes stimulálni más neurotranszmitterek, például a GABA, glutamát, szerotonin és dopamin depolarizáció által kiváltott felszabadulását a kéregben és a hippokampuszban (210). Más vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a liraglutid GLP-1R agonista antipszichotikus hatást fejt ki a pszichózis egérmodelljében (211). Ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a GLP-1 rendszer számos neurotranszmitter, köztük a szerotonin, dopamin, GABA és glutamát felszabadulását modulálja, amelyek szabályozzák a depresszióhoz hasonló viselkedést. A GLP-1 általi neurotranszmitter szekréció modulálása egy másik hatékony megoldás lehet a depresszió hatásainak enyhítésére. Korábbi tanulmányok azt is bemutatták, hogy a GLP-1 javíthatja a memóriát és kognitív funkciókat depresszióban szenvedő elhízott betegeknél azáltal, hogy fokozza a szinaptikus funkciót és a neuronális jelátvitelt az agyban (212). Figyelembe véve ezeket az eredményeket, az agyi GLP-1 útvonal további megismerése és működésének befolyásolása új megközelítést jelenthet a depressziós állapot javítására.

Állatkísérletek kimutatták, hogy a PVN-ben a GLP-1R-t többféle sejttípus is expresszálja, beleértve az oxitocint, kortikotropinfelszabadító hormont (CRH), nesfatin 1-et és a melanokortin-4 receptort tartalmazó neuronokat (213, 214), azonban humán PVN-ben a sejttípus függő GLP-1R expressziót még nem vizsgálták. Emberben a GLP-1R eloszlása a hipotalamuszban hasonló a rágsálókéhoz (215-217). Emellett Kulve és mtsai. *in situ* hibridizációs technikát alkalmazva megfigyelték, hogy T2DM betegeknél

a GLP-1R mRNS expressziója csökkent a PVN elülső parvocelluláris régiójában (217), azonban a többi PVN szubdivíziót érintő GLP-1R expresszió változásokról nem számoltak be. Mivel a PVN szubdivíziói szerepet játszanak az energiaegyensúlyban és a glükóz homeosztázisban (218, 219), amelyben valószínűleg GLP-1R-t tartalmazó neuronjai is részt vesznek (214, 220), feltételezzük, hogy a PVN-ben kifejeződő GLP-1R hatással lehet a 2-es típusú cukorbetegségre. Ezért jelen tanulmányban ezzel a kérdéssel is foglalkoztunk mind az mRNS, mind a fehérje szintjén, posztmortem T2DM betegekből származó PVN minták vizsgálatával.

1.6.3. Az öngyilkosság neurobiológiája

A stressz–diatézis (esetleges betegségekre való nagyfokú hajlam) modell szerint az exogén, környezeti tényezők (pl. negatív életesemények, krízisállapot) hosszútávú neurobiológiai hatásai mellett a biológiai vulnerabilitás (pl. genetikai hatások, neuroendokrin rendszer), az egyéni jellemvonások (pl. impulzivitás) és mentális zavarok járulnak hozzá ahhoz a komplex folyamathoz, amely öngyilkos akcióhoz vezethet (221, 222). Az agy posztmortem vizsgálataiból, valamint a genomiális és *in vivo neuroimaging* vizsgálatokból származó eredmények alátámasztják e diatézis biológiai alapját, jelezve a kognitív és viselkedési terápia mellett a neurobiológiai szűrés fontosságát az öngyilkosság megelőzésében. A korai élethelyzeti nehézségek és az epigenetika magyarázatot adhatnak az öngyilkossági kockázat, az agyi áramkörök és a neurokémiai rendellenességek közötti kapcsolatra (222). A különféle posztmortem és *in vivo* technikákat alkalmazó tanulmányok eredményei a szerotonin neurotranszmitter rendszer és a HPA tengely stressz-válaszrendszerének károsodását mutatták az öngyilkos magatartás diatézisében (223). Ezek a károsodások a hangulat megromlott kognitív kontrolljában, pesszimizmusban, reaktív agresszív jellemvonásokban, problémamegoldásban, negatív társadalmi jelekre való túlzott reakcióban, túlzott érzelmi fájdalomban és öngyilkos gondolatokban nyilvánulnak meg, amelyek végül öngyilkos akciókhoz vezetnek (224).

A jelenleg rendelkezésre álló klinikai prediktorok csekélyek, illetve eddig még nem azonosítottak olyan biomarkert, amely segítené a klinikusokat a kezelés célzásában. Az öngyilkos viselkedés stressz-diatézis modellje szerint az öngyilkosság a stresszorok és az öngyilkos viselkedésre való hajlam (diatézis) közötti kölcsönhatás eredménye. Bár

az öngyilkos viselkedés heterogén és eltérő az ok-okozati mértéke, az öngyilkossági halálozások és a nem végzetes, de súlyos öngyilkossági kísérletek demográfiai, klinikai és neurobiológiai szempontból hasonlóak, így valószínűleg közös a diatézisük (224). A hangulati rendellenességeknél a morфомetrikus sejteltváltozások három mintázata figyelhető meg, pl. glia sejtszám csökkenés és alacsonyabb neuronsűrűség a frontális lebenyben (225-227), valamint a szerotonerg sejtek számának növekedése az agytörzsben, pl. a DRN-ban (228). Az öngyilkosságban elhunyt embereken végzett posztmortem vizsgálatok során hasonló folyamatok voltak megfigyelhetők a glia sejtek és neuronok denzitásában (229, 230), illetve a DRN szerotonerg sejtek számában (231) valamint magasabb triptofán-hidroxiláz 2 (TPH2; a szerotonin szintézisének sebességkorlátozó enzime) mRNS és fehérje expressziót azonosítottak az agytörzsben (232). Az öngyilkosságban elhunyt és kezeletlen depresszióban szenvedő személyeknél kevesebb érett szemcsesejt volt a hippocampusban (különösen a gyrus dentatus-ban), azokhoz képest, akik ugyan depresszióban szenvedtek, de öngyilkosságuk előtt SSRI-t kaptak, vagy akiknél pszichiátriai rendellenesség nem állt fenn. Ezzel párhuzamosan az öngyilkosság következtében elhunyt depressziós betegeknek kisebb gyrus dentatus volt megfigyelhető (232). Az öngyilkosság következtében elhunyt emberek locus coeruleusában a noradrenerg neuronok hiányát is megfigyelték összehasonlítva a hirtelen halált halt pszichiátriai rendellenességekkel nem rendelkező egyénekkel (233). Az idegrendszer immunsejtjei a mikroglia, amelyek a gyulladáshoz vezető mediátorok felszabadításával döntő szerepet játszanak a neuroinflammatorikus folyamatokban, ezáltal feltehetően hozzájárulnak a különböző pszichiátriai rendellenességekhez, mint a depresszióhoz vagy skizofréniahoz. A közelmúltban végzett vizsgálatok szerint az aktivált mikroglia különféle mechanizmusokon keresztül, különös tekintettel a triptofán-kinurenin útvonalra, hozzájárulhat az öngyilkos viselkedés kialakulásához (234, 235). A proinflammatorikus citokinek aktiválják a kinurenin rendszert (234, 236), ennek következtében a kinurensav neurotoxikus kinolinsavvá bomlik, amely az NMDA receptor egyik agonistájaként hat a központi idegrendszeren belül. Ez a folyamat a glutamáterg rendszer túlaktiválódását és az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) termelés csökkenését eredményezi, amely károsítja a neuroplaszticitást és kognitív problémákhoz vezet (237). A ketamin, amely az NMDA receptor antagonistája, gyors antidepresszáns hatással rendelkezik, azonban megfigyelték előnyös hatását az öngyilkos viselkedés során

(238), így feltételezik a glutamát rendszer fontos szerepét öngyilkosságban is. Meglévő adatok alapján a glutamát szint emelkedése hozzájárul az öngyilkossággal kapcsolatos személyiségjegyekhez, beleértve az impulzivitást és az agressziót (239). Ez a jelenség összefüggésbe hozható a proinflammatorikus citokinek általi emelkedett kinolinsav szintjével az öngyilkosságot megkísérelt személyek központi idegrendszerében (234, 236). Egyes tanulmányok a glutamát- és GABA-rendszerekkel kapcsolatos gének változatainak összefüggéséről számoltak be öngyilkos viselkedés kapcsán (240-242), azonban ezekben a rendszerekben részt vevő gének genomikai szintű változásait korlátozott mértékben vizsgálták MDD és öngyilkosság vonatkozásában. Az öngyilkossággal kapcsolatos posztmortem microarray vizsgálatok a GABA receptor alegységek, a glutamát-ammónia ligáz (GLUL) vagy a glutamát receptorok eltérő expressziójáról számolnak be a prefrontális és limbikus régiókban (243-246). Kimutatták, hogy az öngyilkos viselkedés a HPA tengely hiperaktivitásával jár, ami zavart okozhat a stressz kezelésében, a hippocampusz működésében és kognitív zavarok kialakulásához vezethet (247). Továbbá azt is megfigyelték, hogy depressziós öngyilkos betegek paraventriculáris hipotalamikus magjában, az előagyban és a locus coeruleusban megemelkedett a CRH szintje, illetve csökkent CRH receptor sűrűség volt megfigyelhető a frontopoláris kéregben (248, 249). Ezen felül azt is megfigyelték, hogy a glukokortikoid receptor alfa (GR- α) mRNS és fehérje expressziója szignifikánsan csökkent a tinédzser öngyilkos áldozatok prefrontális kéregében és amigdalájában (250, 251).

A jelenleg használt antidepresszáns gyógyszerek, amelyek többnyire az agyi monoaminerg neurotranszmissziót célozzák, korlátozott klinikai hatékonysággal rendelkeznek. Bár a depresszió és öngyilkosság etiológiája nem teljesen tisztázott, a jelenlegi tudományos adatok kiemelik a neurotróf faktorok hiányosságainak, a neuroinflammatorikus valamint a neuroendokrin folyamatok megváltozásának, valamint az agyi metabolikus folyamatok és a bél-agy tengely működés zavarainak szerepét a neuropszichiátriai rendellenességek patogenezisében. Ezek alapján lehetőségünk van olyan új terápiás megoldások kialakítására, amelyek a klasszikus antidepresszánsoktól eltérő módon működnek, így nagyobb valószínűséggel növelnék a depresszió és öngyilkos viselkedés kezelésének hatékonyságát.

1.7. Nagy áteresztőképességű módszerek

A biológiai problémák megértésének széleskörben alkalmazott és folyamatosan újuló megközelítései a nagy áteresztőképességű vagy *high-throughput* technológiák, amelyek egyszerre több száz mintát vagy több ezer analitot elemeznek egyetlen mérés során. Ezek a technológiák elengedhetetlen részét képezik a neurokémiai és idegtudományi kutatásoknak. Ilyen eszközök például a microarray-alapú expressziós vizsgálatok, az új-generációs szekvenálási technikák, a többdimenziós proteomikai módszerek, vagy legújabban a *high-throughput tracking* eljárások, amelyek alkalmazása segítheti az új gyógyszercélpontok kidolgozását, a sejttípus- és régióspecifikus neuroanatómiai vizsgálatokat, valamint a neurológiai és pszichiátriai betegségekben szerepet játszó molekuláris útvonalak azonosítását.

A nagy áteresztőképességű módszerek közül az új-generációs szekvenálási technikák gyakran alkalmazott módszerei az agyműködés és a diszfunkciók közötti összefüggések keresésében. Az új-generációs szekvenálás két nukleotid alapú technikára osztható, a DNS alapú szekvenálásra (DNA-seq) és az RNS alapú szekvenálásra (RNA-seq) (252). Amint azt az elnevezésük is sugallja, a DNA-seq technikák a genomra specializálódott eljárások, míg az RNA-seq technikák a transzkriptom tanulmányozására szolgálnak. Az RNA-seq betekintést nyújt a megváltozott génexpresszióba, az alternatív splicing-ba és az új transzkriptek felfedezésébe. Ennek a technikának az alosztályai közé tartozik a teljes transzkriptom szekvenálás, az mRNS és mikro RNS szekvenálás (252). Az RNA-seq során az amplifikáció és szekvenálás előtt az RNS-t cDNS-sé kell átalakítani. Ezenkívül az RNA-seq elemzése nagyobb kihívást jelent a DNA-seq-hez képest, mivel a transzkripciót követően az RNS-molekulák, különböző biológiai funkciójukat tekintve, további bonyolult folyamatokon mennek keresztül (alternatív splicing, poliadeniláció, stb.) (253). Napjainkban az RNA-seq két megközelítése használatos, a rövid és hosszú fragment szekvenálás.

Összességében az RNA-seq alkalmazása kiváló módszer arra, hogy számos területen betekintést nyerjünk egy adott biológiai rendszer normál vagy patológiás folyamatai mögött meghúzódó mechanizmusokba.

1.7.1. Nagy áteresztőképességű génexpressziós vizsgálatok depresszió és öngyilkosság vonatkozásában

Kezdetben az antidepresszív gyógyszerek hatásmechanizmusa alapján feltételezték, hogy a depresszió az agy monoaminerg rendszer deficitjének következménye (254). Bár a monoaminerg antidepresszánsokat általában első vonalbeli kezelésre használják, klinikai előnyük nem azonnal jelentkezik, néhány ember számára pedig egyáltalán nem nyújtanak segítséget. Ettől függetlenül a szerotonerg, dopaminerg és adrenerg gének a legszélesebb körben vizsgált gének mind a depresszió, mind az öngyilkos viselkedés tekintetében, azonban jelenleg közülük csak néhány potenciális génváltozat áll összefüggésben az öngyilkossággal (255). Egy közelmúltban végzett metaanalízis a kognitív folyamatok fejlődésében és fenntartásában szerepet játszó, depresszióval összefüggő új variánsokat azonosított (256), ráadásul egy szisztematikus áttekintés feltárta, hogy az MDD-ben szerepet játszó legfontosabb gének érintettek a glutamát neurotransmisszióban, a kalcium csatorna-aktivitásban és apoptózisban is (257). Egy sejttípus-specifikus metilóm vizsgálat rámutatott a veleszületett immunválaszok szerepére depresszióban a p75NTR/neurotróf növekedési faktoron és a toll-like receptor jelátvitelen keresztül (258). A neuronális plaszticitás, valamint a depresszióhoz és az öngyilkos magatartáshoz kapcsolódó egyéb kóros elváltozások is magukban foglalhatnak génexpressziós változásokat (259). Kezdetben az egyes rendszereket, mint például a GABAerg funkciót (260), a neurotróf faktorokat (261), és a gliasejteket (229) vizsgálták. A közelmúltban több *high-throughput* módszert alkalmaztak az öngyilkos áldozatokban megváltozott gének szélesebb körű vizsgálatára. Microarray vizsgálatok számos megváltozott gént azonosítottak, amelyek szabályozzák pl. gliális, endotheliális és mitokondriális funkciókat (262), némelyikük szexuális dimorfizmust (263) és szerhasználati zavarral való komorbiditást is mutattak (264, 265). A közelmúltban szekvenálási megközelítésekkel további új potenciális géneket és útvonalakat azonosítottak depressziós állatmodellekben (265), valamint depresszióval (266) és öngyilkossággal (266) kapcsolatos humán vizsgálatok során is. Bár ezek a génexpressziós vizsgálatok értékes adatokat szolgáltatnak az öngyilkos viselkedés neuronális mechanizmusairól, legtöbbjük a DLPFC-t vizsgálta. Tekintettel a DMPFC fentebb leírt szerepére, feltételeztük, hogy az öngyilkos viselkedéssel összefüggő génexpressziós változások a DMPFC-ben is végbemennek. Kísérleteink során viszonylag

rövid posztmortem idejű DMPPFC mintákat használtunk öngyilkos áldozatokból. Bár a kísérletben szereplő öngyilkosok esetében nem diagnosztizáltak depressziót, joggal feltételezhető, hogy depressziós tüneteik is voltak, mivel a depresszió a leggyakoribb pszichiátriai rendellenesség az öngyilkosságban elhunytak körében (8, 145, 146). Azt is hangsúlyozni kell, hogy a depressziós betegek többsége nem követ el vagy kísérel meg öngyilkosságot, ami arra utal, hogy további tényezők is hozzájárulhatnak az öngyilkosság bekövetkezéséhez (267). Ezért az öngyilkos minták vizsgálata hasznos betekintést nyújthat az öngyilkos viselkedés hátterében húzódó folyamatokba.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A dolgozat elsődleges célja az öngyilkosok DMPFC-ben bekövetkező génexpressziós változások vizsgálata volt. E cél megvalósítása érdekében az alábbi feladatokat tűztük ki:
 - a) az öngyilkosság függvényében bekövetkező transzkriptomikai változásokat teljes transzkriptom analízissel, RNS szekvenálással vizsgáljuk meg,
 - b) az RNS szekvenálást követően a mérések alapján változó gének csoportjainak és biológiai útvonalainak bioinformatikai jellemzését végezzük el,
 - c) a változó génekből protein interakciós és ko-expressziós hálózatok építése, azok klaszterezése, hub gének azonosítása és érintettségük meghatározása gén-betegség asszociációs adatbázisok segítségével,
 - d) a szignifikánsan változó depresszióban érintett gének validálása valós idejű kvantitatív PCR technikával,
 - e) a funkcionálisan kiemelkedő gének agykérgi eloszlásának jellemzése hisztológiai technikák alkalmazásával.
2. A dolgozat második fő célkitűzése a GLP-1R expressziójának vizsgálata volt T2DM személyek paraventikuláris hipotalamikus régiójában. Ennek megvalósítására valós idejű kvantitatív PCR és Western blot technikákat alkalmazunk.

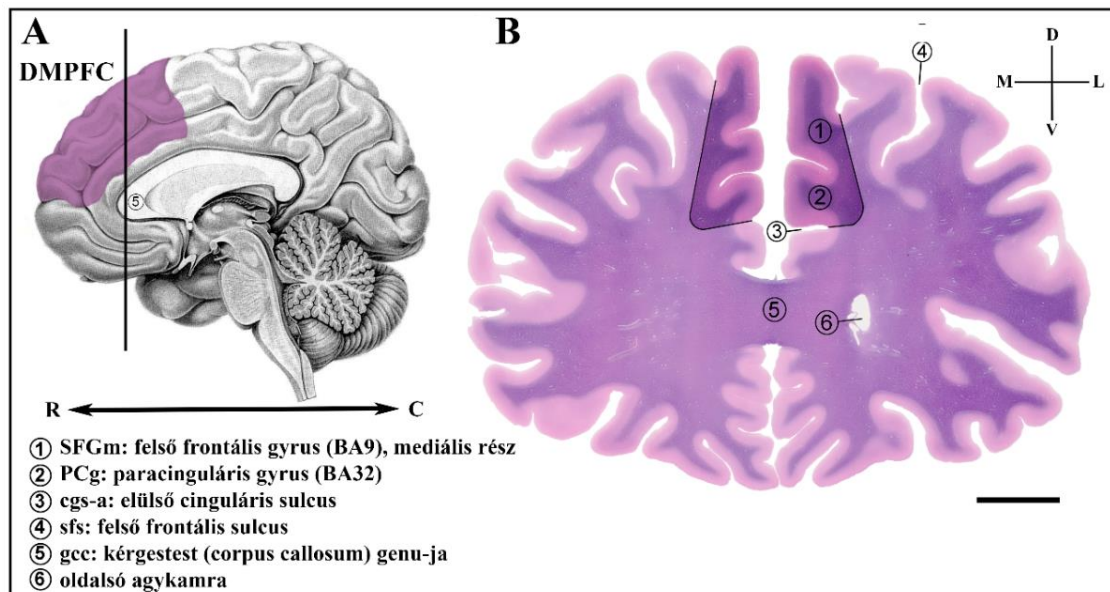
3. MÓDSZEREK

3.1. Humán agyszöveti minták forrása

Az emberi agyminták gyűjtése az emberi szövetek magyarországi orvosi kutatásban való felhasználásának etikai szabályai (HM 34/1999) és az Orvosi Világszövetség Etikai Kódexének (Helsinki nyilatkozat) szabályai szerint történt. Az agy kiemelése a Semmelweis Egyetem Igazságügyi Biztosítás-Orvostani Intézetében a Humán Agyszövet Bank (HBTB) keretén belüli zajlott. A HBTB tevékenységéhez az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB: 189/KO/02.6008/2002/ETT) és a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (1. sz. 32/1992/TUKEB) adott engedélyt. Az agyszövetek feldolgozása a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága által jóváhagyott protokoll szerint zajlottak (TUKEB 189/2015). Minden agyminta tekintetében a boncolás majd az agyak lefagyasztása a halált követően 10 órán belül bekövetkeztek. Az alanyok kórtörténetét klinikai feljegyzésekből, családtagokkal és rokonokkal folytatott interjúkból, valamint kórbonctani és neuropatológiai jelentésekből dokumentáltuk.

3.2. Az agyszövet feldolgozása

A kísérlet során vizsgált emberi posztmortem DMPFC (Brodmann area 9) minták a Humán Agyminta Banktól (Semmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország) származnak. A DMPFC topográfiai kiterjesztésének meghatározásában jelentős eltérések mutatkoznak az irodalomban. A MPFC, ahogy azt a neve is mutatja, a homloklebény mediális felületét foglalja el az elülső cinguláris gyrus felett. A MPFC dorsális és ventrális részre oszlik. A dorsális MPFC hátulsó határát a precentrális sulcus határozza meg, amely elválasztja a DMPFC-t a premotoros kéregtől (1A ábra). A dorsomedialis és a dorsolaterális prefrontális kéreg a mély felső frontális sulcus választja el egymástól (1B ábra).



1. ábra: Az emberi nagyagy dorsomediális prefrontális kérgének topográfiai kiterjedése és a kísérlet során használt kérgi minták disszekciós helyének reprezentatív szemléltetése. (A) A DMPFC elhelyezkedését és topográfiai kiterjedését lila szín mutatja (forrás: (268) alapján saját szerkesztés). (B) Az emberi agy koronális metszetén a DMPFC-t és a disszekció helyét fekete vonalak által határolt és sötétebb színnel kiemelt régió szemlélteti. A tájékozási pontokat és határokat számok jelzik, az ábrán a skála mérete 1 cm-t jelöl. DMPFC: dorsomediális prefrontális kéreg, C: caudális, D: dorsális, L: laterális, M: mediális, R: rostrális, V: ventrális. A metszetet Levanol-Fast Cyanine 5RN módszerrel festettük.

A vizsgálati szöveti mintákat összesen 16 alanyból gyűjtöttük. A kontroll csoportot 8 pszichiátriai és neurológiai betegséggel nem rendelkező alany (2 nő és 6 férfi, átlagéletkor $65,4 \pm 5,6$) illetve az öngyilkos csoportot szintén 8 akut vagy krónikus depresszió jeleit nem mutató alany alkotta (3 nő és 5 férfi, átlagéletkor $53,6 \pm 4,8$) (1. táblázat). A lefagyasztott homloklebeny blokkokból sorozatos koronális metszeteket készítettünk. A mintákat a Montreali Neurológiai Intézet (MNI) standard tér kiindulópontjától számítva 50 és 30 mm közötti szakaszokból gyűjtöttük (a genu corporis callosi megjelenésétől illetve az oldalkamra elülső pólusának megjelenésétől) (269), amelyhez speciális, 8 és 15 mm belső átmérőjű mikrodisszekciós tűket használtunk (270, 271). A szöveti minták a felső (superior) frontális gyrus mediális részéből (Brodmann area 9) és a paracinguláris gyrusból (más néven az ACC pre- és szupragenuális részének dorsális része, Brodmann area 32) származtak (1B ábra). A gyűjtött mintákban a felső

frontális gyrus/paracinguláris gyrus arány 80-85% volt, továbbá a minták nagyobb részt szürkeállományi és kisebb részt fehérállományi részeket tartalmaztak. A disszekált szövetmintákat 1,5 ml-es Eppendorf-csövekbe (Eppendorf, Hamburg, Németország) gyűjtöttük, és felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A disszekciós eljárás minden lépése alatt (szeletelés, lyukasztás) a szövetmintákat fagyasztva tartottuk.

1. táblázat: A kísérletben szereplő kontroll és öngyilkos személyek demográfiai adatai.

#Donor	Kísérleti csoport	Nem	Kor (év)	Poszt-mortem idő (óra)	Halálok	Klinikai és patológiai diagnózisok
1	kontroll	férfi	42	3,5	akut légzési elégtelenség	-
2	kontroll	nő	56	6	légzési és keringési elégtelenség, oedema cerebri	oedema cerebri, coarctatio aortae, hepatitis alcoholica
3	kontroll	férfi	50	5,5	stroke, agyvérzés	nagy kérgi és szubkortikális vérzés a parietális lebenyben
4	kontroll	férfi	68	10	akut szívelégtelenség	akut tüdőödéma, súlyos érlelmeszesedés, perifériás artériás shunt, bal koszorúér elzáródás
5	kontroll	nő	75	10	stroke (jobb oldali - arteria cerebri media)	cukorbetegség, stroke, hipertónia, mamma carcinoma, általános érlelmeszesedés
6	kontroll	férfi	64	10	stroke (bal oldali - arteria cerebri media), bronchopneumonia	cardiomyopathia, koszorúérlelmeszesedés, hipertónia, légzési és keringési elégtelenség, tüdőgyulladás

#Donor	Kísérleti csoport	Nem	Kor (év)	Poszt-mortem idő (óra)	Halálok	Klinikai és patológiai diagnózisok
7	kontroll	férfi	90	4-5	stroke (arteria cerebri media et posterior)	stroke, infarctus lacunaris multiplex cerebri, Parkinson-kór, légzési és keringési elégtelenség
8	kontroll	férfi	78	10	légzési és keringési elégtelenség	demencia, cukorbetegség, hipertónia, polyneuropathia
9	öngyilkos	nő	48	6-7	öngyilkos (gyógyszer túladagolás)	-
10	öngyilkos	férfi	71	1	öngyilkos (magasból leugrott)	klinikai ellátás nélkül a halált megelőző 6 hónapban
11	öngyilkos	férfi	48	6	öngyilkos (akasztott - asphyxia)	klinikai kezelésben nem részesült
12	öngyilkos	nő	65	5	öngyilkos (akasztott - asphyxia)	kóros diagnózis: negatív (nincs kóros jel semmilyen betegségre), klinikai kezelésben nem részesült
13	öngyilkos	férfi	31	8	öngyilkos (akasztott - asphyxia)	klinikai kezelésben nem részesült
14	öngyilkos	nő	49	6	öngyilkos (gyógyszer túladagolás)	gyógyszeres kezelés nem ismert
15	öngyilkos	férfi	43	4	öngyilkos (akasztott)	klinikai kezelésben nem részesült

#Donor	Kísérleti csoport	Nem	Kor (év)	Poszt-mortem idő (óra)	Halálok	Klinikai és patológiai diagnózisok
16	öngyilkos	férfi	66	8-10	öngyilkos (akasztott - asphyxia)	klinikai kezelésben nem részesült

3.3. RNS szekvenálás és adatfeldolgozás

Számos hazai és külföldi kollaboráció során igazolást nyert, hogy az agyi mikrodisszekciós technikával rövid posztmortem idejű agykból izolált mintákon sikeres RNS vizsgálatok végezhetők, melyek patológiás elváltozásai nagy pontossággal és specifikusan kimutathatók (272-275). A begyűjtött DMPFC mintákon RNS szekvenálást hajtottunk végre annak érdekében, hogy meghatározzuk az öngyilkos viselkedéssel összefüggő génexpressziós változásokat. A minták előkészítését, a szekvenálási könyvtár készítését és az RNS szekvenálást a Pekingi Genomikai Intézet (BGI, Hongkong, Shenzhen, Kína) végezte. A teljes RNS kinyerést 20 mg porított agyszöveti mintából végezték, majd az RNS szekvenálást egy ún. BGISEQ-500 platformon hajtották végre. Az RNS koncentrációját és integritását Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) segítségével ellenőrizték. Az összes generált nyers szekvenálási adatokat a BGI által kifejlesztett szoftverrel (SOAPnuke 1.5.2) szűrték aszerint, hogy mely leolvasott szekvenciák tartalmaznak adapter szekvenciákat, mely szekvenciáknál haladja meg az ismeretlen bázisok aránya az 5%-ot, illetve mely leolvasott szekvenciák minősége alacsonyabb az elvártnál. Ezen szekvenciák kiküszöbölése után a tiszta leolvasási adatokat FASTQ formátumú szekvencia tároló fájlokban mentették (276). A következő lépésben a leolvasott és FASTQ fájlban tárolt értékeket egy humán referenciagenomra (hg19) képezték le HISAT2 (2.0.4) szoftver segítségével (277, 278). A referencia génekkal történő átlagos letérképezési arány a leolvasott gének esetében 76,12%, a referencia genomra történő átlagos térképezési arány 91,28% volt. A folyamat utolsó lépését, a csoportok közötti génexpressziós különbségek elemzését, valamint a változást mutató gének funkcionális annotációját laborunkban az RStudio program használatával végeztük (R program 4.0.4; RStudio 1.4.1106). Ehhez az adatokat az Rsubread csomag (2.4.3) segítségével importáltuk az RStudio programba. Az Rsubread használata megkönnyíti az RNS szekvenálás során leolvasott adatok elemzését,

többek között lehetőséget nyújt a szekvencia leolvasások minőségének értékelésében és összegzésében is (279). A változó mértékben, vagyis differenciáltan expresszálódó gének (DEG-ek) azonosításához a DESeq2 csomagot (1.34.0) használtuk (280). A DESeq2 használata előtt minimális előszűrést hajtottunk végre, annak érdekében, hogy megtartsuk azokat a géneket, amelyeknek legalább egy olvasott értéke van minden mintában, így elkerülhetjük azt, hogy olyan géneket is listázzunk, melyek akár egy, akár az összes vizsgált mintában nem expresszálódnak. A változások megállapításához szigorúbb szűrési paramétereket alkalmaztunk: a DEG-eket a Benjamini és Hochberg-korrigált p-érték ($p_{adj} < 0,05$) (281) alapján azonosítottuk, valamint a szignifikáns értékek mértékének jellemzésére a változás mértékének (a *fold change* érték kettes alapú logaritmus; \log_2FC) határ értékét ± 1 -nél határoztuk meg. Ez értéken felül szignifikánsan megnövekedett vagy lecsökkent expressziójú géneket határoztunk meg. A szignifikánsan változó expressziójú géneket a ggplot2 (3.3.5) R csomag segítségével *volcano plot* ábrán vizualizáltuk. A DEG-ek hierarchikus csoportosulását a gplots (3.1.1) R csomag segítségével elemeztük.

3.4. Az RNS szekvenálási adatok bioinformatikai értékelése

Az újgenerációs transzkriptom szekvenálás egy robusztus eszköz, amelyet a transzkriptom elemzésére, illetve a genetikai funkciók feltárására használnak. A módszer előnyei közül fontos kiemelni, hogy a transzkriptek mennyiségét képesek vagyunk egy adott időpillanatban meghatározni, így ezzel a megközelítéssel akár különböző tényezők génexpresszióra gyakorolt hatása is vizsgálhatóvá válik. Az RNS szekvenálásból nyert információk elsősorban egy adott gén aktivitásáról adnak felvilágosítást, ugyanakkor a génexpresszió szabályozásokról nem nyújtanak biológiailag releváns információt. Az RNS szekvenálási adatok bioinformatikai elemzése azonban lehetőséget nyújt a bonyolultabb biológiai folyamatok és szabályozó körök vizsgálatára, így egy adott patológiás elváltozás biológiai folyamatainak funkcionális leírása lehetővé válik.

A bioinformatikai *downstream* adatfeldolgozás során betekintést nyerhetünk különböző expressziós kapcsolatokba és olyan funkcionális összefüggésekbe, mint a gén ontológia vagy a sejtek jelátviteli útvonala. Az ilyen jellegű bioinformatikai adatfeldolgozás során azonosíthatók az adott patológiás elváltozásban érintett biológiai útvonalak és szabályozó hálózatok, illetve más proteomikai vagy metabolomikai

adatbázisból származó információk együttes elemzése során lehetőségünk van fehérje interakciós és gén ko-expressziós hálózatok rekonstrukciójára is.

3.4.1. A DEG-ek funkcionális annotációja

Gén ontológia (GO) elemzéssel megvizsgáltuk a DEG-eket azok molekuláris funkcióban, sejtes lokalizációban és biológiai folyamatban való részvételük szerint. A gének ontológiai azonosítása folyamán a szignifikánsan felülreprezentált (dúsult) GO kategóriákat a gprofiler2 (0.2.0) R csomag felhasználásával azonosítottuk (FDR-korrigált p -érték $<0,05$). Az elemzés eredményeképpen a legszignifikánsabban felülreprezentált kategóriákat 9 fő csoportba soroltuk. A funkcionális dúsulást külön-külön végeztük a lecsökkent és megnövekedett expressziójú, a továbbiakban *fel-* és *le-regulált* DEG-ek esetében. A fel-, illetve le-regulált gének biológiai útvonalelemzéséhez a *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) és a *Reactome* adatbázisokat használtuk (282, 283). A funkcionálisan felülreprezentált biológiai útvonalakat Manhattan plot ábrán foglaltuk össze, melyet szintén a gprofiler2 programcsomag segítségével készítettük el. A 10 legszignifikánsabban fel- és le-regulált gének funkcionális génannotációját a *Database for Annotation, Visualization and Integration Discovery* (DAVID) online program segítségével végeztük.

3.4.2. A DEG-ek fehérje-fehérje interakciós hálózatának a vizsgálata

A fehérje interakciós hálózat analízisének egyik célja a *hub* fehérjék azonosítása. A hub fehérjék olyan fehérjék, amelyek a legmagasabb fokú kapcsolattal bírnak egy fehérje interakciós hálózatban. A DEG-ek fehérje-fehérje interakciós (PPI) hálózatának elemzésére és a hub fehérjék azonosításához a *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING) online szoftvert (<http://string-db.org>) alkalmaztuk (284). A STRING adatbázis használatával a minimálisan szükséges 0,4 interakciós pontszámmal rendelkező géneket választottuk ki, a hálózati modell analíziséhez és vizualizálásához pedig a Cytoscape (3.8.2) grafikus hálózatelemző és megjelenítő programot használtuk (285). A Cytoscape egy beépülő modulja (pugin-ja), a CytoHubba (286) segítségével értékeltük ki a PPI hálózat legkiemelkedőbb tagjait azok *node degree* értékeik szerint. A 10 legkiemelkedőbb fehérje annotációját a stringApp segítségével végeztük. Az egyes annotációs kifejezésekhez tartozó gén dúsulásokat FDR-korrigált p -érték $<0,05$ szignifikánsnak tekintettük.

3.4.3. Gén ko-expressziós hálózat analízis

A gén ko-expressziós hálózat szignifikánsan együtt expresszált gének kapcsolatait tartalmazza. A gén ko-expressziós hálózatok vizsgálata lehetővé teszi olyan gének azonosítását, amelyeket ugyanaz a transzkripció szabályozó program irányít, vagy amelyek funkcionálisan rokonok vagy géntermékek egy közös biológiai folyamatban vesznek részt. Két gén expressziós hasonlóságának számszerűsítésére a Pearson-féle korrelációs együttható alkalmaztuk, ahol a +1-hez vagy -1-hez közeli értékek a legerősebb korrelációt mutatják (287). A számszerű vizsgálatokat EBSeq R programcsomag segítségével végeztük (288). Az analízis során létrehoztunk egy adat táblázatot, amely a teljes adatsor statisztikailag szignifikáns korrelációs értékeit tartalmazta minden releváns gén-párra vonatkozóan. Ezt az adat táblázatot a Cytoscape programban vizualizáltuk. A hálózat elemeit (csúcsait) a gének, a génpárok közötti korrelációt az élek határozzák meg. A génpárok korrelációs értékét és irányát az élek színe és szélessége adta meg. A ko-expressziós hálózat sűrűn kapcsolódó elemeinek, más néven klasztereinek azonosítására a GLayer elemzést használtuk (289). A GLayer plugin a Cytoscape programon belül génextpressziós hálózatok klaszterezésére és a géncsoportosulásai strukturált és informatív megjelenítésére alkalmas módszer, amely nagy hálózatokra optimalizált elrendezési algoritmusokat is biztosít. A gén ko-expressziós hálózatok klasztereinek funkcionális elemzéséhez a ClueGO Cytoscape alkalmazást használtunk (290). Az egyes annotációs kifejezésekhez tartozó gén dúsulásokat a Bonferroni-korrigált p-értékek szerint szűrtük ($p < 0,05$). A ko-expressziós klaszterek csúcsainak fontosságának jellemzésére, így a hubok azonosítására a maximális klikk-centralitás (MCC) algoritmust használtunk (291). A *maximal clique* vagyis maximális klikk a gráfelmélet egy klasszikus kombinatorikus optimalizálási modellje. A maximális klikk fogalmat széles körben használják a gén ko-expressziós hálózatok kapcsolatrendszerének elemzésére. Az MCC a hálózat csúcsait (*node*-ok) a hálózatban betöltött topológiai fontosságuk szerint rangsorolja. Az MCC értéke egyesíti a csúcsok helyzetére vonatkozó információkat a hozzá legközelebbi szomszéd helyzetére vonatkozó helyi információkkal. A 10 legkiemelkedőbb hub gén annotációját a CytoHubba plugin segítségével végeztük.

4.4.4. Betegség-asszociált elemzés

Az emberi betegségekkel összefüggő jelenlegi gének listája elérhető több adatbázisban is. Számos, különböző génfunkciós adatbázisokon alapuló analitikai megközelítést fejlesztettek ki bizonyos génkészletek biológiai jelentőségének megfejtésére. A génkészletek funkciójának feltárására az *Over-Representation Analysis* megközelítés gyakran használt módszer (292), amely algoritmusán alapulva számos dúsító eszköz jelent meg, köztük a betegségek dúsítására kifejlesztett *DisGeNET* és *Genetic Association Database* (GAD) adatbázisok is. A DisGeNET adatbázisról ismert, hogy több forrásból integrál különböző emberi betegségekhez köthető géneket (293). A komplex betegségekben felülreprezentált gének azonosítására, a DAVID online programon keresztül, a DisGeNET és GAD adatbázisokat használtuk (<https://david.ncifcrf.gov/>). A DAVID hatékony programja a génannotációk és dúsult biológiai folyamatok elemzésének, azonban hasonlóan alkalmas összetett rendellenességek annotációjához is, amelyhez a GAD, a DisGeNET vagy az Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) adatbázisokat használja. A legjelentősebb 10 le-, illetve fel-regulált DEG-eket, valamint a PPI és ko-expressziós hálózatok hub-jait beimportáltuk a DAVID program keresőjébe, majd a GAD és DisGeNET adatbázisok alapján kapott eredményeket letöltöttük. Annak érdekében, hogy a változó gének listájából összegyűjtsük a depresszióban lehetségesen érintett géneket, a hangulati rendellenességeket és a kapcsolódó társbetegségeket érintő kategóriákat figyelembe véve interpretáltuk a releváns találatokat.

3.5. Az RNS szekvenálási adatok összevetése az Allen Human Brain Atlas adatbázis adataival

Az eltérő sejttípusok változatos génkifejeződési profillal rendelkeznek, ezért morfológiájuk és funkciójuk nagymértékben eltér egymástól. Így a hub gének funkcionális vizsgálata során elengedhetetlen, hogy expressziójukat a DMPFC molekulárisan meghatározott altípusaiban is lokalizálni tudjuk. Ennek meghatározására az *Allen Human Brain Atlas* (AHBA) transzkriptomikai adatait használtuk. A sejttípus-specifikus gének kereséshez a *Multiple Cortical Area – SMART-seq (2019)* adatkészletet használtuk, amelyet az *Allen Institute for Brain Science* weboldaláról (www.brain-map.org) töltöttük le.

3.6. A változó gének expressziójának validálása valós idejű kvantitatív PCR technikával

Az RNS szekvenálási adatok validálására 14 depresszióban érintett és/vagy neuron-specifikus funkciót ellátó változó gének expresszióját valós idejű kvantitatív PCR-rel (RT-qPCR) vizsgáltuk. Az eljárást a korábban leírtak szerint végeztük (294). Röviden, a teljes RNS-t körülbelül 20 mg fagyasztott agyszövetből izoláltuk TRIzol reagens (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) felhasználásával. A lizátumokat RNeasy Mini kit oszlopokon tisztítottuk (Qiagen, Hilden, Németország). Az extrahált RNS minőségét és mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) határoztuk meg. Az RNS koncentrációját RNáz-mentes vízzel 500 ng/μl-re állítottuk be, majd SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) segítségével cDNS-t írtunk át. 10-szeres hígítás után a cDNS mintákból 2,5 μl-t használtunk templátként. A PCR reakciót iTaq DNS-polimerázzal (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) 12,5 μl össztérfogatban végeztük a következők szerint: 95 °C 3 percig, majd 38 ciklus 95 °C-on 0,5 percig, 60 °C-on 0,5 percig és 72 °C-on 1 percig. Az amplifikációs ciklusok végén a PCR termékek specificitásának ellenőrzésére leolvastuk az olvadási hőmérsékletet, illetve az amplifikációs folyamatokat SYBR Green festékkel (Sigma, St Louis, Missouri, USA) detektáltuk. A PCR reakciókat egy CFX-96 C1000 Touch Real-Time készülékben végeztük (Bio-Rad Laboratories). Az RT-qPCR-hez használt primereket az Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT, Coralville, Iowa, USA) gyártotta, melyeket 300 nM végső koncentrációban használtunk. A primerek szekvenciáinak listája a 2. táblázatban található. Referencia géneként az béta-aktin (ACTB), gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és laktát dehidrogenáz A (LDHA) géneket használtuk, és ezek átlagából számítottuk ki a relatív génextpressziós értékeket $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel.

2. táblázat: A dolgozatban használt primerek listája.

Cél gén	Primer	Szekvencia (5' - 3')	Termék hossz (bp)	GeneBank ID
GLUL	GLUL-forward	tgatctccgtggctttggtt	302	NM_002065.7
	GLUL-reverse	tgttttgactccagccctgt		

Cél gén	Primer	Szekvencia (5' - 3')	Termék hossz (bp)	GeneBank ID
GJA1	GJA1-forward	tcaagggcgttaaggatcgg	309	NM_000165.5
	GJA1-reverse	caaaaggctgtgcatgggag		
GRM2	GRM2-forward	aagctgagtgacaagtccccg	307	NM_000839.5
	GRM2-reverse	cagaacgggtgaacaggaca		
GRIK1	GRIK1-forward	ttcacacatacagaccgc	374	NM_000830.5
	GRIK1-reverse	gtactcggatcatcatgcca		
GRIK2	GRIK2-forward	tacaaccaggcgtcttctc	283	NM_021956.5
	GRIK2-reverse	ccaccaaatgctcccactat		
SYT5	SYT5-forward	acaatcagccatcctcgtctg	374	NM_003180.3
	SYT5-reverse	tggacaagcaaggagttctc		
NRGN	NRGN-forward	cggagactagccagaactg	263	NM_006176.3
	NRGN-reverse	gtttaggggtgggtggagtg		
ITPKB	ITPKB-forward	acaagccttactgcctggag	298	NM_002221.3
	ITPKB-reverse	ctcccagctcctgtacctct		
AQP1	AQP1-forward	gctatgcgtgctggctacta	323	NM_198098.3
	AQP1-reverse	cggcatccaggtcatactcc		
ITGB4	ITGB4-forward	tcccacatcttctgtcacc	244	NM_000213.5
	ITGB4-reverse	cggatgtgaaaggaccagt		
PRKCH	PRKCH-forward	tcacccttctcactcagt	279	NM_006255.4
	PRKCH-reverse	atcccctcctgcacattcc		
SLCO2B1	SLCO2B1-forward	cctggggcagtggtgataat	294	NM_007256.4
	SLCO2B1-reverse	gcgaggtgggtggtaatag		
S100B	S100B-forward	tctggaagggaggagacaa	206	NM_006272.3
	S100B-reverse	tcgtggcaggcagtagtaac		
NECAB2	NECAB2-forward	caggatcttggtgccagct	360	NM_019065.2
	NECAB2-reverse	tgtggtcagtggtgcatg		
ACTB	Actin-beta-forward	gtgctatccctgtacgctc	271	NM_001101.5
	Actin-beta-reverse	tggccatctctgtctgaag		

Cél gén	Primer	Szekvencia (5' - 3')	Termék hossz (bp)	GeneBank ID
GAPDH	GAPDH-forward	ccagaacatcatccctgc	275	NM_002046.7
	GAPDH-reverse	gtgggtgtcgctgttgaa		
LDHA	LDHA-forward	ggaggttgatgcatggttcc	290	NM_005566.4
	LDHA-reverse	cagtgaaggagccaggaagt		

3.7. A NECAB2 hisztológiai vizsgálata

3.7.1. In situ hibridizáció

A humán DMPFC-ből reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő, melyet templátként használtunk az *in situ* hibridizációs próbák gyártásához. A neuronális kalcium-kötő fehérje 2 (NECAB2) próbákat a kvantitatív PCR során is használt primerpárok segítségével készítettük (forward: CAGGATCTTGGTGCCAGCT és reverse: TGTGGTCAGTGTGGGTCATG, GenBank szám: NM_019065.2). A tisztított NECAB2 PCR termékeket ezután a próbára specifikus *forward* primerszekvenciával és egy T7 RNS-polimeráz felismerési helyet tartalmazó *reverse* primerszekvenciával sokszorosítottuk. Végül a T7 RNS-polimeráz felismerési szekvenciát tartalmazó cDNS termékekről T7 RNS-polimeráz enzim segítségével RNS próbákat szintetizáltunk.

Az *in situ* hibridizációs vizsgálatokhoz két alany frissen fagyasztott DMPFC agyblokkját használtuk fel: egyet egy 75 éves kontroll női alanytól, akinek jelentősebb betegségekre utaló klinikai jelentései nem voltak, illetve egyet egy 72 éves öngyilkos női alanytól. Kriosztát segítségével sorozatos 12 µm vastag koronális metszeteket vágunk, és pozitív töltésű tárgylemezekre (Superfrost Plus, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) rögzítettünk. A metszeteket felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A további lépéseket Dobolyi és mtsai. (295) által korábban leírt eljárás szerint végeztük. Röviden, antiszensz [35S] UTP-vel jelölt riboprobákat állítottunk elő a fent leírt DNS próbákból MAXIscript transzkripció kit (Ambion, Austin, Texas, USA) segítségével. A hibridizációt megelőzően a szöveteket 30 percig RNáz A-val inkubáltuk. A hibridizáció és mosásokat követően a tárgylemezeket Kodak NTB autoradiográfias emulzióba (Eastman Kodak, Rochester, New York, USA) mártottuk majd 4 °C-on 3 hétig tároltuk. Ezt követően a tárgylemezeket Kodak Dektol előhívóval, illetve Kodak fixálóval hívtuk elő.

3.7.2. Immunhisztológiai vizsgálatok

A NECAB2 fehérje DMPFC-ben való eloszlásának felmérésére immunhisztokémiát alkalmaztunk. Az immunjelöléshez egy 62 éves kontroll női egyén DMPFC agyblokkját használtuk fel. A metszésre szánt, kb. 0,5 cm vastag blokkot 4%-os paraformaldehidet tartalmazó 0,1 M foszfát pufferben (PB) 5 napig fixáltuk. Ezt követően a blokkot 0,1% nátrium-azidot tartalmazó PB-ben áztattuk 2 napig, hogy eltávolítsuk a felesleges paraformaldehidet. Ezután krioprotekció céljából a blokkot 20% szacharózt tartalmazó PB-ben áztattuk 2 napig. A blokkot fagyasztást követően mikrotom segítségével 60 µm vastag koronális metszetekre vágtuk. A metszeteket 0,1% nátrium-azidot tartalmazó PB-ben gyűjtöttük össze, és további feldolgozásig 4 °C-on tároltuk.

A diamino-benzidin (DAB) immunjelölés során a fixált DMPFC szeleteket 3%-os szarvasmarha szérumalbumin (0,5% Triton X-100 oldatot tartalmazó 0,1 M PB-ben, Sigma) pufferben oldott nyúl anti-NECAB2 antitesttel jelöltük (1:250; Thermo Fisher Scientific). A jelölést 24 órán át szobahőmérsékleten végeztük. Az inkubálást követően a metszeteket 3x10 percig 0,1 M PB-ben mostuk, majd PB-ben oldott biotinilált másodlagos antitestben 1 órán át (1:1000; Vector Laboratories, Mowry Ave, Newark, California, USA), majd avidin-biotin-peroxidáz elegyében (1:500; Vector Laboratories) szintén 1 órán át inkubáltuk. Ezután a jelölést 0,02% 3,3-DAB-t (Sigma), 0,08% nikkell(II)-szulfátot és 0,001% hidrogén-peroxidot tartalmazó 100 mM Trizma pufferben tettük láthatóvá. A metszeteket üveglemezre húztuk, dehidratáltuk és Cytoseal 60-nal lefedtük (Stephens Scientific, Riverdale, New Jersey, USA).

A NECAB2 kolokalizációjának vizsgálatára kettős immunfluoreszcens festést alkalmaztunk. Az autofluoreszcencia csökkentése érdekében a szöveti metszeteket 70%-os etanolban oldott 0,15%-os Sudan Black B-vel kezeltük. Ezt követően a metszeteket 3%-os szarvasmarha szérumalbumin (0,5% Triton X-100 oldatot tartalmazó 0,1 M PB-ben, Sigma) pufferben 1 órán át blokkoltuk szobahőmérsékleten. A NECAB2 immunjelölést (1:250) fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-tiramid (1:8000), 0,003% H₂O₂ és 100 mM Trizma puffer elegyével hívtuk elő. Ezt követően a metszeteket 3x10 percig 0,1 M PB-ben mostuk, majd szintén 3%-os szarvasmarha szérumalbumint tartalmazó pufferben (0,5% Triton X-100 0,1 M PB-ben, Sigma) oldott kecske anti-ionizált kalcium-kötő adaptor molekula-1 (IBA1) (1:500; Abcam, Cambridge, UK) és egér anti-S100 kalcium-kötő fehérje (S100) (1:250; Millipore, Molsheim, Franciaország) antitestekkel

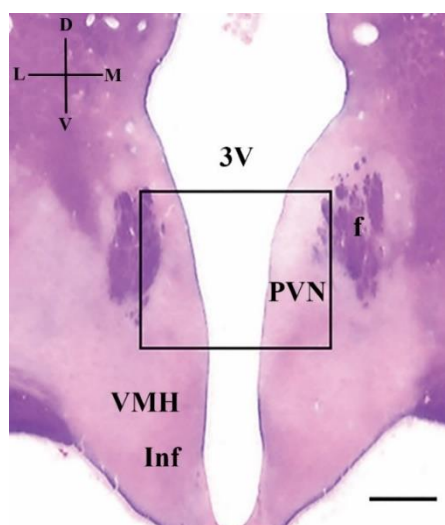
24 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Inkubálás után a metszeteket 3x10 percig 0,1 M PB-ben mostuk, ezt követően Alexa 594-gyel jelölt szamar anti-kecske/egér másodlagos antitesttel 2 órán át (1:500; Vector Laboratories) inkubáltuk. Végül az összes fluoreszcensen jelölt metszetet pozitív töltésű tárgylemezre (Superfrost Plus, Fisher Scientific) húztuk és fakulásgátló fedőanyaggal (Prolong Antifade Kit, Thermo Fisher Scientific) fedtük.

3.8. A GLP-1R expressziójának vizsgálata 2-es típusú cukorbetegekben

Annak megállapítására, hogy a T2DM betegségben szenvedő személyek GLP-1R expressziójában változások következnek-e be a hipotalamusz egy meghatározott részében, a PVN régióban, kvantitatív expressziós vizsgálatokat végeztünk.

3.8.1. A hipotalamusz paraventriculáris magjának preparációja

A hipotalamuszból származó posztmortem agyszöveti mintákat szintén a Humán Agyszövet Banktól (Semmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország) szereztük be. A preparált hipotalamikus minták a paraventriculáris magi régióknak felelnek meg (2. ábra).



2. ábra: Az emberi agy hipotalamikus régiójának reprezentatív képe beleértve a PVN-t. A humán hipotalamusz koronális metszete, amely tartalmazza a preparált PVN régiót. A kísérletekhez disszekált területet fekete téglalap határolja. A hipotalamikus metszetet Levanol-Fast Cyanine 5RN módszerrel festettük, az ábrán a skála mérete 2 mm-t jelöl. Rövidítések: 3V: harmadik agykamra, f: fornix, Inf: infundibuláris mag, PVN: paraventriculáris hipotalamikus mag, VMH: ventromediális hipotalamikus mag, D: dorsális, L: laterális, M: mediális, V: ventrális.

A mintákat 18 alanyból gyűjtöttük: 9 cukorbetegségben nem szenvedő kontroll alanyból (4 nő és 5 férfi, átlagéletkor 71,1±3,8 év), és 9 T2DM betegből (4 nő és 5 férfi, átlagéletkor 77,4±2,6 év) (3. táblázat). Klinikai leírások alapján a 9 T2DM beteg közül ketten metformint (Merckformin vagy Meforal), illetve további két beteg szulfonilureát, például gliklazidot (Gliclada vagy Diaprel) szedett, azonban a diabéteszes betegek egyike sem részesült GLP-1R agonista kezelésben. A mintákat olyan elhunytakból gyűjtöttük be, akiknek a boncolása során a koponyából történő agykivétel a halál beállta után 1-10 óra között volt. A kiemelt agyakból szeleteket készítettük, melyeket száraz jégen azonnal lefagyasztottuk, majd a mikrodisszekcióig -80 °C-on tároltuk. A mikrodisszekcióhoz sorozatos koronális metszeteket vágunk a diencephalonból. Az MNI standard tér kiindulópontjától 4,0 mm-re lévő szakaszokat (269) speciális, 1-2 mm belső átmérőjű tüket használva kilyukasztottuk (270, 271). A disszekált szöveti mintákat 1,5 ml-es Eppendorf-csővekbe gyűjtöttük, és felhasználásig -80 °C-on tartottuk.

3. táblázat: A kísérletben szereplő kontroll és diabéteszes személyek demográfiai adatai.

#Donor	Kísérleti csoport	Nem	Kor (év)	Poszt-mortem idő (óra)	Halálok	Klinikai és patológiai diagnózisok
1	kontroll	nő	72	4,5	akut légzési elégtelenség	hipertónia
2	kontroll	férfi	67	5	tüdőembólia	hipertónia
3	kontroll	nő	81	5	stroke, agyvérzés	általános érlemeszesedés
4	kontroll	férfi	80	2	stroke	hipertónia, koszorúérlemeszesedés
5	kontroll	nő	70	7	stroke	hipertónia
6	kontroll	férfi	65	10	stroke, bronchopneumonia	hipertónia, koszorúérlemeszesedés
7	kontroll	nő	95	4	stroke	hipertónia, érlemeszesedés
8	kontroll	férfi	52	8	-	krónikus alkoholizmus

#Donor	Kísérleti csoport	Nem	Kor (év)	Poszt-mortem idő (óra)	Halálok	Klinikai és patológiai diagnózisok
9	kontroll	férfi	66	9	stroke	légzési és keringési elégtelenség
10	T2DM	nő	69	3	stroke	légzési elégtelenség, hipertónia
11	T2DM	férfi	67	10	pneumonia, légzés és keringési elégtelenség	nyombélfekély
12	T2DM	nő	75	10	stroke	általános érleszesedés, mamma carcinoma
13	T2DM	férfi	79	6	stroke	hipertónia, cardiomyopathia
14	T2DM	nő	92	4	oedema cerebri	légzési és keringési elégtelenség, érleszesedés, veseelégtelenség, hipertónia
15	T2DM	férfi	74	3	stroke, oedema cerebri	hipertónia, prostata carcinoma
16	T2DM	nő	85	8	stroke	hipertónia, érleszesedés
17	T2DM	férfi	79	10	stroke, légzési és keringési elégtelenség	elhízás, polyneuropathia
18	T2DM	férfi	77	5,5	stroke, bronchopneumonia	krónikus alkoholizmus, légzési és keringési elégtelenség

3.8.2. RNS extrakció és RT-qPCR analízis

A szöveti minták feldolgozása és a mintákból történő RNS extrakció a 4.6. pontban leírtaknak megfelelően történt. A RT-qPCR analízishez használt primereket az IDT gyártotta, melyeket 300 nM végső koncentrációban használtuk. Az analízis során használt GLP-1R primerpár a következő: *forward* CCCCAGACACATTCTCCTGT és *reverse* AGCAAATAAGGGGTGCCTTT. A belső kontroll gének, mint az ACTB, GAPDH és LDHA primer szekvenciái a 2. táblázatban láthatók. A relatív génexpressziós értékeket a GLP-1R és a housekeeping gének átlag expressziójának arányából $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel számoltuk ki.

3.8.3. Fehérje extrakció

Az RNS extrakció után visszamaradt frakcióból totál fehérjét izoláltunk a korábban leírtak szerint (296). Röviden, a DNS kicsapása után a fehérjék denaturálását izopropanol hozzáadásával végeztük. A fehérje csapadékot kétszer mostuk 95%-os etanolban oldott guanidin-hidrokloriddal (0,3 M), majd a fehérjecsapadékot vákuum technikával szárítottuk. A száraz fehérje csapadékokat proteáz inhibitorokkal kiegészített 1%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS) oldatban oldottuk fel. A fehérje koncentrációt BCA kit (Sigma) segítségével határoztuk meg, ahol standard hígítási sorhoz szarvasmarha szérumalbumint (Sigma) használtunk.

3.8.4. Western blot analízis

A Western blot vizsgálathoz 20 μ g totál fehérjét használtunk a PVN mintákból. A lizátumokat 15%-os SDS-poliakrilamid gélben szeparáltuk, majd a futtatás után a fehérjéket nitro-cellulóz membránra blottoltuk át (Bio-Rad Laboratories). Az aspecifikus kötések elkerülése érdekében a membránt 5% sovány tejport tartalmazó Tween-Tris-pufferelt sóoldatban blokkoltuk (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH=7,6). A primer antitestes jelöléshez egér anti-GLP-1R antitestet (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) és egér anti-béta-aktin antitestet (1:10000; Sigma) használtunk, az inkubálást egy éjszakán át 4 °C-on végeztük. A GLP-1R antitesteket anti-nyúl (1:2000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA), a béta-aktin antitesteket pedig anti-egér (1:2000; Jackson ImmunoResearch,) torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel jelöltük (1 óra inkubációs idő

szobahőmérsékleten). A jelölődést Gel Doc XR+ képalkotó rendszerrel (Bio-Rad Laboratories) vizualizáltuk Clarity Western ECL előhívó oldatot használva (Bio-Rad Laboratories). A jelölt fehérjék molekulatömegét Spectra™ Multicolour High Range fehérje létra (Thermo Scientific) segítségével ellenőriztük.

3.9. Mikroszkópia

A DAB-al, illetve a fluoreszcensen immunjelölt metszeteket Olympus BX60 epifluoreszcens fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket 2048×2048 pixeles felbontásban rögzítettük SPOT Xplorer digitális CCD kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA) segítségével. A sötét látómezős képek nagyításhoz 4x-es objektívet, míg a világos látómezős képek nagyításához 4–40x-es objektívet használtunk. A többszörös fluoreszcens jelet tartalmazó metszetek képrögzítéséhez Zeiss LSM 70 típusú lézerkonfokális pásztázó mikroszkópot használtunk, ahol a nagyításhoz 40-63x-os objektívet alkalmaztunk. A varikozitások vizsgálhatósága érdekében a felvételeket 1 µm optikai szeletvastagság mellett készítettük. A képek kontrasztját és élességét Adobe Photoshop CS 8.0 program segítségével állítottuk be.

3.10. Statisztikai analízis

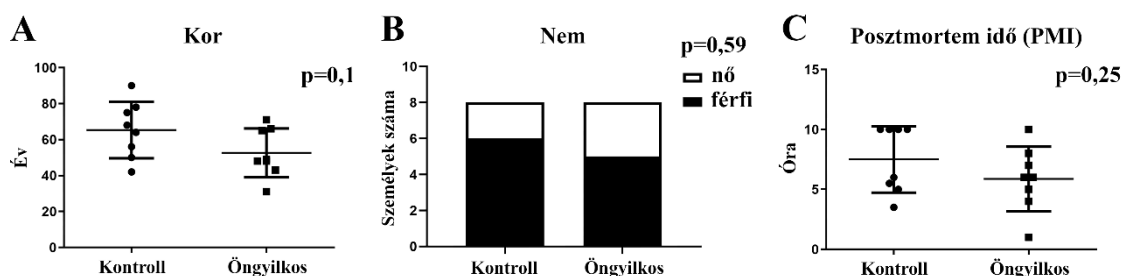
A demográfiai adatokat a Khi-négyzet teszt vagy Welch t-teszt ($p < 0,05$) segítségével hasonlítottuk össze. A *volcano plot* és *heatmap* ábrákat az R program segítségével készítettük (<https://www.r-project.org/>). Az RT-qPCR és Western blot eredmények kvantitatív kiértékelését a GraphPad Prism 8.0.1 szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) segítségével végeztük. A csoportok normális eloszlását Shapiro-Wilk teszttel, a két csoport értékeinek összehasonlítását pedig Welch t-teszttel vizsgáltuk. Abban az esetben, ha az adatok nem normál eloszlást mutattak, az összehasonlítást a nem-paraméteres Mann-Whitney U-teszttel végeztük. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak vettük, ha a p-érték 0,05-nél kisebb volt. Az adatokat az átlag ± SEM formájában adtuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Öngyilkos személyek DMPFC mintáinak transzkriptomikai vizsgálata RNS szekvenálással

4.1.1. A minta adatok elemzése

Eredményeink értelmezéséhez elengedhetetlen a minták számának és a csoportok demográfiai adatainak összehasonlítása (3. ábra). A demográfiai adatokat összehasonlítva az átlag életkor (3A ábra), a nemek aránya (3B ábra) és a posztmortem idő (PMI; 3C ábra) nem mutatott kimutatható különbséget az öngyilkos és a kontroll csoportok között.



3. ábra: A minták átlagéletkorának, a nemek arányának és a PMI összehasonlítása a kontroll ($n=8$) és az öngyilkos ($n=8$) csoportok között. Az összehasonlítás során egyik kovariáns esetében sem figyeltünk meg szignifikáns különbséget a csoportok között (életkor: $p=0,1$; nemek aránya: $p=0,59$; PMI: $p=0,25$).

A szekvenálás során átlagosan $62,9 \pm 3,6$ megabázis (Mb) teljes nyers leolvasást generáltunk a mintákból (4. táblázat). A nem megfelelő minőségű, adapter és/vagy ismeretlen szekvenciákat tartalmazó leolvasásokat nem vettük figyelembe a *downstream* elemzés során. Az átlagos tiszta leolvasási arány $91,9 \pm 0,5\%$, a referencia genommal való átlagos leképezési arány pedig $91,3 \pm 0,8\%$ volt, ami a posztmortem humán minták jó minőségű könyvtárépítési és szekvenálási adatait tükrözi (4. táblázat). Az átlagos leképezési arány a referencia génekkel $76,1 \pm 2,9\%$ volt (4. táblázat). Összesen 29 791 gént azonosítottunk, amelyből 28 088 volt ismert. A leolvasott szekvenciák (fragmentumok) körülbelül 67%-a fehérjét kódoló géneknek volt tulajdonítható. A fennmaradó fragmensek más RNS-osztályoknak tulajdoníthatók, beleértve a hosszú intergénikus szakaszokat, nem kódoló RNS-eket, pszeudogéneket, stb. Ezek a magas illesztési százalékok mind arra utalnak, hogy a szekvenálási adatok alkalmasak további *downstream* elemzésre.

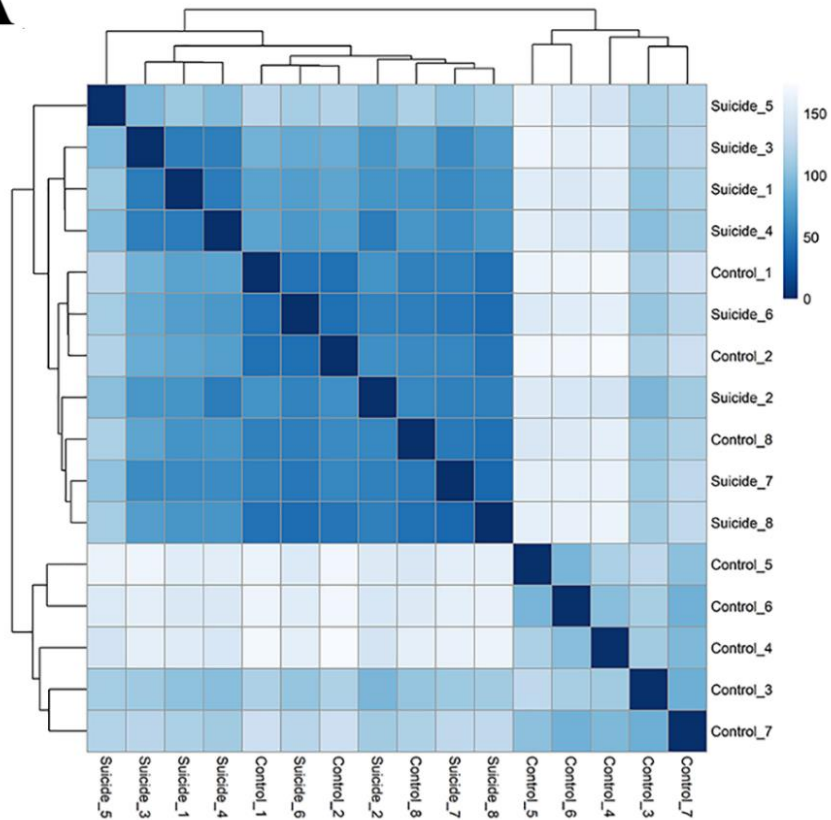
4. táblázat: A szekvenálás minőségi és géntérképezési adatai.

Minták	Teljes nyers leolvasás (Mb)	Teljes tiszta leolvasás (Mb)	Tiszta leolvasás aránya (%)	Teljes leképezés aránya (%)	Teljes leképezés aránya a génekre (%)
Kontroll_1	74,2	67,04	90,36	94,04	89,8
Kontroll_2	75,78	68,31	90,14	93,28	87,9
Kontroll_3	37,53	33,71	89,83	91,63	75,2
Kontroll_4	49,23	46,85	95,15	90,57	74,9
Kontroll_5	56,51	50,2	88,82	90,86	81,2
Kontroll_6	58,45	52,75	90,25	91,26	83,2
Kontroll_7	71,61	66,66	93,1	89,88	68,2
Kontroll_8	75,2	70,3	93,49	93,57	82,8
Öngyilkos_1	72,24	66,92	92,64	92,34	75,2
Öngyilkos_2	37,18	34,31	92,29	91,75	72,9
Öngyilkos_3	75,2	70,26	93,43	90,35	66,1
Öngyilkos_4	61,23	55,19	90,14	89,53	67,5
Öngyilkos_5	41,98	37,87	90,21	80,85	41,8
Öngyilkos_6	72,69	68,14	93,74	93,76	87,6
Öngyilkos_7	72,69	67,83	93,32	93,17	80,2
Öngyilkos_8	74,79	69,53	92,96	93,58	83,4

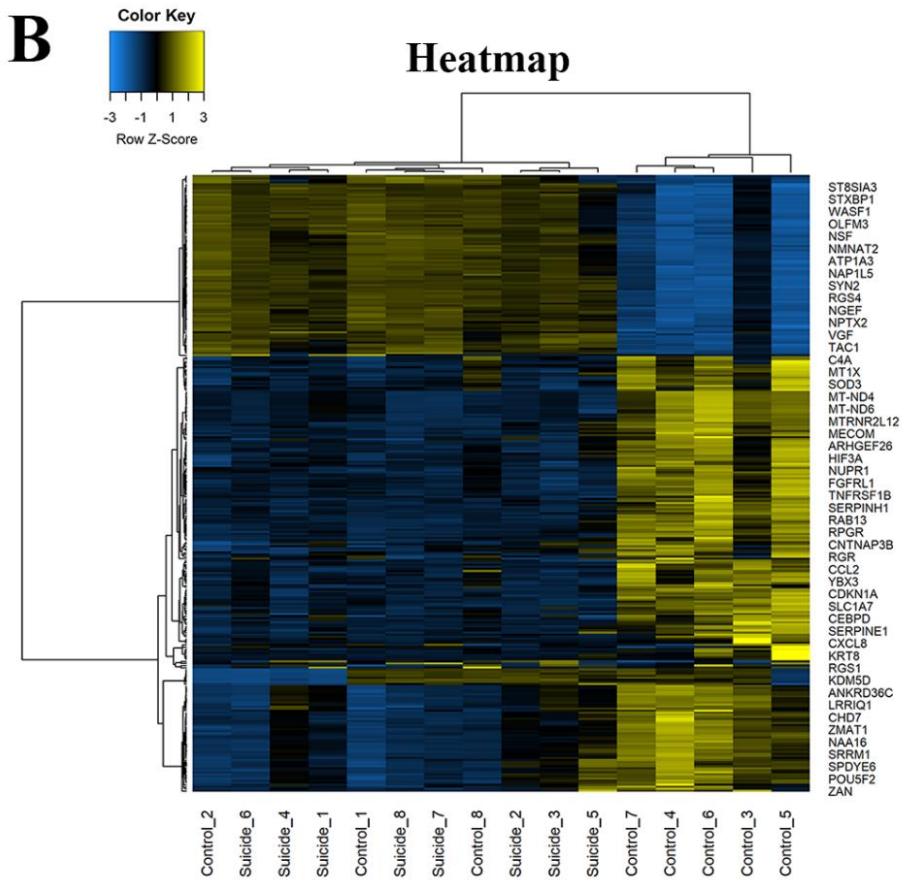
4.1.2. Az öngyilkos és kontroll csoportok közötti DEG-ek azonosítása

Az változó génexpresszió elemzés első lépése a minták általános hasonlóságának felmérése, amely megadja, hogy mely minták hasonlítanak egymáshoz, melyek különböznek egymástól, illetve megfelelnek-e a kísérlet tervében megfogalmazott elvárásoknak. Az egyes génexpressziós profilok közötti hasonlóság meghatározására többféle módszert használhatunk, például a Pearson korrelációt, Euklideszi távolságot, Manhattan távolságot, stb. A minták közötti hasonlóság mértékét a minták génexpressziós tulajdonságaik közötti korreláció alapján felépített hierarchikus fákön (dendogramokon) ábrázolhatjuk (4. ábra).

A



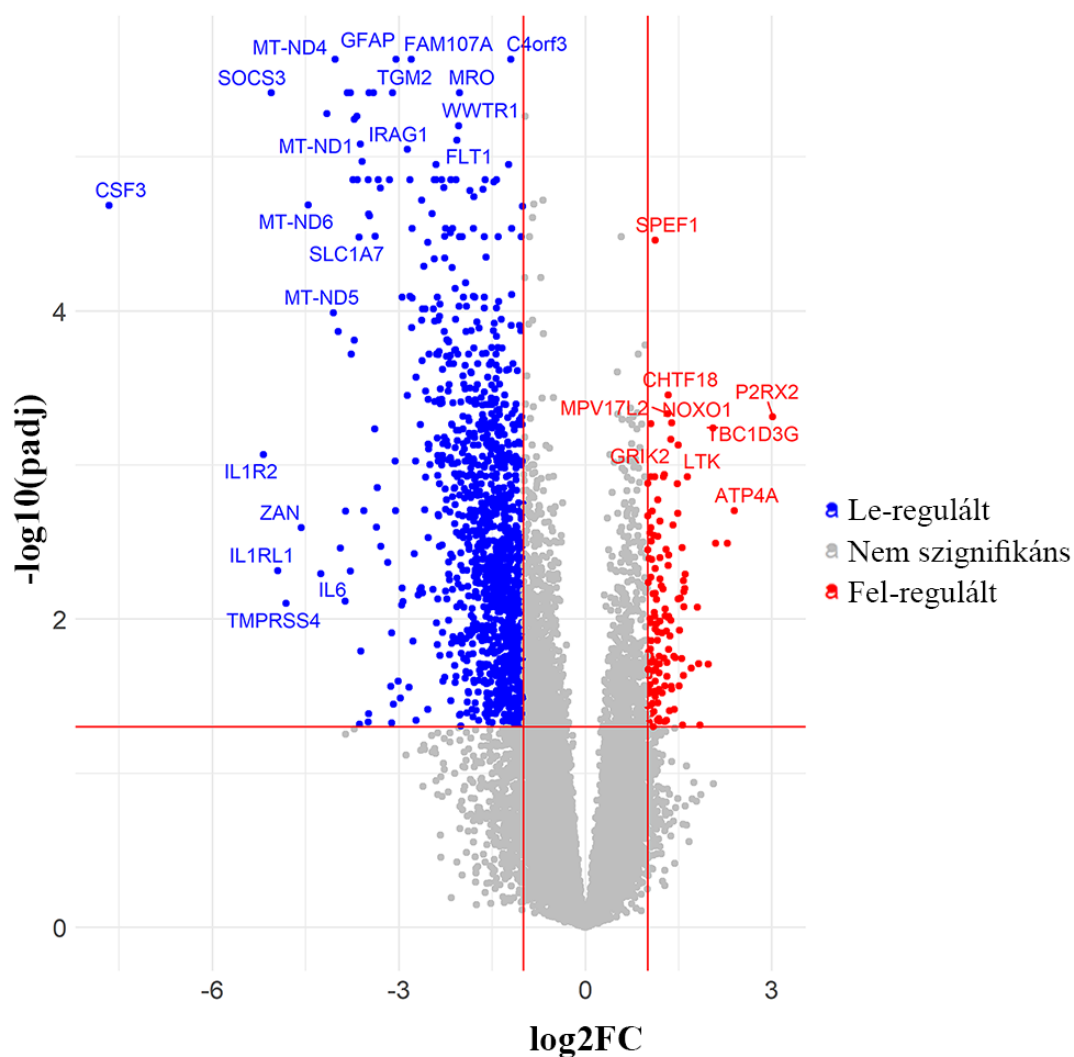
B



4. ábra: *A kontroll és öngyilkos csoportok közötti génexpresszió elemzése. (A) A kontroll és öngyilkos minták hierarchikus klaszteranalízise a minták közötti euklideszi távolság alapján. Az ábrán hierarchikus fa (dendogram) szemlélteti a minták közötti hasonlóságokat és eltéréseket, amelyeket a mintákból származó expressziós adatok log transzformációjából számoltunk. (B) A kontroll (Control) és öngyilkos (Suicide) egyének expressziós hasonlóságának hierarchikus hő térkép (Heatmap) analízise Pearson korrelációval. A hő térkép klaszteranalízis során a mintákat és géneket hasonló expressziós tulajdonságuk szerint csoportosítottuk. Az x tengely mentén a hasonló expressziós tulajdonságokkal rendelkező minták hierarchikus csoportokba rendeződnek, míg az y tengelyen ugyanez figyelhető meg a hasonló expressziójú gének esetében. A hő térkép 500 fehérjét kódoló gén expresszióját reprezentálja, amelyek hasonlóságát a bal oldali dendogram szemlélteti. A hő térképen szereplő géneket a minták közötti variabilitásuk alapján választottuk ki. A hő térkép színe (Color Key) a log10 transzformált génexpresszió mértékét adja meg, ahol a kék az alacsonyan expresszáldó, a fekete a közepesen, míg a sárga a magasan expresszáldó géneket jelöli.*

Vizsgálataink során a minták hasonlóságának jellemzésére két módszert, az Euklideszi távolságot (4A ábra) és a Pearson korrelációt (4B ábra) használtuk. A kontroll és öngyilkos minták hierarchikus klaszteranalízisét mind a differenciáltan expresszáldó gének felhasználásával végeztük. Vizsgálataink alapján az öngyilkos minták jól elkülönültek 5 kontrolltól, de további 3 kontrolltól kisebb mértékű volt az elkülönülés (4A és B ábra).

Miután megkaptuk az egyes génekhez tartozó leolvasásokat, az öngyilkos áldozatok génexpressziójának elemzésére DESeq2 módszert használtunk. Ez a módszer statisztikai próbák segítségével képes szűrni a valódi változásokat egy adott rendszeren belül. A DMPFC-ben 19692 fehérjét kódoló gén expresszióját detektáltuk, amelyek közül 1400 eltérően expresszáldott a kontroll és öngyilkos csoportok között. A DEG-ek közül 1262 gén expressziója lecsökkent, míg 138 gén expressziója megnövekedett (5. ábra).



5. ábra: Az RNS szekvenálási eredmények elemzése és bemutatása volcano plot ábrán. Az adatok elemzése során a statisztikai adatszűrés paramétereit az alábbiak voltak: az öngyilkos csoportban a kontroll csoporthoz képest legalább kétszeres expresszió növekedés vagy csökkenés ($\log_2FC > \pm 1$), amely expresszió változás statisztikailag szignifikáns (Benjamini és Hochberg többszörös hipotézis korrigált p-érték [$padj$] $< 0,05$). Az ábrán az x tengely a gének expressziójának változását (\log_2FC), míg az y tengely a változás erősségét mutatja meg ($-\log_{10}[padj]$). Minden pont egy gént jelöl: a kék és piros pontok azokat a DEG-eket jelölik, amelyek megfeleltek a szelektációs kritériumoknak ($\log_2FC \geq 1$ vagy ≤ -1 , illetve $padj < 0,05$). A fel-regulált gének piros, míg az le-regulált gének kék színnel vannak jelölve, továbbá a szignifikánsan nem változó gének szürkék az ábrán. A 29 legkiemelkedőbb gén neve meg lett jelenítve az ábrán.

4.1.3. A DEG-ek funkcionális annotációja és osztályozása

Annak megértésére, hogy a DMPFC változó génjei hogyan kapcsolódnak az öngyilkos viselkedés patofiziológiájához, a DEG-eken GO analízist végeztünk. A GO konzorcium adatbázisa egy átfogó, naprakész biológiai adatbázis, amelyet forrásként használnak a kódoló és nem kódoló gének jelenlegi tudományos jellemzésére. A GO használatával információt kapunk a génekről kifejeződő fehérjék biológiai folyamatairól, molekuláris funkciójáról, valamint a sejten belüli elhelyezkedésükről. Nagy génlisták esetében a módszer célja a felülreprezentált génfunkciók felderítése. Az 5. táblázat a 10 legfőbb le- és fel-regulált DEG-eket mutatja. A 3 legintenzívebben csökkent expressziójú gén a kolónia-stimuláló faktor 3 (CSF3), interleukin 1 receptor 2-es típus (IL1R2) és citokin jelátvitel szuppresszor 3 (SOCS3). Mindhárom gén kritikus szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban. A 3 legintenzívebben növekedett expressziójú gén a purinerg receptor P2X 2 (P2RX2), a Na⁺/K⁺ transzport ATP-áz alfa alegység (ATP4A) és egy jelenleg karakterizálatlan fehérjét kódoló gén, a LOC101059915. A P2RX2 és az ATP4A a plazmamembránban helyezkedik el, továbbá mindkettőnek szerepe van az ATP megkötésében és az iontranszportban is (5. táblázat).

5. táblázat: A táblázat a legfelső 10 le-, illetve fel-regulált DEG-eket és biológiai funkciójukat szemlélteti. A felsorolt géneket azok kiemelkedő log₂FC értékeik szerint listáztuk.

	Gén	Megnevezés	log₂FC	p-érték	Biológiai funkció
le-regulált gének	CSF3	kolónia-stimuláló faktor 3	-7,67	5,84E-08	citokin stimulusra adott celluláris válasz
	IL1R2	interleukin 1 receptor 2-es típus	-5,18	1,74E-05	citokin-közvetített jelátviteli útvonal
	SOCS3	citokin jelátviteli szuppresszor 3	-5,05	1,81E-09	citokin-közvetített jelátviteli útvonal szabályozása
	IL1RL1	interleukin 1 receptor szerű 1	-4,95	2,66E-04	interleukin-33-közvetített jelátviteli útvonal

	Gén	Megnevezés	log2FC	p-érték	Biológiai funkció
le-regulált gének	TMPRSS4	transzmembrán szerin proteáz 4	-4,81	5,66E-04	szerin-típusú endopeptidáz aktivitás, fehérje metabolizációs folyamatok
	ZAN	zonadhezin	-4,57	1,01E-04	sejt adhézió
	MT-ND6	mitokondriálisan kódolt NADH-ubikinon oxidoreduktáz lánc alegység 6	-4,46	5,71E-08	mitokondriális elektron transzport
	IL6	interleukin-6	-4,26	2,89E-04	interleukin-6-közvetített jelátviteli út vonal
	SERPINA3	serpin A család 3 tag	-4,16	3,80E-09	szerin-típusú endopeptidáz aktivitás, fehérje metabolizációs folyamatok
	MT-ND5	mitokondriálisan kódolt NADH-ubikinon oxidoreduktáz lánc alegység 5	-4,05	6,08E-07	mitokondriális elektron transzport
fel-regulált gének	P2RX2	P2X purinerg receptor 2	3,01	6,80E-06	extracellulárisan ATP-kapuzott kation csatorna aktivitás, ion transzport

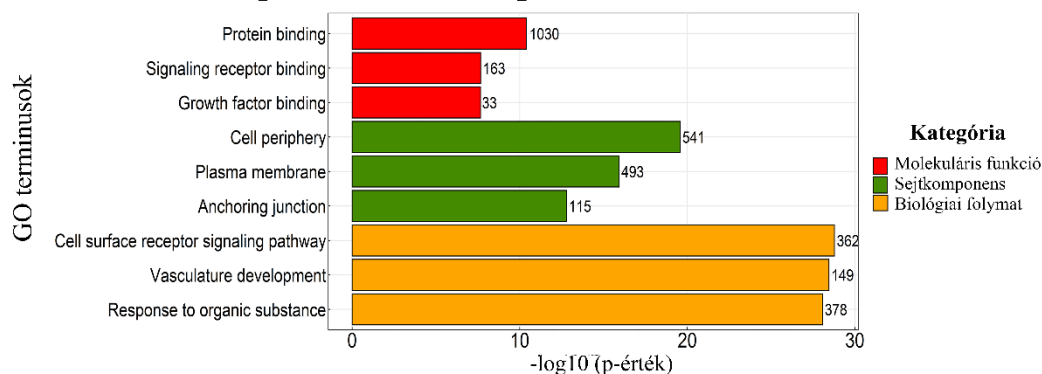
	Gén	Megnevezés	log2FC	p-érték	Biológiai funkció
fel-regulált gének	ATP4A	Na ⁺ /K ⁺ transzport ATP-áz alfa alegység	2,39	6,78E-05	kálium:proton cserélő ATPáz aktivitás, ion transzport
	LOC101059 915	X kromoszóma open reading frame 49-szerű	2,28	1,42E-04	AT-hook-tartalmú transzkripció faktor- szerű aktivitás
	TBC1D26	TBC1 domén család 26 tag	2,09	1,42E-04	GTPáz aktivátor aktivitás, fehérje transzport
	TBC1D3G	TBC1 domén család 3G tag	2,05	9,35E-06	GTPáz aktivátor aktivitás, fehérje transzport
	PROC	protein C, az Va és VIIIa alvadási faktorok inaktivátora	1,97	2,03E-03	poszttranszlációs fehérje módosítás, vezikula-közvetített transzport
	C6orf141	6-os kromoszóma open reading frame 141	1,84	7,70E-03	karakterizálatlan fehérje
	CARTPT	CART prepropeptid	1,82	1,99E-03	neuropeptid hormon aktivitás, fehérje szekréció szabályozás
	LOR	loricrin	1,80	6,17E-04	citoszkeleton szerkezeti eleme
	MSLNL	mesothelin-szerű fehérje	1,70	2,19E-03	sejt adhézió

A funkcionális annotációk során azonosítani tudjuk azokat az ontológiai terminusokat és biológiai útvonalakat, amelyek a véletlennél nagyobb mértékben dúsulnak a vizsgált génlistában, így a géneket egy könnyebben értelmezhető útvonalak kisebb listájaként foglalja össze. A le- és fel-regulált génlisták elemzése során szignifikáns különbségeket azonosítottunk olyan funkcionális útvonalakban, amelyekben több mint 500 le-regulált, illetve 37 fel-regulált gén érintett. A biológiai folyamat, a molekuláris funkció és a sejtkomponens kategóriákon belül a 3 legszignifikánsabban dúsult GO terminusok a le-regulált gének esetében a sejtfelszíni receptor jelátviteli útvonalhoz (GO:0007166) és a fehérje kötődéshez (GO:0019838) kapcsolódó gének felülreprezentálódtak, míg a fel-regulált gének körében a szinaptikus jelátviteli útvonalhoz (GO:0099536) és a nátriumcsatorna-aktivitáshoz (GO:0005272) tartozó gének az öngyilkosok DMPFC-ben (6A ábra). A változó gének további elemzése érdekében a KEGG és a Reactome adatbázisok használatával listáztuk azokat a szignifikánsan dúsult biológiai utakat, amelyek a depresszió vagy öngyilkosság patomechanizmusában potenciálisan részt vehetnek. A 3 legszignifikánsabban dúsult KEGG és Reactome útvonal a 6B ábrán látható.

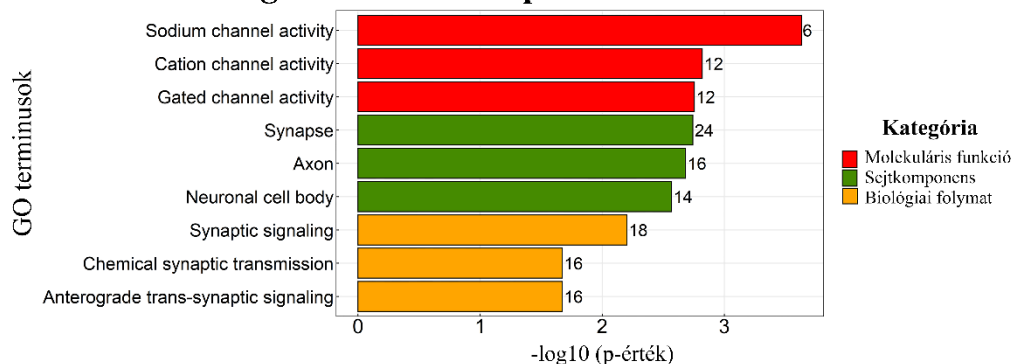
Összesen 23 szignifikánsan dúsult és lefelé szabályozott KEGG útvonalat és 25 szignifikánsan dúsult és lefelé szabályozott Reactome útvonalat azonosítottunk, míg 1 szignifikánsan dúsult és felfelé szabályozott KEGG útvonalat, illetve 2 szignifikánsan dúsult és felfelé szabályozott Reactome útvonalat találtunk ($p < 0,05$) (Táblázatot az adatok terjedelme miatt nem tudunk bemutatni, a részleteket lásd a publikált cikkünk 2. kiegészítő fájljában (297)).

A

A le-regulált DEG-ek top 9 GO terminusai

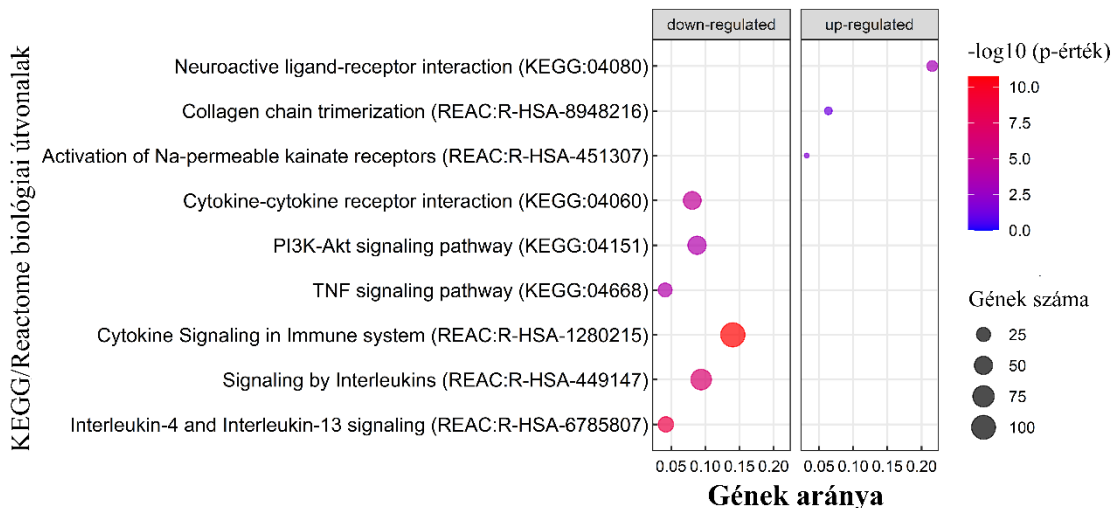


A fel-regulált DEG-ek top 9 GO terminusai



B

A le- és fel-regulált DEG-ek dúszult biológiai útvonalai

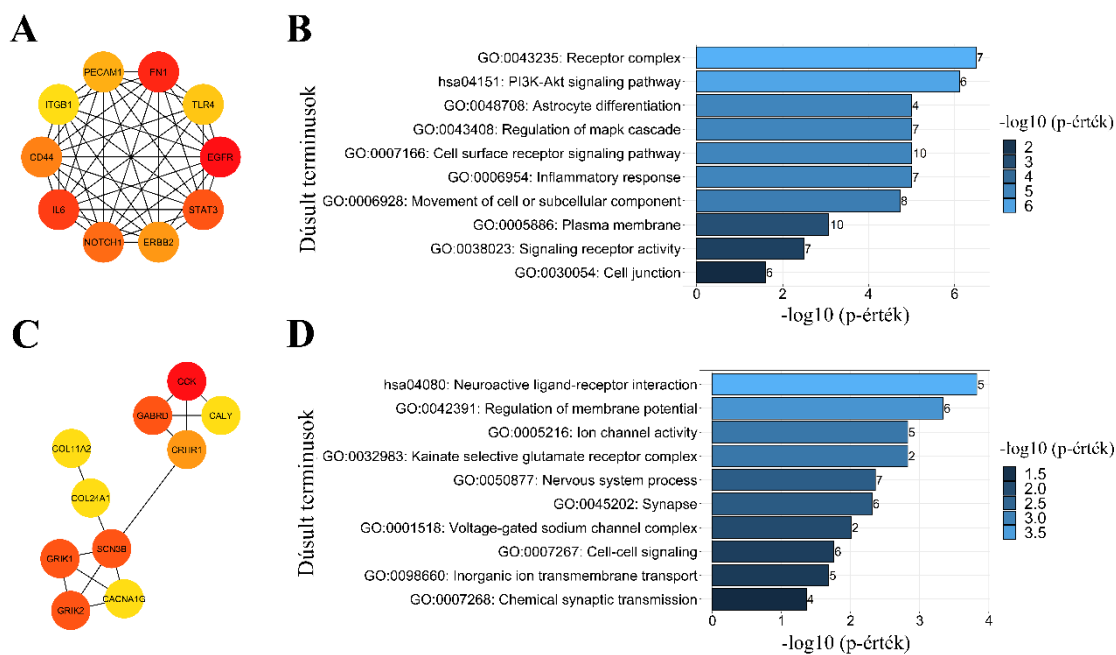


6. ábra: A DEG-ek funkcionális annotációja. (A) A 9 legszignifikánsabban felülreprezentált le- és fel-regulált génekhez kapcsolódó GO terminusokat oszlop diagrammon ábráztuk. A diagram minden egyes GO terminushoz megadja az adathalmazban lévő annotált gének számát és a dúszulás szignifikanciáját (-log₁₀[p-érték]). A színek arányos a három ontológiai osztállyal. (B) A KEGG és Reactome adatbázis elemzések során a felfelé és lefelé szabályozott gének 3 legszignifikánsabban

dúsult biológiai útvonalainak annotációját pontdiagram szemlélteti. Az x tengely a dúsult gének arányát jelenti, amely a változó gének és az adott útvonal teljes annotált génjeinek az arányát adja meg. Az y tengely a biológiai útvonalak terminusait tartalmazza. Minél nagyobb az x tengely értéke, annál jelentősebb a gének dúsulása. A kör mérete az egyes dúsult útvonalakhoz tartozó DEG-ek számát jelzi, míg a kör színe a dúsulás mértékét ($-\log_{10}[p\text{-érték}]$) adja meg.

4.2. A DEG-ek közötti fehérjekapcsolat vizsgálata és a hub fehérjék azonosítása

A STRING adatbázis segítségével nem irányított interakciós hálózatokat alkottunk külön a le- és fel-regulált DEG-ek által kódolt fehérjékből, amelyek kapcsolatrendszerének szemléletes megjelenítésére, illetve további hálózati analízis céljából átvittünk a Cytoscape szoftverbe (v3.8.2). A PPI hálózat analízisének egyik lehetősége a kiemelkedő fontossággal is bíró hub fehérjék azonosítása. A legkiemelkedőbb hub fehérjék analízisét a cytoHubba beépülő modul segítségével végeztük. A 7A és C ábrán a 10 legnagyobb fokszámú le- és fel-regulált hub fehérjék láthatók. A le-regulált hubok funkciójának analízise során megfigyeltük, hogy ezek a fehérjék kiemelkedő szerepet játszanak az asztrocita differenciációban és a gyulladásoz folyamatokban (7B ábra). A fel-regulált hubok zömében a membránpotenciál szabályozásában vesznek részt, illetve a fehérjék többsége a szinapszisokban található (7D ábra). Az AHBA adatbázis adatai alapján a legtöbb leszabályozott hub fehérje bőségesen expresszálódik asztrocitákban, míg a 10 legkiemelkedőbb fel-regulált hub fehérjék a serkentő és gátló neuronokban expresszálódnak, de expressziójuk megfigyelhető az oligodendrocitákban is.



7. ábra: Az RNS szekvenálás alapján szignifikánsan változó DEG-ek PPI hálózatának 10 legkiemelkedőbb le- és fel-regulált hub fehérjéje és azok biológiai annotációja. (A, C) A le- és fel-regulált PPI hálózatok 10 legkiemelkedőbb hub fehérjéjét a CytoHubba plugin segítségével azonosítottuk. (A) A csökkent expressziójú gének 10 legnagyobb fokszámmal rendelkező hub-jai, (C) az emelkedett expressziójú gének 10 legnagyobb fokszámmal rendelkező hub-jai láthatóak. Minél mélyebb árnyalatú (pirosabb) a csúcsok színe, annál nagyobb a csúcsok fokszáma. (B, D) A top hub fehérjék GO és KEGG biológiai útvonal analízisét stringApp segítségével végeztük. A (B) a 10 legnagyobb fokszámú csökkent expressziójú hubok felülreprezentált GO és biológiai útvonal annotációját, míg a (D) a 10 legnagyobb fokszámú emelkedett expressziójú hubok felülreprezentált GO és biológiai útvonal annotációját szemlélteti. A grafikonokon az y tengely a dúsult GO és biológiai útvonalakat, az x-tengely pedig a dúsulás szignifikanciáját adja meg (-log₁₀ [p-érték]), amelyet színkóddal is jelöltünk. Minden oszlop mellet megtalálható az annotált gének száma.

4.3. A DEG-ek ko-expressziós hálózat analízise és a hálózaton belüli hub gének azonosítása

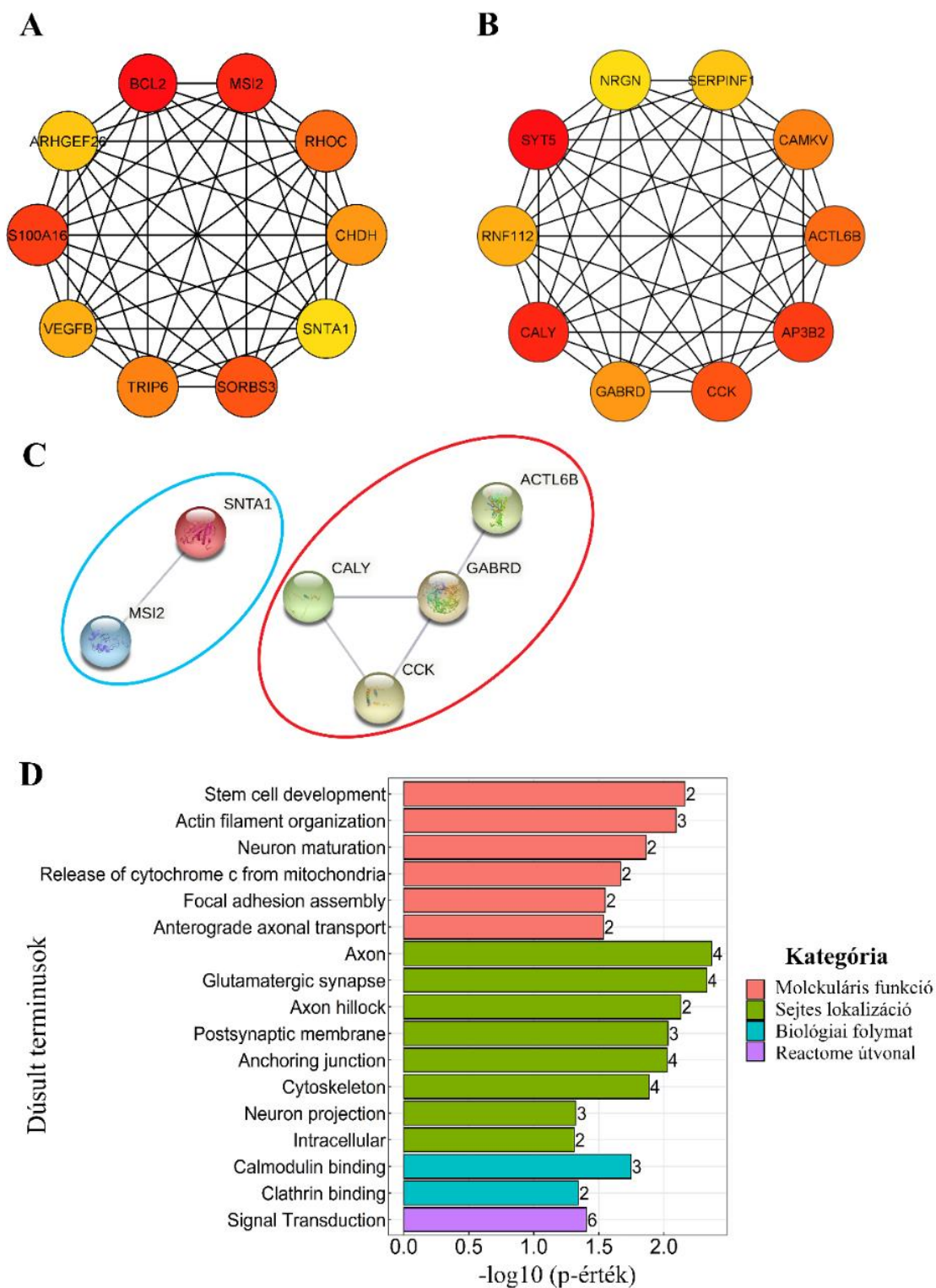
A gén ko-expressziós hálózat analízist a génextpressziós profilok és fenotípusok közötti összefüggések feltárására használtuk. Továbbá a változó gének ko-expressziós hálózatelemzésén túl meghatároztuk az öngyilkos viselkedés háttérében húzódo

patomechanizmusokat és kulcsfontosságú géneket. Két független ko-expressziós hálózatot alkottunk a le- és fel-regulált gének számára, hogy azonosítsuk a le- és felregulált gének közötti moduláris kapcsolatokat. A két gén közötti ko-expresszió mértékét a hagyományos Pearson-féle korrelációs együttható felhasználásával végeztük. A ko-expressziós hálózat gyenge korrelációjú génpárjainak kiszűrésére, így az analízis megbízhatóságának növelése érdekében szigorú paramétereket határoztunk meg: csak azokat a génpárokat tekintettük erősen és szignifikánsan ko-expresszálnak, amelyek Pearson-korrelációja $\geq 0,9$ és a korreláció p-értéke $< 0,01$ volt.

A le-regulált DEG-ek ko-expressziós hálózatának elemzése során a gének 56%-a (710 gén) mutatott szignifikáns korrelációt, amelyek 21 funkcionális klasztert alkottak. Az első klasztert olyan szignifikánsan felülreprezentált és hasonló expresszióval rendelkező gének alkotják, melyek többsége összehangolt módon vesznek részt az idegi prekurzor-sejt proliferáció szabályozásában (GO:2000179) vagy az asztrocita differenciációban (GO:0048708). A második klaszter génjeinek többsége az epiteliális sejt differenciáció (GO:0030856) vagy az interferon-béta termelés szabályozásában (GO:0032648), míg a harmadik klaszterhez tartozó gének többsége a védekező válasz negatív szabályozásában (GO:0031348), illetve az I-es típusú interferon szignalizációban (GO:0060337) vesznek részt (az adatok terjedelme miatt a teljes táblázatot lásd megjelent cikkünk 5. kiegészítő fájljában (297)).

A fel-regulált DEG-ek ko-expressziós hálózatának elemzése során a gének 70%-a (97 gén) mutatott szignifikáns korrelációt, amelyek géncsoportosulásának vizsgálatakor 6 különböző klasztert azonosítottunk. Az első klaszter génjei szignifikánsan felülreprezentálódtak a neurotranszmitter receptor internalizációt (GO:0099590) és a biotin metabolizmust (GO:0006768) érintő folyamatokban. A második klaszter génjei olyan biológiai folyamatokban érintettek, mint a nátriumcsatorna aktivitás (GO:0005272) vagy a neuropeptid hormon aktivitás (GO:0005184). A harmadik klasztert alkotó gének többsége a NADPH oxidáz komplex (oxidatív stressz) (GO:0043020) vagy az aromataz aktivitás (ösztrogén szintézis) (GO:0070330) biológiai folyamatokban vesznek részt (lásd megjelent cikkünk 5. kiegészítő fájljában (297)).

A Cytoscape egyik beépülő moduljával a CytoHubba-val elemeztük a le- és fel-regulált ko-expressziós hálózatok legkiemelkedőbb hub-jait azok MCC értékeik alapján (8A és B ábra).



8. ábra: A le- és fel-regulált gén ko-expressziós hálózatok hub analízise. A változó gének ko-expressziós hálózatának legkiemelkedőbb hub génjeit azok MCC értékeik alapján rangsoroltuk a CytoHubba beépülő modul segítségével. (A) a csökkent expressziójú gének ko-expressziós hálózatának 10 kiemelkedő hub-ját, (B) pedig az emelkedett expressziójú

gének ko-expressziós hálózatának 10 kiemelkedő hub-ját mutatja be. A csúcsok színe a hozzájuk tartozó centralitás fokát tükrözi, azaz minél mélyebb árnyalatú (pirosabb) a szín, annál nagyobb a csúcsok MCC értéke. (C) A hub gének fehérje interakciós hálózatának elemzését a STRING online adatbázis segítségével végeztük. A kék kör a le-regulált hubok interakciós hálózatát jelöli, míg a piros kör a fel-regulált hubok fehérje kölcsönhatását jelzi. (D) Az oszlopokra a le- és fel-regulált hub gének felülreprezentált GO és biológiai útvonal annotációját szemlélteti. A hub gének GO és Reactome útvonal annotációját a stringApp segítségével végeztük. A grafikonon az y tengely a dúsult GO és biológiai útvonalakat, az x-tengely pedig a dúsulás szignifikanciáját adja meg ($-\log_{10}$ [p-érték]). Minden oszlop mellett megtalálható az annotált gének száma, a színkód pedig arányos az ontológiai kategóriákkal.

A 10 le- és fel-regulált hub gén fehérje interakciós hálózatának elemzése során megfigyeltük, hogy a le-regulált gének közül kettő, a Musashi-2 (MSI2) és az alpha-1-syntrophin (SNTA1), illetve a fel-regulált gének közül négy, a calcyon neuron specifikus vezikuláris protein (CALY), a kolecisztokinin (CCK), a gamma-amino-vajsav A típusú receptor delta alegység (GABRD) és az aktin-szerű fehérje 6B (ACTL6B) gének fehérjetermékei funkcionális és fizikai kapcsolatban állnak egymással (8C ábra). A hub gének GO és Reactome útvonalak dúsulási analízise során olyan neuronális fejlődési folyamatokhoz kapcsolódó felülreprezentált folyamatokat azonosítottunk, mint az aktin filamentum szerveződés, a neuron differenciáció vagy az anterográd axonális transzport (8D ábra). Az annotációs eredményeinkhez hasonlóan a top hub gének AHBA adatbázisban történő sejttípus függésének elemzése alapján a legtöbb le-regulált hub gén asztrocitákban, míg a fel-regulált hubok serkentő és gátló neuronokban, illetve oligodendrocitákban expresszálódnak.

4.4. Depresszióban érintett gének azonosítása

Mivel különösen fontosnak tartottuk, hogy a legszignifikánsabban változó DEG-ek, illetve génexpressziós hálózatok hub génjeinek és a komplex humán betegségek közötti összefüggéseket megvizsgáljuk, ezért a DEG-ek közül a top 10 le- és fel-regulált géneket, valamint a PPI és ko-expressziós hálózatok legjelentősebb 10 le- és fel-regulált hub-jait (összesen 56 gén) két humán genetikai asszociációs adatbázis, a DisGeNET és a GAD annotációs eljárásával vizsgáltuk meg. A módszer alkalmazásával célunk az volt,

hogyan azonosítani tudjuk a változó gének alapján szignifikánsan dúsult betegségeket. A DisGeNET adatbázisban található információk a tudományos kísérleti adatok értelmezése során szakértők által összeállított adatbázisokból származnak (pl. Összehasonlító Toxikogenomikai adatbázis (CDT), UniProt adatbázis, Patkány Genom adatbázis (RGD), Egér Genom Adatbázis (MGD)), de a tudományos irodalomból különböző szövegbányászati vagy kézi-kvalitatív elemzés által nyert adatokat is tartalmazza. Hasonló szövegbányászati eljárással *Genome Wide Association* vizsgálatokból (GWAS) származó adatokat gyűjt a GAD adatbázis.

A DisGeNET adatbázis elemzés során számos szignifikánsan dúsult betegséget azonosítottunk ($p < 0,05$), közülük a vizsgált gének közül 15 gén szignifikánsan dúsult depressziós zavarban és skizofréniában (6. táblázat). A GAD adatbázisban való keresés alapján több depressziós zavarral komorbid dúsult betegséget azonosítottunk (6. táblázat). A pszichiátriai rendellenességek mellett számos komorbid betegség, mint az alkoholfogyasztás, evészavar (bulimia, elhízás) vagy a T2DM érintettsége is megfigyelhető. Kiemelendő, hogy a legtöbb gén (le-regulált gének közül 14 gén: ITGB1, SERPINA3, CSF3, BCL2, MSI2, IL1R2, ZAN, STAT3, FN1, EGFR, IL6, TLR4, CD44, VEGFB; fel-regulált gének közül 7 gén: ACTL6B, COL24A1, CARTPT, CRHR1, CCK, PROC, SERPINF1) érintett T2DM-ben. Ugyan a DisGeNET szignifikánsan dúsult eredményei között nem szerepel, de az egyes gének szerinti online DisGeNET keresés során megfigyeltük, hogy a fel-regulált CCK, GRIK2 és CRHR1 gének érintettek öngyilkosságban. Bár egyik adatbázis sem tartalmaz a DMPFC-re specifikus információkat, adataink arra utalnak, hogy ezek a változó gének a DMPFC-ben is összefüggésbe hozhatók az öngyilkossággal.

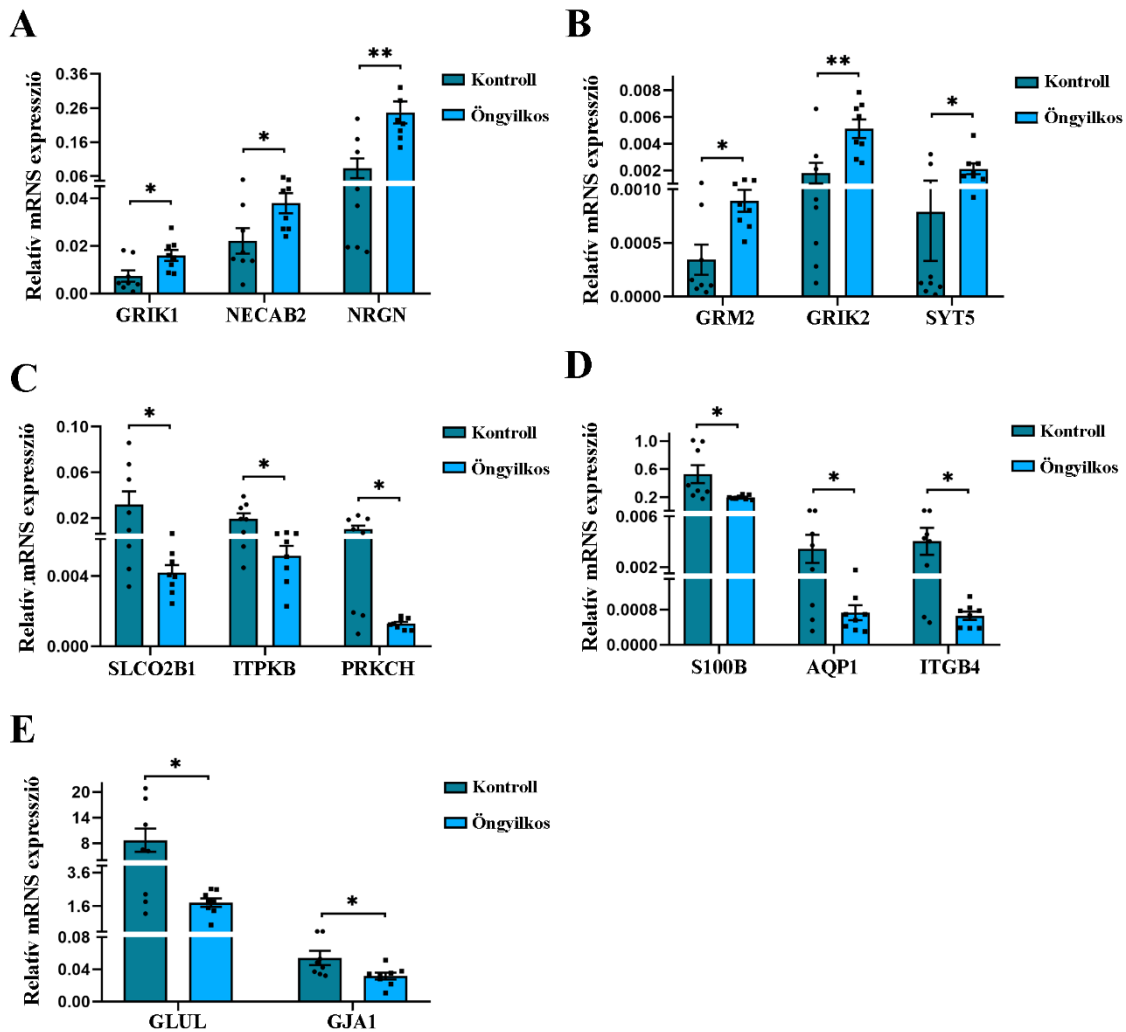
6. táblázat: A 10 top le- és fel-regulált DEG-ek, PPI és ko-expressziós hubok DisGeNET és GAD gén-betegség asszociációs adatbázisok szerinti elemzése. A DisGeNET adatbázisban történő elemzés alapján több gén szignifikáns dúsulását találtuk depressziós zavarban és skizofréniában, míg a GAD adatbázisban történő keresés alapján több depressziós zavarral komorbid dúsult betegséget azonosítottunk.

Adatbázis	Terminus	Gének száma	p-érték	Gének	„Fold enrichment”
DISGENET	Bipoláris depresszió	7	1,12E-02	IL6, BCL2, GRIK1, GRIK2, TLR4, CRHR1, NRGN	3,56
	Depressziós zavar	6	5,70E-03	CSF3, IL6, STAT3, BCL2, CARTPT, CRHR1	5,03
	Skizofréniá	10	7,12E-03	IL6, CACNG8, CALY, GRIK1, CCK, GRIK2, BCL2, GABRD, TLR4, NRGN	2,75
	Unipoláris depresszió	4	4,52E-02	CSF3, IL6, CRHR1, EGFR	3,74
GAD	Alkohol fogyasztás	5	8,90E-04	GRIK1, CCK, CARTPT, GABRD, CRHR1	11,30
	Bulimia	6	3,35E-04	SOCS3, IL6, CALY, CCK, CARTPT, CRHR1	9,63
	Kolorektális rák	7	2,68E-03	MT-ND6, IL6, MT-ND5, SERPINF1, ERBB2, TLR4, EGFR	4,83

Adatbázis	Terminus	Gének száma	p-érték	Gének	„Fold enrichment”
GAD	Crohn betegség	3	7,78E-03	IL6, STAT3, TLR4	22,03
	Epilepszia	3	9,36E-03	GRIK1, GABRD, CACNA1G	20,03
	Elhízás	5	1,31E-02	SOCS3, IL6, STAT3, CARTPT, CRHR1	5,32
	Parkinson kór	4	3,01E-02	SERPINA3, IL6, MTND5, CCK	5,76
	Skizofrénia	9	4,58E-04	IL6, CAMKV, FN1, GRIK1, CCK, GRIK2, AP3B2, CRHR1, NRGN	4,70
	Pszichiátriai zavarok	7	4,32E-04	GRIK1, CCK, GRIK2, CARTPT, GABRD, CRHR1, EGFR	6,88
	2-es típusú cukorbetegség	21	2,79E-05	ITGB1, SERPINA3, CSF3, COL24A1, ACTL6B, IL1R2, SERPINF1, ZAN, STAT3, FN1, VEGFB, CARTPT, MSI2, EGFR, CRHR1, IL6, PROC, BCL2, TLR4, CD44, CCK	2,67

4.5. A szignifikánsan változó gének expressziójának validálása

A szekvenálási adataink megerősítése céljából és az öngyilkos viselkedéssel összefüggő génextpresszió változásaira olyan változó gének expresszióját vizsgáltuk, melyek irodalmi adatok alapján igazoltan érintettek depresszióban vagy depresszió-szerű viselkedés kialakulásában. A validálást RT-qPCR technika segítségével végeztük, a vizsgált gének pedig az alábbiak voltak: GRIK1, GRIK2, GRM2, NRGN, SYT5 és NECAB2, mint emelkedett expressziójú géneket, valamint AQP1, ITPKB, ITGB4, SLCO2B1, GJA1, PRKCH, GLUL és S100B csökkentett expressziójú géneket vizsgáltuk. Vizsgálataink alapján a vizsgált gének expressziójának változása összhangban volt a szekvenálási eredményekkel (9. ábra).



9. ábra: A DEG-ek validálása qRT-PCR-rel. Az RNS-seq analízis alapján 14 eltérően expresszálódó gént választottunk ki, melyek expressziója összhangban volt az RNS

szekvenálási eredményekkel. Az oszlopdigramok az expressziós átlagok \pm SEM értékeit mutatják, a p -értéket pedig t -próbával számítottuk ki (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

A validált fel-regulált gének (9A és B ábra) zömében a glutamáterg szignalizációs útvonalakhoz tartoznak (GRIK1, GRIK2, GRM2, NECAB2), míg a le-regulált gének (9C-D ábra) főleg gliális folyamatokban vesznek részt (S100B, AQP1, GJA1, GLUL, ITPKB, ITGB4) (7. táblázat).

7. táblázat: A depresszióban érintett validált gének expressziójának mértéke és iránya (qPCR log₂FC) illetve a gének legfontosabb biológiai funkciói.

Gén	Megnevezés	Expresszió reguláció	qPCR log ₂ FC	Funkció
GRIK2	kainát-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 2	fel	2,35	kainát szelektív glutamát receptor aktivitás
NRGN	neurogranin	fel	2,16	szignál transzdukció
SYT5	synaptotagmin 5	fel	3,76	SNARE, syntaxin kötés
GRM2	metabotróp glutamát receptor 2	fel	2,18	adenilát cikláz gátló G protein-kapcsolt glutamát receptor aktivitás
GRIK1	kainát-típusú ionotróp glutamát receptor alegység 1	fel	1,59	kainát szelektív glutamát receptor aktivitás
NECAB2	neuronális kalcium-kötő fehérje 2	fel	1,05	5-ös típusú metabotróp glutamát receptor kötés
AQP1	aquaporin 1	le	-1,72	transzmembrán transzporter aktivitás
ITPKB	inozitol-trifoszfát 3-kináz B	le	-1,57	ATP kötés, kináz aktivitás

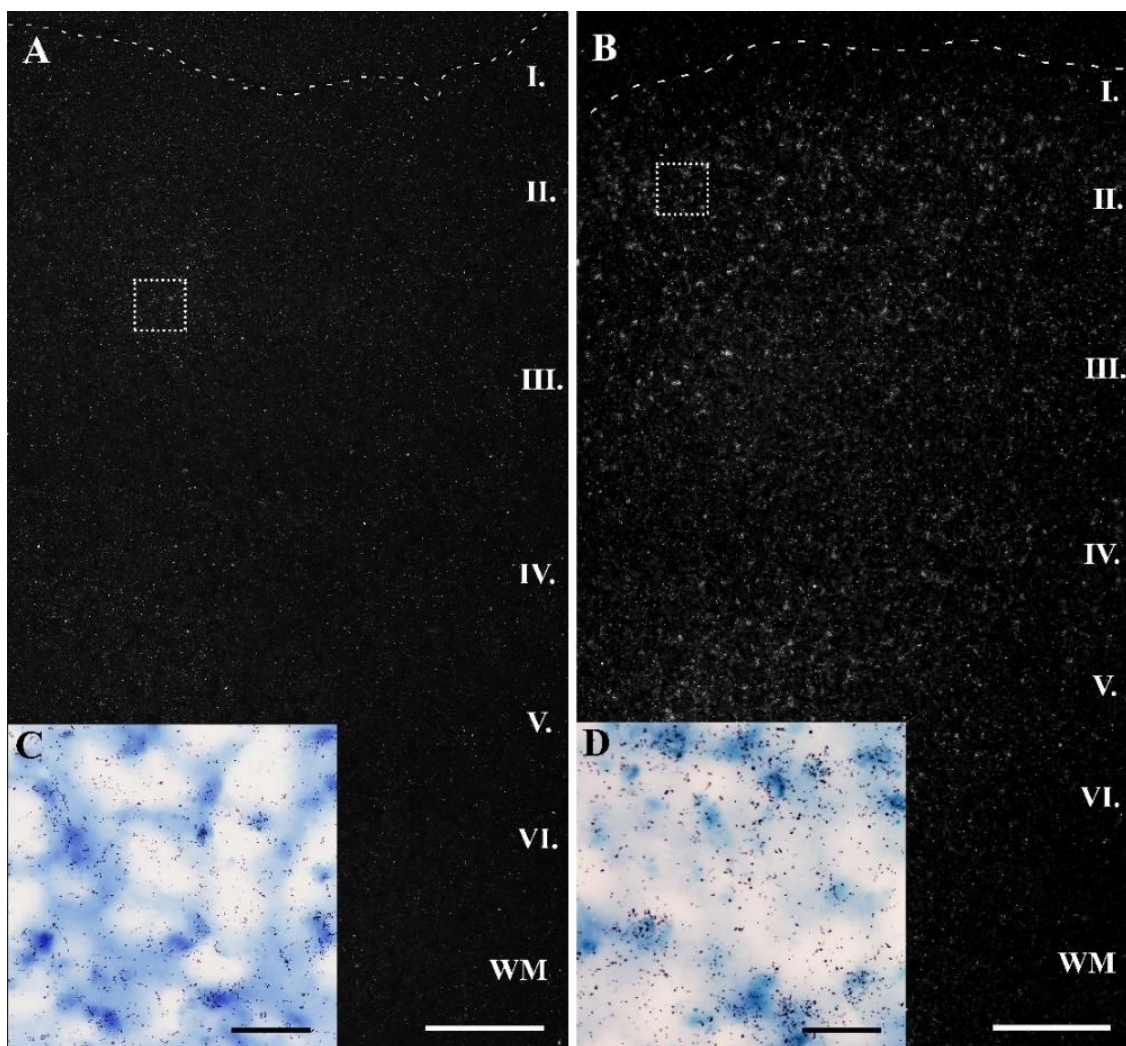
Gén	Megnevezés	Expresszió reguláció	qPCR log2FC	Funkció
ITGB4	integrin beta alegység 4	le	-2,1	G protein-kapcsolt receptor kötés
SLCO2B1	szerves anion transzporter 2B1	le	-2,05	nátrium-independens organikus anion transzmembrán transzporter aktivitás
GJA1	gap junction protein alfa 1	le	-0,78	glutation transzmembrán transzporter aktivitás
PRKCH	protein kináz C éta	le	-2,11	kalcium-függő protein kináz C aktivitás
GLUL	glutamát-ammonia ligáz	le	-1,78	glutamát-ammonia ligáz aktivitás
S100B	S100 kalcium-kötő fehérje B	le	-1,11	kalcium-függő fehérje kötés

4.6. A NECAB2 eloszlása a DMPFC-ben

A továbbiakban a funkcionálisan releváns géneket kifejező sejtípusok meghatározását terveztük *in situ* hibridizációs és immunhisztokémiai vizsgálatokkal. Az egyik ilyen validált és funkcionálisan relevánsnak vélt változó gén a NECAB2. Mivel ennek a génnek nagy jelentősége lehet a neuronális funkciók szervezésében (298, 299), és korábban még nem vizsgálták öngyilkosságban, illetve depresszióban betöltött szerepét, célul tűztük ki eloszlásának jellemzését a DMPFC különböző rétegeiben. A NECAB2 mRNS expresszióját *in situ* hibridizációs hisztokémiával vizsgálva intenzív hibridizációs jeleket figyeltünk meg a kísérlet során vizsgált öngyilkos személy DMPFC-ének felsőbb és mélyebb rétegeiben (10B ábra). Ezzel szemben a kontroll személy DMPFC-ét vizsgálva alacsonyabb NECAB2 expressziót figyeltünk meg a kérgi rétegekben (10A ábra), a különbség pedig jól látható a nagy nagyítású világos látómezős felvételeken is (10C és D ábra).

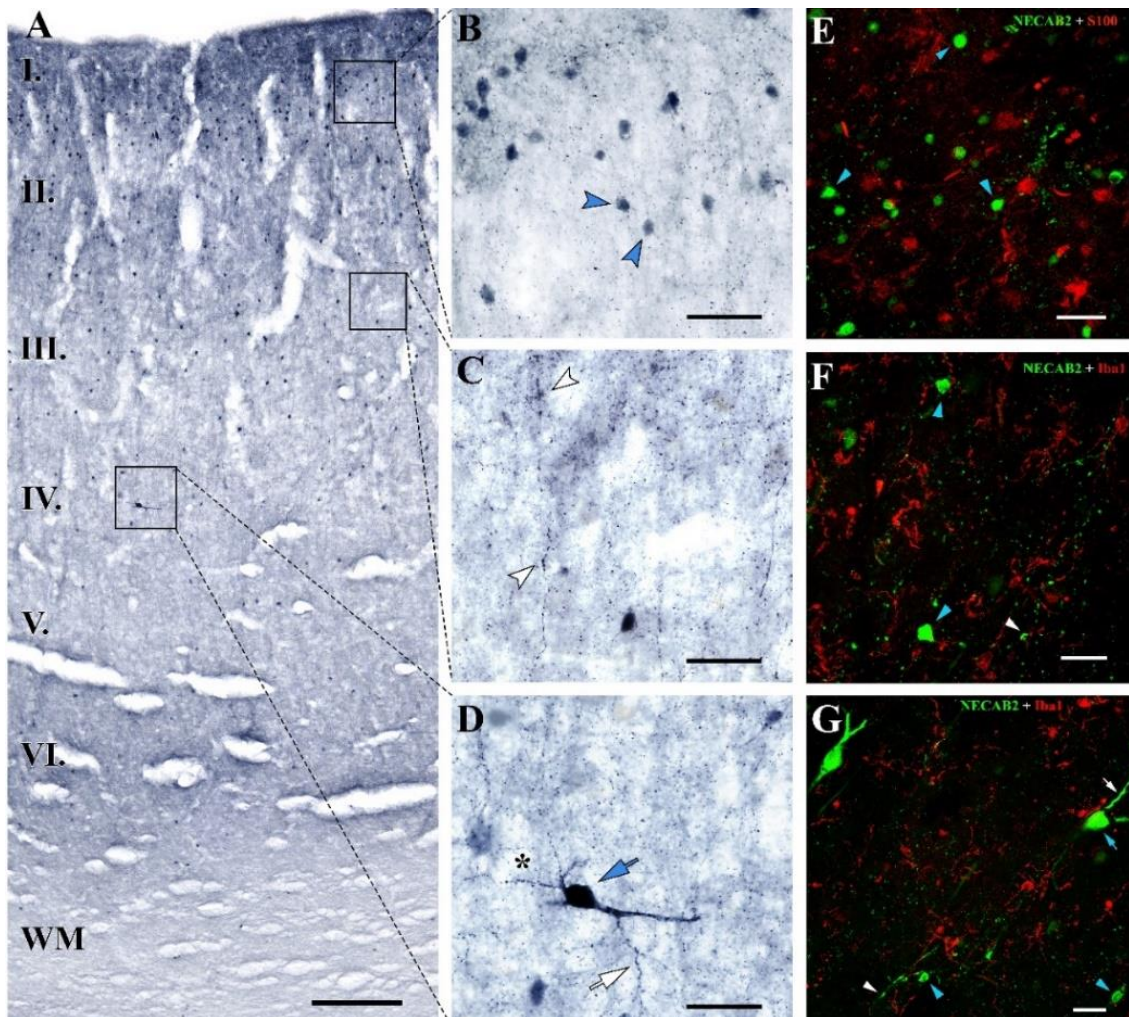
Hasonló eloszlást figyeltünk meg a NECAB2 immunhisztológiai vizsgálata során, ahol a NECAB2-immunreaktív (NECAB2-ir) sejtek főleg a II., illetve III-V. rétegben

jelentek meg (11A ábra). Az immunjelölés azt is feltárta, hogy a NECAB2 két különböző interneuron altípusban expresszálódik (11B és D, illetve E-G ábra).



10. ábra: A NECAB2-t expresszáló neuronok jellemzése a DMPFC-ben. (A-B) A NECAB2 mRNA expresszióját *in situ* hibridizációs hisztokémiával tettük láthatóvá egy 72 éves kontroll női alany (A) és egy 72 éves öngyilkos női alany (B) DMPFC szeleteiben. A (B) sötét látómezős mikroszkópos felvétel jól mutatja, hogy a reprezentatív kontrollal ellentétben (A) intenzív hibridizációs jel jelenik meg az öngyilkos egyén DMPFC kérgi rétegeiben. Az (A) és (B) felvételeken szaggatott vonallal körülzárt területek a kontroll esetében az (C), az öngyilkos esetében a (D) nagy nagyítású világos látómezős felvételein láthatóak, amelyeken a sejtestek környezetében lévő fekete ezüstszemcsék a NECAB2 radiokatív jelölődését reprezentálják. Az (A) és (B) panelen a WM rövidítés a fehérállományt jelöli. A skála 500 μm -nek felel meg az A és B ábrákon és 50 μm -nek a C-D ábrákon.

A nagyobb sejttesttel rendelkező neuronok a mélyebb rétegekben találhatóak (11D és G ábrán kék nyilakkal jelölve), míg a legnagyobb mennyiségben előforduló kisebb sejttesttel rendelkező neuronok a felső rétegekben, túlnyomórészt a II. rétegben oszlanak el (11B és E ábrán kék nyílhegyekkel jelölve). Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a NECAB2 nemcsak a szomatodendritikus kompartmentekben (11D ábrán csillaggal jelölve), de az idegsejtek axonterminálisaiban is jelen van (11C ábrán fehér nyílhegyekkel jelölve). Annak megállapítására, hogy a NECAB2 fehérje expresszálódik-e gliasejtekben is, kombinált immunjelölést végeztünk S100 asztroglialis és IBA1 mikroglialis markerekkel (11E-G ábra). Eredményeink alapján sem az asztrociták (11E ábra) sem a mikroglia (11F és G ábra) esetében sem figyeltünk meg NECAB2 ko-expressziót, így elmondható, hogy a NECAB2 nem expresszálódik gliasejtekben.

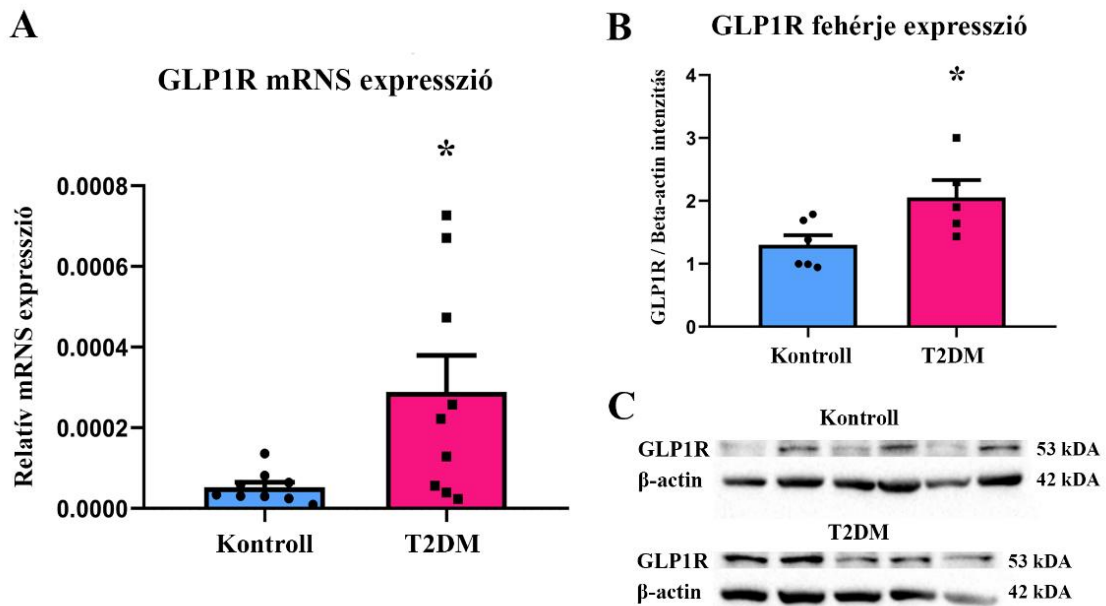


11. ábra: A NECAB2-ir neuronok lamináris eloszlását a kérgi rétegek között DAB immunfestéssel tettük láthatóvá egy kontroll egyén (62 éves) DMPFC-ben. (A) A

NECAB2-ir neuronok főleg a II-V rétegek között találhatóak, valamint, amint azt a nagyobb nagyítású (B) és (D) felvételek is bemutatják, a NECAB2 két különböző interneuron altípusban expresszálódik. Az (A) panelen a WM rövidítés a fehérállományt jelöli. (B) Kis sejttestes NECAB2-ir neuronok jellemnek meg a DMPFC II. kérgi rétegében (a sejteket kék nyílhegy jelöli). (C) A NECAB2 expressziója megfigyelhető az axonok mentén, illetve a varikozitásokban is (fehér nyílhegygel jelölve). (D) A DMPFC mélyebb rétegeiben nagy számmal rendelkező NECAB2-ir interneuronok figyelhetők meg, valamint a NECAB2 expressziója a sejtek számján (kék nyíl) kívül a neuronok szomatodentritikus kompartmentjeiben (csillag) és az axon nyúlványokban is megjelenik (fehér nyíl). (E-G) A NECAB2 kombinált immunjelölése S100 és IBA1 gliális markerekkel. (E) A reprezentatív konfokális felvételeken jól látható, hogy a NECAB2 expressziója (zöld) nem kolokalizálódik az S100-pozitív asztrocitákkal (piros). (F-G) Az IBA1-pozitív mikroglia (piros) esetében sem figyeltünk meg NECAB2 (zöld) kolokalizációt. A skála 250 μm -nek felel meg az A ábrán és 50 μm -nek a B-G ábrákon.

4.7. GLP-1R expresszió T2DM betegek posztmortem PVN mintáiban

A mennyiségi expresszió analízis alapján elmondható, hogy a GLP-1R mRNS expressziója szignifikánsan megnőtt a T2DM betegekben (12A ábra): a GLP-1R relatív mRNS expressziójának aránya (GLP-1R mRNS szint/housekeeping gének [HKG] mRNS szint) a diabéteszes betegek PVN mintáiban $2,9 \pm 0,9$ volt. A relatív GLP-1R mRNS expresszió $1,4 \pm 0,8$ volt a metforminnal kezelt T2DM betegek esetében, míg $0,5 \pm 0,1$ a kontroll egyének esetében ($p < 0,05$). A denzitometriás mennyiségi analízis kimutatta, hogy a GLP-1R fehérje expressziója szintén megnövekedett a T2DM betegek PVN régiójában (12B ábra). A relatív GLP-1R fehérje szint a T2DM betegekben $1,2 \pm 0,2$ (köztük $1,4 \pm 0,5$ a metforminnal kezelt betegeknél) illetve $0,7 \pm 0,1$ a kontroll egyéneknél ($p < 0,05$).



12. ábra: Emelkedett GLP-1R expressziós szint T2DM betegeknél. (A) A PVN minták GLP-1R mRNS expressziójának mennyiségi meghatározását RT-qPCR technikával végeztük. Ahogy az oszlop diagram bemutatja, szignifikánsan emelkedett GLP-1R mRNS expressziót figyeltünk meg a T2DM diabéteszes betegek PVN mintáiban. A mintákat 9 kontroll és 9 T2DM személyből gyűjtöttük. (B) A Western blot analízis eredményei alapján a GLP-1R fehérjeszint szignifikánsan emelkedett a T2DM betegek PVN mintáiban a kontroll egyénekéhez képest. A fehérjeexpresszió elemzést 6 kontroll és 5 T2DM diabéteszes egyén mintáiból végeztük. (C) Az immunoblot felvételek is jól tükrözik a GLP-1R fehérje expressziójának emelkedését a T2DM csoportban. Az oszlopdiagramok az expressziós átlagok \pm SEM értékeit mutatják, a p-értéket pedig t-próbával számítottuk ki (*: $p < 0,05$).

5. MEGBESZÉLÉS

Több mint ezer szignifikánsan változó gént azonosítottunk a kontroll és öngyilkos csoportok között. Korábbi kísérleti adatok alapján ez a kimagaslóan nagy változó gén mennyiség összhangban van más öngyilkos áldozatok (264) és skizofrén egyéneket (300) vizsgáló tanulmányokkal. Adataink szerint a szignifikánsan alul expresszált gének mennyisége jóval meghaladta a magasan expresszált gének mennyiségét, azonban e különbséget valószínűsíthetően nem technikai probléma okozza, mivel a minőségkontroll elemzés során az RNS szekvenálási adataink jól illeszkedtek a DESeq2 modellhez. Ezért ezek alapján arra következtetünk, hogy az öngyilkos viselkedést általánosságban *csökkent génexpresszió* kíséri a DMPFC-ben. Fontos kiemelnünk, hogy a kísérleti csoportok alacsony elemszáma ellenére a minták száma mindkét csoportban elég magas volt ahhoz, hogy megfelelő következtetéseket tudjunk levonni a szekvenálási adatokból (301). Módszertani kérdés, hogy a megfigyelt változások inkább a betegek közötti különbségekből fakadnak, és nem az öngyilkos viselkedés okozza az eltéréseket. Ezzel kapcsolatban ki kell emelnünk, hogy a 16 kísérleti alany közül 7 kontroll és 7 öngyilkos beteg esetében rendelkezünk részletes klinikai és patológiai leírásokkal. A kontrollcsoportban az akut szívelégtelenség és a stroke volt a leggyakoribb halálok. Mivel a szív- és légzési elégtelenség hypoxiához vezet, annál az 5 öngyilkos áldozatnál, akiknél a halál oka akasztás volt, szintén hypoxia merülhet fel. Noha az ezekhez az alcsoportokhoz tartozó minták száma nem elegendő a fontosságuk statisztikai kimutatásához, nem valószínű, hogy a génexpresszióban felmerült különbségeket ezek a tényezők határozzák meg. Figyelemre méltó az is, hogy a vizsgálatunkban részt vevő öngyilkos betegek közül egyiknél sem diagnosztizáltak korábban depressziót. Bár ez az állítás nem zárja ki, hogy néhányuk depresszióban szenvedett, azonban erősen valószínűsíthető, hogy nem részesültek antidepresszáns kezelésben, ami fontos tényező a gén- és fehérjeexpresszió tekintetében.

5.1. Következtetések az egyes DEG-ek alapján

A 10 legszignifikánsabban le-regulált gén biológiai szerepét vizsgálva megfigyeltük, hogy ezek a gének kiemelkedő szerepet játszanak az immunválaszban, a neurodegenerációban, a mitokondriális elektrontranszportban és a sejtadhézióban. Korábbi vizsgálatok beszámoltak a gyulladási folyamatok öngyilkosságban való

szerepéről a prefrontális kéregben (262) és az insulában (302). Azt is feltételezték, hogy a neurodegeneráció, a neuroplaszticitás károsodása (302, 303), valamint a mitokondriális diszfunkció (264, 304) összefüggésbe hozható az öngyilkossági akciókkal. A 10 legszignifikánsabban fel-regulált gén részt vesz az ATP jelátvitelben, a fehérje és vezikula-közvetített transzportban, a membrán és citoskeleton felépítésében, valamint a fehérjeszekréció szabályozásában. Hasonlóan eredményeinkhez, más vizsgálatok is beszámoltak a fehérje és vezikula-közvetített transzport folyamatok változásáról öngyilkos személyek agykérgi mintáiban (246, 262, 302). A legnagyobb expressziós (*fold change* szerinti) változást mutató DEG-ek mellett az igazoltan depresszóban érintett DEG-ek validálására is külön hangsúlyt helyeztünk. A RT-qPCR validálás során 14 gén mRNS expresszióját vizsgáltuk, amelyek expressziós változását megfigyelték depresszióban érintett vagy öngyilkosságot elkövetett személyekben, illetve leírták rágszálók depresszió-szerű viselkedésében is (244, 263, 265, 305-309). Az ITPKB, GJA1 és GLUL depresszióban érintett gének esetében, amelyek változását leírták depressziósok DLPFC-ben (265), hasonló expresszió változást figyeltünk meg az öngyilkosok DMPFC-ben is. Bár a DLPFC és a DMPFC elhelyezkedésükben hasonló (ugyanazon gyrus részei egymás mellett), funkciójukban különböznek. A DLPFC egyik „felvevőhelye” mind a külvilágból, mind belső szerveinkből származó információknak („input system”), a DMPFC azonban az egyik legfontosabb kiindulási helye a DMN-nak („output system”). Bár a két dorsális prefrontális kéreg funkciójukban különbözőek, egymástól nem függetlenek, így depressziós szignálokra egyaránt reagálnak. Az AQP1 és ITGB4 gének esetében, amelyek expresszió változását eddig depresszió-szerű viselkedésben írták le (305, 308), jelen tanulmányunk az első, amely összefüggésbe hozza őket az emberi öngyilkos viselkedéssel.

Számos, az asztrocita működéséhez elengedhetetlen gének, mint az ATP1A2, ALDH1L1, GFAP, S100B, GJA1 vagy az AQP1 csökkent expresszióját találtuk az öngyilkos áldozatok DMPFC-ében. Több tanulmány beszámolója szerint az asztrociták működésében történő változások hozzájárulnak a depresszió kialakulásához (227, 310, 311). Ezek alapján, és a fentiekben taglalt eredményeink szerint feltételezhető, hogy az asztrociták működésében szerepet játszó gének csökkent expressziója a DMPFC-ben szerepe lehet a depresszió és az öngyilkos viselkedés kialakulásához.

5.2. A biológiai útvonalelemzés funkcionális vonatkozásai

A GO funkcionális annotációt, valamint a KEGG és a Reactome biológiai útvonalakat használó integrált elemzéseink számos változást tártak fel az öngyilkos személyekben. Az összes DEG feldúsulás elemzése (*gene set enrichment*) alapján a legkiemelkedőbb változást mutató biológiai funkciók között megfigyeltük a gliális és gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok jelentős csökkenését, illetve a glutamáterg neurotranszmisszió jelentős emelkedését az öngyilkos csoportban. A le-regulált DEG-ek szignifikánsan felülreprezentálódtak a sejt felszíni receptor jelátviteli útvonalban, a növekedési faktor kötődésében, a PI3K-Akt jelátviteli útvonalban, a TNF jelátviteli útvonalban és a citokin-citokin receptor kölcsönhatásban. Az ehhez hasonló gyulladáshoz kapcsolódó válaszok változásait korábban összefüggésbe hozták mentális betegségekkel (312-314). Jelen munkánk azonban az első, amely az öngyilkos viselkedés és a DMPFC-ben bekövetkezett csökkent gyulladáshoz kapcsolódó képesség kapcsolatát mutatja be. Emellett fontos leszögezni, hogy a gyulladási folyamatok csökkenése utalhat a mikroglia csökkenő funkciójára is.

A fel-regulált DEG-ek szignifikánsan felülreprezentálódtak a szinaptikus funkciókban, a nátriumcsatorna aktivitásban, így nem meglepő módon az axonokban és szinapszisokban is. A fel-regulált DEG-ek között a neuroaktív ligandum-receptor kölcsönhatások és a Na-permeabilis kainát receptor útvonalak aktivitása kiemelkedő volt, amely útvonalak a glutamáterg, specifikusan a kainát-típusú jelátvitel fokozott működésére utalnak. A kainát-típusú glutamáterg szignalizáció érintettségét bemutatták hangulati zavarokban (315, 316), szenvedélybetegségekben (317) és alkoholfüggőségben is (318). Korábban posztmortem vizsgálatokból származó megfigyelések alapján leírták, hogy a DLPFC-ben a magasan expresszálandó glutamáterg gének érintettek lehetnek MDD-ben és öngyilkos viselkedésben is (246, 319), továbbá jelen munkánkban mi is bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a glutamáterg gének magas expressziója a DMPFC-ben összefüggésben áll a depresszió és öngyilkosság kialakulásával. Az egyik széleskörűen vizsgált kainát-típusú glutamát receptor a GRIK2, amely szerepét leírták az antidepresszáns kezelést követő öngyilkossági gondolatok kialakulásában (320). Egy másik tanulmány vizsgálatai szerint a GRIK2 gén polimorfizmusai további összefüggésbe hozhatók az MDD-ben szenvedő betegek antidepresszáns kezeléseit követő öngyilkossági gondolataikkal (321). Egy rágszálókkal végzett vizsgálat kimutatta, hogy a GRIK2 knock-out egerek impulzívabbak és agresszívabbak, ami arra enged

következtetni, hogy a GRIK2 sajátos módon vesz részt ezen viselkedési megnyilvánulásainak szabályozásában (322). Nem utolsó sorban a GRIK2 fokozott expresszióját összefüggésbe hozták a befejezett öngyilkossági akciókkal is (304). Ezen megfigyelések és az általunk bemutatott eredmények mind azt sugallják, hogy a DMPFC-ben a megemelkedett kainát receptor jelátvitel hozzájárul az öngyilkos cselekedetekhez, így a kainát-típusú jelátvitelhez tartozó gének potenciális biomarkerek lehet.

A le- és fel-regulált DEG-ek funkcionális annotációja feltárta, hogy vannak olyan génkészletek, amelyek biológiai útvonalai átfednek a korábban depresszióban leírt biológiai útvonalakkal. Ez alapján a depresszióval összefüggő útvonalak után kutatva azt találtuk, hogy a DMPFC-ben megváltozott és depresszióban leírt neurotranszmissziós és sejttanyacsere folyamatokban lecsökkent és megnövekedett expressziójú gének egyaránt részt vesznek (8. táblázat).

8. táblázat: A le- és fel-regulált gének bemutatása, amelyek közös funkciójuk révén érintettek a felsorolt depresszióval kapcsolatos útvonalakban.

Le-regulált gének	Fel-regulált gének	Funkció	Depresszióval kapcsolatos útvonal
GABRG1, NTSR2, GPR37L1, GABRE, GLRA1, GRIN2C	CARTPT, GABRD, CCK, CRHR1, GRM2, GRIK1, GRIK2	Szignál transzdukció	Neuroaktív ligand-receptor kölcsönhatás
ITPR2, RYR3, ASPH	TRPM2	Kalcium-közvetített jelátvitel	Oxytocin jelátviteli útvonal
SLC6A13, SLC6A11, SLC6A12, GABRG1, GABRE, SLC38A3, SLC38A5	GABRD	Anion transzmembrán transzporter aktivitás	GABAerg szinapszis

Le-regulált gének	Fel-regulált gének	Funkció	Depresszióval kapcsolatos útvonal
PDGFRB, FLT4, ERBB2, EGFR, NTRK2, CYSLTR2, FLT1, PTGER1, GRIN2C, NOS3, ADORA2B, VEGFB, ADCY4, FGF8, ADORA2A, FGFR3, GNA14, ASPH, ITPR2, RYR3, ITPKB, PLCD1, TPCN1, PLCD3, FGF1	CACNA1G, FGF8, P2RX2	Sejt kommunikáció	Szerotonerg szinapszis
TNFRSF1A, TGFB1, TGFB3, DUSP1, RRAS, HSPB1, PDGFRB, FLT4, ERBB2, GNA12, EGFR, FLT1, VEGFB, ANGPT2, CSF1, MAP4K4, EPHA2, TGFBR2, TGFB2, IL1R1, PGF, FGF1	CACNA1G, CACNG8, DUSP4, FGF8	Celluláris folyamatok szabályozása	MAPK jelátviteli útvonal

5.3. A DEG-ek fehérje interakciós hálózatának elemzése

A különböző fehérje elemző technikák lehetővé teszik a fehérjék közötti kölcsönhatások meghatározását. Ezeket a kölcsönhatásokat speciális biológiai adatbázisok gyűjtik össze, amelyek lehetővé teszik az interakciók későbbi megkeresését és tanulmányozását. Ilyen adatbázis például a STRING, amelyet mi is alkalmaztunk vizsgálataink során. A STRING a kísérletes adatok gyűjtése mellett különböző automatikus számítógépes szövegfeldolgozási algoritmusokat is használ, amelyek lektorált cikkek szövegében keresnek fehérje interakciós információkat.

A PPI hálózatok értékelésének egyik módja a hub fehérjék azonosítása. Ezek a legmagasabb fokú kapcsolattal bírnak egy interakciós hálózatban, vagyis *gráfelméleti* kifejezéssel élve nagy fokszám jellemezi őket. Ez alapján egy PPI hálózatban a hub fehérjék fontos szereppel bírhatnak egy adott patológiás elváltozásban. A DEG-ek PPI hálózatának elemzéséből származó 10 legjobban rangsorolt le-regulált gén (EGFR, FN1,

IL6, STAT3, NOTCH1, CD44, ERBB2, PECAM1, TLR4, ITGB1) funkcionális annotációs elemzése kimutatta, hogy ezek a gének szignifikánsan felülreprezentálódtak a sejtfelszíni receptor jelátviteli útvonalban, az asztrocita differenciációban, illetve a MAPK kaskád szabályozásában. Amint azt korábban meghatároztuk, a legkiemelkedőbb kapcsolattal bíró fehérje, az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), amelyről a közelmúltban megállapították, hogy mutációja összefüggésben állhat súlyos depresszióval (323). Két további hub fehérje, a vérlemezke és endothel sejt adhéziós molekula 1 (PECAM1 vagy CD31) és az ERBB2 proto-onkogén csökkenését szintén kimutatták öngyilkos áldozatok DLPPFC-ben (265).

A 10 legjobban rangsorolt fel-regulált hub gén (CCK, GABRD, SCN3B, GRIK1, GRIK2, CRHR1, CALY, CACNG8, CACNA1G, COL24A1) GO elemzése feltárta, hogy ezek a gének a membránpotenciál szabályozásában, az idegrendszeri folyamatokban, illetve a sejt-sejt jelátvitelben játszanak kiemelkedő szerepet. A 10 legfőbb hub fehérje közül a CCK rendelkezik a legnagyobb kapcsolattal a fel-regulált gének fehérje hálózatában. Löfberg és mtsai. (324) kimutatták, hogy azok a depressziós betegek, akik egy vagy több öngyilkossági kísérletet követtek el, általában magasabb CCK szintet mutattak a cerebrospinális folyadékban. Egy újabb tanulmány feltételezése szerint a depressziós betegekben megemelkedett CCK szint inkább az öngyilkossági kísérletekhez, semmint a depressziós tünetek értékeihez köthető (325). Hasonlóképpen, egy tanulmányban az öngyilkosságban elhunyt személyek frontális kérgében a CCK receptorok számának megemelkedését figyelték meg (326). A második legnagyobb kapcsolattal bíró fehérje a GABRD. Egy tanulmány szerint, amely a GABAerg rendszer genetikai érintettségét vizsgálta depressziós és öngyilkos személyek prefrontális kérgében, a GABRD génvariánsok érintettségét figyelték meg depressziós rendellenességben (327). Érdekes továbbá az is, hogy a közelmúltban erős összefüggést találtak a kortikotropinfelszabadító hormon receptor 1 (CRHR1) polimorfizmusa és az öngyilkossági kísérletek között (328).

Egy multilokusz asszociációs (ML-GWAS) vizsgálat kimutatta, hogy a *glutamáterg szinaptikus jelátvitel* számos allélvariációja, mint például a GRIK1, GRIK2, GRIK3, GRIN1, GRIN2A, GRIN2C vagy GRM7, súlyos depresszióhoz társul (307). Egy ezt követő szisztematikus áttekintés feltárta, hogy a súlyos depressziós zavarban érintett kulcsfontosságú gének nagy része részt vesz a glutamát neurotranszmissziójában (257).

Ezenkívül számos tanulmány megállapította, hogy az NMDA és AMPA (2-amino-3-[5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il] propánsav) receptor alegységek expressziója emelkedik depresszióban szenvedő személyek több agyi régiójában is (319, 329, 330). A glutamát pszichiátriai és más egészségügyi állapotokban való részvételét régóta intenzíven vizsgálják, azonban a korábbi tanulmányok nagyobb részt az ionotróp glutamát receptorok biológiájára és patofiziológiájára összpontosítottak. A metabotróp receptorok hasonlóan nagy figyelmet érdemelnek, hiszen a G-protein-kapcsolt jelátviteli tulajdonságuk révén képesek befolyásolni a neuronális aktivitást (331). Erős kölcsönhatásokról számoltak be az I. metabotróp glutamát receptor (mGluR) csoportba tartozó metabotróp glutamát receptor 5 (mGluR5) és az NMDA receptor között, ami arra utal, hogy az mGluR5 szerepet játszhat az idegsejtek plaszticitásban, így a tanulási folyamatok lebonyolításában és a memóriában (332). A fel-regulált DEG-ek közül kettő, a feszültség-függő kalciumcsatorna segédegység gamma 8 (CACNG8) és a CALY neurotransmitter receptor szabályozó fehérjét kódolnak. A CALY szabályozza a D1 dopamin receptor internalizációját a prefrontális kiferéregben és a dorsális striatumban (333), míg a CACNG8 vagy más néven transzmembrán AMPA receptor szabályozó fehérje gamma 8 (TARP- γ 8) pedig negatívan szabályozza az AMPA receptor jelátvitelt (334). Ezek alapján elmondható, hogy a glutamát rendszert érintő változások a DMPFC-ben kiemelkedő jelentőséggel bírhatnak az öngyilkos viselkedés kialakulásában.

5.4. A DMPFC génexpressziójának funkcionális klaszteranalízise

A DEG-ek további elemzésének céljából megvizsgáltuk a gének ko-expressziós tulajdonságait. A gének ko-expresszióján alapuló hálózatelemzés alkalmazható a különböző biológiai funkciókat szabályozó vagy ellátó gének közötti moduláris kapcsolatok vizsgálatára. Ezzel a módszerrel olyan génhalmazokat azonosíthatunk, melyek hasonló expressziójuk révén kiemelkedő szereppel bírhatnak egyes biológiai folyamatokban. Emellett az egyes hálózati modulok részletes annotációját is leírtuk betegségek és fenotípusok mögöttes folyamatainak a megértéséhez. Továbbá olyan hub géneket is meghatározhatunk a hálózatban, amelyek a legmagasabb kapcsolattal rendelkeznek egy adott génhalmazban. A le-regulált géneket tartalmazó ko-expressziós hálózat legnagyobb klaszterei a biológiai funkciókat tekintve többek között a gliogenezishez, valamint az I-es típusú interferon jelátviteli útvonalhoz társultak,

amelyek a csökkent gliális aktivitásra és a gamma-interferon szerepén keresztül csökkent gyulladáshoz való válaszkészségre utalnak. A fel-regulált ko-expressziós hálózat főbb génhalmazai viszont a neurotranszmitter receptor internalizációjához, a nátriumcsatorna aktivitáshoz, illetve a peptidek neuromodulátor funkciójához kapcsolódtak. A neurotranszmitter receptor internalizációs útvonalának megváltozása összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy a neurotranszmitter receptorok diszfunkciója hozzájárulhat a depresszió patofiziológiájához (316, 335, 336).

A hub fehérjék a magas számú interakciójuk miatt általában fontos szerepet játszanak egy adott biológiai rendszerben. Például a transzkripciós faktorok, amelyek specifikus DNS szakaszokhoz kötődnek, több gén expresszióját is szabályozni tudják. A le-regulált gének ko-expressziós hálózatában az első és legfőbb klaszter hub-ja a SORBS3, más néven *vinexin*. A *vinexin* fő feladata az aktin citoskeleton szabályozása, továbbá képes negatívan szabályozni az autofágiát. Expressziója az egér és emberi agyszövetben az életkor előrehaladtával növekszik, így feltehetően az életkorral összefüggő neurodegeneratív állapotok kialakulásához (337, 338). Ezenkívül egy metaanalízis bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a SORBS3 szoros kapcsolatban áll a súlyos depresszióval (339). A fel-regulált ko-expressziós hálózat legfőbb klaszterének hub-ja a CALY, amely képes serkenteni a klatrin burok összeszerelődését, így részt vesz a klatrin által közvetített endocitózisban, ami kulcsfontosságú a hatékony szinaptikus jelátvitelben és a neurotranszmitter felszabadítás optimalizálásában (333, 340). Más tanulmányok arról is beszámoltak, hogy a CALY elsősorban az idegi fejlődéssel és a szinaptikus plaszticitással kapcsolatos folyamatokban játszik kiemelkedő szerepet (341, 342). Eredményeink alapján a SORBS3 és a CALY, mint a le- és fel-regulált ko-expressziós hálózatok két legfőbb hub génje, potenciális biomarkerként szolgálhatnak a jövőbeni terápiás beavatkozások során.

A le- és fel-regulált ko-expressziós hálózatok legkiemelkedőbb hub génjeit a gének MCC értéke alapján szűrtük. Az egyik legerősebben le-regulált hub gén, a MSI2 RNS-kötő fehérjéről kimutatták, hogy expresszálódik az idegi progenitor sejtekben (343) illetve részt vesz a sejtciklus és a fejlődés szabályozásában (344). A STRING adatbázisban való elemzéseink során az MSI2 funkcionális kapcsolatban állhat az SNTA1-gyel. Irodalmi adatok alapján az SNTA1 számos membránfehérje lokalizációjának megszervezésében játszik fontos szerepet, valamint képes kapcsolatot

létrehozni az extracelluláris mátrix és a receptorok között (345, 346). A STRING elemzés alapján a 10 legkiemelkedőbb hub gén közül 4 gén, az ACTL6B, CCK, CALY, és GABRD fehérje kapcsolatát azonosítottuk. Ezek közül a legintenzívebb kapcsolattal bíró gén az ACTL6B, amely a neuron-specifikus kromatin átrendező (*chromatin remodeling*) komplex tagja. Korábban megfigyelték, hogy az ACTL6B knock-out iPSC-eredetű idegsejtekben az ACTL6B hiánya a dendritfejlődés hiányát eredményezi (347), elmondható, hogy az ACTL6B döntő szerepet játszik a neurális fejlődésben és a dendrit túske kinövésben (348). Egy másik fel-regulált és az ACTL6B fehérjével funkcionális kapcsolatban lévő hub gén, a gasztrointesztinális traktusban termelődő CCK, amely fő feladata az emésztés szabályozása, azonban úgy is azonosították mint a gerincesek agyában bőségesen expresszálandó neuropeptid (349). Az agyban a CCK szerepe még nem teljesen tisztázott, de ismert, hogy számos funkciót ellát, mint például a memória, az érzelem, valamint az étvágy szabályozása (350).

5.5. A depresszióhoz és társbetegségeikhez tartozó gének bemutatása

A hub gének betegség-asszociált elemzése során 11 gén szignifikánsan felülreprezentálódott depresszióban. A felülreprezentálódott gének közül 6 le-regulált (BCL2, CSF3, IL6, STAT3, EGFR, TLR4) míg 5 fel-regulált (CARTPT, CRHR1, GRIK1, GRIK2, NRG1). A pszichiátriai rendellenességek genetikai polimorfizmusainak tanulmányozása során megfigyelték, hogy a CARTPT génmutációja fokozott szorongással és depresszióval függhet össze (351). Ezenkívül a CARTPT által kódolt peptid a hangulatszabályozásra gyakorolt hatása miatt a súlyos depresszió potenciális biomarkere lehet (352, 353). Ezen túlmenően a hub gének analízise során számos más, depresszióval komorbid betegség felülreprezentálódását is azonosítottuk. Az egyik ilyen társbetegség a T2DM, amelynél 21 hub gén érintettségét figyeltük meg (lásd 6. táblázat). Számos bizonyíték utal arra, hogy gyakori a depresszió és a cukorbetegség közötti komorbiditás előfordulása (189, 190). Újabb kutatások becslései szerint a T2DM betegek körében kétszer olyan magas a depresszió előfordulása, mint a nem cukorbeteg lakosság körében (354). Az öngyilkos gondolatok és cselekedetek jelentős klinikai és közegészségügyi problémát jelentenek a cukorbetegség körében. Míg egyes tanulmányok szerint a T2DM összefüggésben áll az öngyilkos gondolatok és kísérletek fokozott kockázatával (355), mások ennek az ellenkezőjét találják (356). Azonban a fiatalabb

életkor, a női nem, az alkoholfogyasztás, a családban előfordult öngyilkosság és a stressz növeli az öngyilkosság kockázatát a T2DM betegek körében (357-360). Ezen túlmenően, a halálos kimenetelű eszközökhöz való hozzáférés, mint például az orális hipoglikémiás gyógyszerek vagy inzulin injekció, megnöveli az öngyilkossági kísérletek valószínűségét (361).

5.6. A NECAB2 potenciális funkciói

A NECAB2 egyike azoknak a validált géneknek, amelyek szintje szignifikánsan emelkedett az öngyilkos áldozatok DMPFC-ben. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a NECAB2 specifikusan kötődik az I. mGluR csoportba tartozó glutamát receptorokhoz (mGluR1 és mGluR5), így modulálni képes azok funkcióját (362, 363). Szekvenálási eredményeink, összhangban egy korábbi vizsgálattal (364), bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a glutamáterg jelátviteli rendszer aktiválódása részt vesz az öngyilkos viselkedés patogenezisében. Így valószínűsíthető, hogy a NECAB2 a mGluR5 aktivitásának növelésével fejt ki szerepét az öngyilkosság kialakulásában. Hisztológiai vizsgálataink és az AHBA expressziós adatbázissal való összehasonlításunk során megfigyeltük, hogy a NECAB2 az emberi agykéreg felsőbb és mélyebb rétegeiben, főleg a II., illetve a III-V. rétegben található interneuronokban expresszálódik. A NECAB2-t expresszáló sejtek többsége olyan GABAerg interneuronokban fejeződik ki, amelyek zömében a vazóaktív intesztinális peptid (VIP), a lizoszóma-asszociált membránlikoprotein 5 (LAMP5), a páros dobozfehérje 6 (PAX6) illetve a szomatosztatin (SST) molekulák expressziójával jellemezhetőek.

Kombinált immunhisztológiai vizsgálataink megerősítették, hogy a NECAB2 nem expresszálódik sem asztrocita, sem mikroglia sejtekben, azonban azt találtuk, hogy a NECAB2 két, morfológiailag eltérő interneuron altípusban jelenik meg. Az egyik interneuron altípus nagyobb sejttesttel jellemezhető, amely a mélyebb rétegekben helyezkedik el, míg a másik altípus, amely kisebb sejttesttel rendelkezik, nagyobb mennyiségben fordul elő a DMPFC felsőbb rétegeiben, túlnyomórészt a II. rétegben. A sejtek eloszlása és morfológiája alapján a nagyobb sejttípus valószínűleg SST+ interneuronnak, míg a kisebbik sejttípus VIP+ interneuronnak felel meg (365, 366). A NECAB2 expressziója nemcsak a sejttestben, hanem a szomatodendritikus

kompartmentekben, illetve axonterminálisokban is azonosítható volt. Ez a megfigyelés megegyezik egy korábbi vizsgálat során leírt tapasztalatokkal (299).

Eredményeinket összegezve valószínű, hogy a NECAB2-t expresszáló sejttípusok közül legalább egy a mGluR-ok szabályozásán keresztül érintett lehet az öngyilkos viselkedés kialakulásában.

5.7. Emelkedett GLP-1R expresszió a T2DM betegek PVN régiójában

A depresszió, amely gyakori önálló pszichiátriai kórkép, számos krónikus egészségügyi betegség egyik leggyakoribb kísérőbetegsége lehet, beleértve a rosszindulatú daganatot, valamint a szív- és érrendszeri betegségeket, az anyagcserezavarokat, vagy a gyulladásos és neurológiai betegségeket. Két krónikus, világszerte terjedő betegség, a diabetes mellitus és a depresszió közötti *komorbiditás* számos epidemiológiai és klinikai tanulmány igazolta. A cukorbetegség nem egész a fele depresszióval küzd, amely rontja a betegeknél a terápia sikerességét, valamint növelik a szövődmények kialakulását és a mortalitást.

Irodalmi adatok beszámoltak a GLP-1 jelátvitel érintettségéről depresszióban (195, 367). Mivel eddig még kevés adat származik a humán agyi GLP-1 rendszer vizsgálataiból, érdekesnek véltük a cukorbetegség gyógyszeres kezelésének egyik célpontjának, a GLP-1R expressziójának vizsgálatát T2DM betegségben érintett személyek hipotalamuszának paraventriculáris magjában. A génexpressziós vizsgálatokat RT-qPCR és Western blot technikák segítségével végeztük. Jelen munkában elsőként számoltunk be a GLP-1R expressziójának emelkedéséről T2DM betegek PVN-ben. Ezáltal feltételezzük, hogy a GLP-1R különleges szerepet játszik a táplálkozás és a glükóz homeosztázis zavarában. Adataink azonban arról nem adnak információt, hogy mely szubdivíziókban történik változás, illetve arról sem, hogy a GLP-1R mRNS szintje milyen mechanizmusok által nő a T2DM betegekben. Esetleges magyarázatként szolgálhat, hogy a GLP-1 rendszerben bekövetkező változások nem okai, hanem következményei a T2DM betegekben lezajló egyéb eseményeknek (368). A másik lehetőség, amely emelkedett GLP-1R szintet okozhat, az inzulin, amelyről ismert, hogy szintje megnő T2DM betegekben. A PVN-ben megemelkedett GLP-1R expresszió alapján valószínűsíthető, hogy a GLP-1R megnőtt aktivitása pozitívan támogatja a

cukorbeteg állapot ellen küzdő kompenzációs mechanizmusokat. Ennek tisztázására azonban további kísérletek szükségesek.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen munkám célja az öngyilkossággal összefüggő génexpressziós változások azonosítása volt a DMN egyik kiemelkedő régiójában, a DMPFC-ben. A vizsgálatokat RNS szekvenálási módszer felhasználásával végeztük. Eredményeink között bemutattuk az immunválaszok inaktiválódását és a gliasejtek differenciálódásában szerepet játszó gének expressziós szint csökkenését, valamint a glutamáterg szinaptikus átvitelben részt vevő gének expressziójának emelkedését. A gliogenezishez kapcsolódó útvonalak megváltozása miatt az öngyilkos viselkedés befolyásolhatja a gliasejtek számát és a sejtmorfológiát a prefrontális kéreg mediális részén. Ezen kívül a glutamát neurotransmissziójában bekövetkező változások, beleértve az ionotróp és metabotróp receptorokat, hozzájárulhatnak a DMPFC neuroplasztikus diszfunkciójához. Mivel a depresszió a leggyakoribb pszichiátriai betegség az öngyilkosok körében, így az öngyilkos személyekben megváltozott expressziójú gének GO és biológiai útvonalelemzése során azonosított diszregulált útvonalak és funkcionális kaszkádok nagy valószínűséggel összefüggésbe hozhatók a depresszióval. A depresszióval való összefüggést az is alátámasztja, hogy a DEG-ek nagy átfedést mutattak a korábban bemutatott, depressziós rendellenességekben érintett génekkel.

A DMPFC több funkcionális agykérgi hálózat kulcselemeként kiemelkedő szereppel bír. Közvetlen viszcero- és szomatoszenzoros bemeneteket kap, például motivációs/érzelmi információkat kap az orbitofrontális kéregből, illetve kognitív bemeneteket a dorsolaterális és ventrális prefrontális kéregből. Mindezen információk együttes feldolgozását a munka memóriával együtt a DMPFC végzi, amely a beérkezett információk kontextusa alapján kidolgoz egy motoros programot. A DMPFC közvetlenül információt küld a premotoros és szupplementer motoros kérgi területekhez is. A feldolgozott információt a *default mode hálózaton* keresztül továbbítja a mediális pariteális kérgi területek, a PCC és precuneus neuronjaihoz. A PCC és a precuneus a *central executive control hálózaton* keresztül képes befolyásolni vagy akár blokkolni a motoros kéreg tevékenységét, így öngyilkosok esetében az önreflexió révén hatással lehet az öngyilkos viselkedésre.

Gén-betegség asszociációs elemzéseink során megfigyeltük, hogy a depresszióban szignifikánsan felülreprezentálódott hub gének nagy része T2DM betegséggel is összefüggésbe hozhatók. Egy nem régiben megjelent tanulmány kimutatta,

hogy a GLP-1 agonisták alkalmazása elhízott depressziós betegeknél a kognitív funkciók javulását és a depresszió kóros tüneteinek enyhítését eredményezi. Mindezen eredmények alapján, továbbá a GLP-1 rendszer csekély humán vonatkozásai miatt megvizsgáltuk a T2DM betegek PVN mintáiban a GLP-1R expressziójának változását. Eredményeink alapján a GLP-1R szignifikánsan emelkedett mRNS és fehérje expresszióját találtuk T2DM betegek PVN régiójában. A T2DM betegekben a GLP-1R expresszió szint növekedése nem a gyógyszeres terápia következménye, hanem feltételezhetően ez a változás a jóllakottság érzésének megváltozott szabályozására utalhat, illetve a megnövekedett GLP-1R szint a T2DM betegekben a megemelkedett inzulinszint következménye is lehet.

Végső következtetésként eredményeink alapján elmondható, hogy a DMPFC-ben bekövetkező expressziós változások hozzájárulhatnak a depressziós vagy öngyilkos viselkedés patofiziológiájához, ezzel lehetőséget kínálva a jövőbeni új, specifikus terápiás stratégiák kifejlesztésére és megvalósítására.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Fő vizsgálataink egy, a hangulati zavarokkal összefüggésbe hozott, és a default mode hálózat (DMN) egyik fő elemeként számontartott területre, a dorsomedialis prefrontális kéregre (DMPFC) irányultak. Mivel e területnek a depressziót és/vagy öngyilkosságot érintő expressziós változásairól még nem állt rendelkezésre humán vizsgálati adat, célul tűztük ki nyolc öngyilkosok és nyolc kontroll személy DMPFC kérgi mintáinak transzkriptom szintű vizsgálatát nagy áteresztő képességű RNS szekvenálás segítségével. Vizsgálataink során a DMPFC-ben több mint 1000 szignifikánsan változó gént találtunk a kontroll és az öngyilkos csoportok között. Gén ontológiai és biológiai útvonal analízis alapján a mitokondriális elektron transzport, a gliális funkció, valamint a citokin receptor szignalizációt és a glutamáterg szinaptikus szignalizációt érintő jelátviteli útvonalak jelentősen változtak az öngyilkos csoportban. Az egyik fel-regulált gén, a neuronális kalcium-kötő fehérje 2 (NECAB2), amelynek hangulati zavarokban betöltött szerepét még nem vizsgálták, így célul tűztük ki eloszlásának hisztológiai jellemzését a DMPFC kérgi rétegeiben. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a NECAB2 két interneuron altípusban is expresszálódik, viszont nincs jelen piramis sejtekben és glia sejtekben. A NECAB2 emellett megtalálható dendritikus és axonális kompartmentekben is. A gén-betegség asszociációs elemzéseink során több változó gén érintettségét találtuk depresszióban és a depresszióval komorbid 2-es típusú diabetes mellitus-ban (T2DM).

A glukagon-szerű fehérje 1 receptor (GLP-1R) agonistákat alkalmazása a T2DM kezelésére jótékonyak bizonyul, azonban agyi hatásaikról emberben még nem áll rendelkezésre sok információ. Ezért megvizsgáltuk a GLP-1R mRNS és fehérje expresszióját T2DM betegségben szenvedő egyének hipotalamuszának paraventriculáris magjában (PVN), amely során megfigyeltük a GLP-1R expressziójának szignifikáns emelkedését.

Mivel az irodalomban öngyilkossággal foglalkozó tanulmányok eddig még nem számoltak be a DMN egyes területein több génre kiterjedő nagy áteresztőképességű vizsgálatokról, ezért kutatásainkkal először vetjük fel a lehetőséget, hogy a DMN kérgi területeinek génexpressziós változásainak szerepe lehet az öngyilkos viselkedés kialakulásában. Emellett olyan eredményekkel is szolgálhatunk, melyek alapján újabb potenciális gyógyszer-célpontok és biomarkerek azonosíthatók.

8. SUMMARY

Our main topic focused on the dorsomedial prefrontal cortex (DMPFC), which is associated with mood disorders and considered one of the major and functionally significant components of the default mode network (DMN). However, expressional alterations related to depression and suicidal behavior have not been reported in the DMPFC, so we aimed to examine the transcriptomic changes in the DMPFC of suicide victims. To achieve this, we isolated DMPFC cortical samples from eight control and eight suicidal individuals and used high-throughput RNA sequencing for transcriptome analysis on the isolated samples. Between the control and suicide groups, we found more than 1000 significantly altered genes. Gene set enrichment analysis revealed that mitochondrial electron transport, glial functions, cell surface receptor signaling, and glutamatergic synaptic signaling were overrepresented in suicide victims, suggesting that these processes are involved in suicidal behavior. The neuronal calcium-binding protein 2 (NECAB2) was one of the differentially expressed genes. Since NECAB2 may have great importance in modulating neuronal functions, and was previously not fully characterized for its role in mood disorders, we aimed to further characterize its histological distribution in different layers of the DMPFC. Our findings suggest that NECAB2 is expressed in two different interneuron subtypes. Besides that, NECAB2 is present in the somatodendritic compartment as well as in axonal boutons, furthermore, it is not expressed in pyramidal and glial cells. During our gene-disease association analyses, we found the involvement of several genes in depression and several diseases comorbid with depression, such as type 2 diabetes mellitus (T2DM).

The glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) agonists have been approved for the treatment of T2DM, however, the brain actions of these drugs have not been properly established in humans. In this regard, we measured the mRNA and protein expression of GLP-1R in hypothalamic samples of patients with T2DM and observed an elevated level of GLP-1R in the paraventricular nucleus (PVN).

Since studies of suicidal behavior have not yet been reported on high-throughput screening analyses covering several genes in the DMN, our results provide evidence for the role of gene expression changes in cortical areas of the DMN in suicidal behavior. Our results can also provide potential targets and biomarkers for new drug treatments for depression.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Collaborators GMD. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Psychiatry*. 2022;9(2):137-50.
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Washington, DC: *American Psychiatric Association*; 2013.
3. Wasserman D, Carli V, Iosue M, Javed A, Herrman H. Suicide prevention in psychiatric patients. *Asia-Pacific Psychiatry*. 2021;13(3):e12450.
4. World Health Organization. Mental Health-Suicide: *World Health Organization*; 2021 [updated 2021 June 17]. Available from: <https://www.who.int/teams/mental-health-and-substance-use/data-research/suicide-data>.
5. Nordentoft M, Mortensen PB, Pedersen CB. Absolute risk of suicide after first hospital contact in mental disorder. *Archives of General Psychiatry*. 2011;68(10):1058-64.
6. Dong M, Wang S-B, Li Y, Xu D-D, Ungvari GS, Ng CH, Chow IHI, Xiang Y-T. Prevalence of suicidal behaviors in patients with major depressive disorder in China: A comprehensive meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*. 2018;225:32-9.
7. Brådvik L, Berglund M. Repetition of suicide attempts across episodes of severe depression Behavioural sensitisation found in suicide group but not in controls. *BMC Psychiatry*. 2011;11(1):1-7.
8. Franklin JC, Ribeiro JD, Fox KR, Bentley KH, Kleiman EM, Huang X, Musacchio KM, Jaroszewski AC, Chang BP, Nock MK. Risk factors for suicidal thoughts and behaviors: A meta-analysis of 50 years of research. *Psychological Bulletin*. 2017;143(2):187.
9. Drysdale AT, Grosenick L, Downar J, Dunlop K, Mansouri F, Meng Y, Fetcho RN, Zebley B, Oathes DJ, Etkin A. Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. *Nature Medicine*. 2017;23(1):28-38.
10. Schmaal L, Pozzi E, C Ho T, Van Velzen LS, Veer IM, Opel N, Van Someren EJ, Han LK, Aftanas L, Aleman A. ENIGMA MDD: seven years of global neuroimaging studies of major depression through worldwide data sharing. *Translational Psychiatry*. 2020;10(1):1-19.

11. Li BJ, Friston K, Mody M, Wang HN, Lu HB, Hu DW. A brain network model for depression: From symptom understanding to disease intervention. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2018;24(11):1004-19.
12. Reisch T, Seifritz E, Esposito F, Wiest R, Valach L, Michel K. An fMRI study on mental pain and suicidal behavior. *Journal of Affective Disorders*. 2010;126(1-2):321-5.
13. Ma C, Ding J, Li J, Guo W, Long Z, Liu F, Gao Q, Zeng L, Zhao J, Chen H. Resting-state functional connectivity bias of middle temporal gyrus and caudate with altered gray matter volume in major depression. *PLoS One*. 2012.
14. Dombrovski AY, Siegle GJ, Szanto K, Clark L, Reynolds C, Aizenstein H. The temptation of suicide: striatal gray matter, discounting of delayed rewards, and suicide attempts in late-life depression. *Psychological Medicine*. 2012;42(6):1203-15.
15. Monkul E, Hatch JP, Nicoletti MA, Spence S, Brambilla P, Lacerda ALTd, Sassi RB, Mallinger A, Keshavan M, Soares JC. Fronto-limbic brain structures in suicidal and non-suicidal female patients with major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*. 2007;12(4):360-6.
16. Wagner G, Schultz CC, Koch K, Schachtzabel C, Sauer H, Schlösser RG. Prefrontal cortical thickness in depressed patients with high-risk for suicidal behavior. *Journal of Psychiatric Research*. 2012;46(11):1449-55.
17. Schmaal L, van Harmelen AL, Chatzi V, Lippard ETC, Toenders YJ, Averill LA, Mazure CM, Blumberg HP. Imaging suicidal thoughts and behaviors: a comprehensive review of 2 decades of neuroimaging studies. *Molecular Psychiatry*. 2020;25(2):408-27.
18. Wagner G, Koch K, Schachtzabel C, Schultz CC, Sauer H, Schlösser RG. Structural brain alterations in patients with major depressive disorder and high risk for suicide: Evidence for a distinct neurobiological entity? *NeuroImage*. 2011;54(2):1607-14.
19. Peng H, Wu K, Li J, Qi H, Guo S, Chi M, Wu X, Guo Y, Yang Y, Ning Y. Increased suicide attempts in young depressed patients with abnormal temporal–parietal–limbic gray matter volume. *Journal of Affective Disorders*. 2014;165:69-73.
20. Oquendo MA, Placidi GP, Malone KM, Campbell C, Keilp J, Brodsky B, Kegeles LS, Cooper TB, Parsey RV, Van Heertum RL. Positron emission tomography of regional brain metabolic responses to a serotonergic challenge and lethality of suicide attempts in major depression. *Archives of General Psychiatry*. 2003;60(1):14-22.

21. Amen DG, Prunella JR, Fallon JH, Amen B, Hanks C. A comparative analysis of completed suicide using high resolution brain SPECT imaging. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 2009;21(4):430-9.
22. Keilp JG, Gorlyn M, Russell M, Oquendo MA, Burke AK, Harkavy-Friedman J, Mann JJ. Neuropsychological function and suicidal behavior: attention control, memory and executive dysfunction in suicide attempt. *Psychological Medicine*. 2013;43(3):539-51.
23. Richard-Devantoy S, Berlim M, Jollant F. A meta-analysis of neuropsychological markers of vulnerability to suicidal behavior in mood disorders. *Psychological Medicine*. 2014;44(8):1663-73.
24. Gujral S, Dombrowski AY, Butters M, Clark L, Reynolds III CF, Szanto K. Impaired executive function in contemplated and attempted suicide in late life. *American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2014;22(8):811-9.
25. Gifuni AJ, Perret LC, Lacourse E, Geoffroy M-C, Mbekou V, Jollant F, Renaud J. Decision-making and cognitive control in adolescent suicidal behaviors: a qualitative systematic review of the literature. *European Child & Adolescent Psychiatry*. 2021;30(12):1839-55.
26. Chen VC-H, Chou Y-S, Tsai Y-H, Huang Y-C, McIntyre RS, Weng J-C. Resting-state functional connectivity and brain network abnormalities in depressive patients with suicidal ideation. *Brain Topography*. 2021;34(2):234-44.
27. Kim K, Kim S-W, Myung W, Han CE, Fava M, Mischoulon D, Papakostas GI, Seo SW, Cho H, Seong J-K. Reduced orbitofrontal-thalamic functional connectivity related to suicidal ideation in patients with major depressive disorder. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-11.
28. Wei S, Chang M, Zhang R, Jiang X, Wang F, Tang Y. Amygdala functional connectivity in female patients with major depressive disorder with and without suicidal ideation. *Annals of General Psychiatry*. 2018;17(1):1-7.
29. Qiao D, Zhang A, Sun N, Yang C, Li J, Zhao T, Wang Y, Xu Y, Wen Y, Zhang K. Altered static and dynamic functional connectivity of habenula associated with suicidal ideation in first-episode, drug-naïve patients with major depressive disorder. *Frontiers in Psychiatry*. 2020;11:608197.

30. Du L, Zeng J, Liu H, Tang D, Meng H, Li Y, Fu Y. Fronto-limbic disconnection in depressed patients with suicidal ideation: a resting-state functional connectivity study. *Journal of Affective Disorders*. 2017;215:213-7.
31. Northoff G. Spatiotemporal psychopathology I: no rest for the brain's resting state activity in depression? Spatiotemporal psychopathology of depressive symptoms. *Journal of Affective Disorders*. 2016;190:854-66.
32. Fan T, Wu X, Yao L, Dong J. Abnormal baseline brain activity in suicidal and non-suicidal patients with major depressive disorder. *Neuroscience Letters*. 2013;534:35-40.
33. Cao J, Chen X, Chen J, Ai M, Gan Y, Wang W, Lv Z, Zhang S, Zhang S, Wang S. Resting-state functional MRI of abnormal baseline brain activity in young depressed patients with and without suicidal behavior. *Journal of Affective Disorders*. 2016;205:252-63.
34. Kang SG, Na KS, Choi JW, Kim JH, Son YD, Lee YJ. Resting-state functional connectivity of the amygdala in suicide attempters with major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2017;77:222-7.
35. Andreasen NC, O'Leary DS, Cizadlo T, Arndt S, Rezai K, Watkins GL, Ponto LL, Hichwa RD. Remembering the past: two facets of episodic memory explored with positron emission tomography. *American Journal of Psychiatry*. 1995;152(11):1576-85.
36. Barkhof F, Haller S, Rombouts SA. Resting-state functional MR imaging: a new window to the brain. *Radiology*. 2014;272(1):29-49.
37. Lee MH, Smyser CD, Shimony JS. Resting-state fMRI: a review of methods and clinical applications. *American Journal of Neuroradiology*. 2013;34(10):1866-72.
38. Shimony JS, Zhang D, Johnston JM, Fox MD, Roy A, Leuthardt EC. Resting-state spontaneous fluctuations in brain activity: a new paradigm for presurgical planning using fMRI. *Academic Radiology*. 2009;16(5):578-83.
39. Liang B, Zhang D, Wen X, Xu P, Peng X, Huang X, Liu M, Huang R. Brain spontaneous fluctuations in sensorimotor regions were directly related to eyes open and eyes closed: evidences from a machine learning approach. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2014;8:645.
40. Rosazza C, Minati L. Resting-state brain networks: literature review and clinical applications. *Neurological Sciences*. 2011;32(5):773-85.

41. Menon V. Large-scale brain networks and psychopathology: a unifying triple network model. *Trends in Cognitive Sciences*. 2011;15(10):483-506.
42. Menon V, Uddin LQ. Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function. *Brain Structure and Function*. 2010;214(5):655-67.
43. Fox MD, Snyder AZ, Vincent JL, Corbetta M, Van Essen DC, Raichle ME. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. *PNAS*. 2005;102(27):9673-8.
44. Buckner RL, Andrews-Hanna JR, Schacter DL. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1124:1-38.
45. Harrison BJ, Pujol J, López-Solà M, Hernández-Ribas R, Deus J, Ortiz H, Soriano-Mas C, Yücel M, Pantelis C, Cardoner N. Consistency and functional specialization in the default mode brain network. *PNAS*. 2008;105(28):9781-6.
46. Spreng RN, Mar RA, Kim ASN. The common neural basis of autobiographical memory, prospection, navigation, theory of mind, and the default mode: a quantitative meta-analysis. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 2009;21(3):489-510.
47. Mars RB, Neubert F-X, Noonan MP, Sallet J, Toni I, Rushworth MF. On the relationship between the “default mode network” and the “social brain”. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2012;6:189.
48. Andrews-Hanna JR, Smallwood J, Spreng RN. The default network and self-generated thought: component processes, dynamic control, and clinical relevance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1316(1):29-52.
49. Gusnard DA, Raichle ME. Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001;2(10):685-94.
50. Andrews-Hanna JR, Reidler JS, Sepulcre J, Poulin R, Buckner RL. Functional-anatomic fractionation of the brain's default network. *Neuron*. 2010;65(4):550-62.
51. Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL. A default mode of brain function. *PNAS*. 2001;98(2):676-82.
52. Spreng RN, DuPre E, Selarka D, Garcia J, Gojkovic S, Mildner J, Luh W-M, Turner GR. Goal-congruent default network activity facilitates cognitive control. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(42):14108-14.

53. Sridharan D, Levitin DJ, Menon V. A critical role for the right fronto-insular cortex in switching between central-executive and default-mode networks. *PNAS*. 2008;105(34):12569-74.
54. Seeley WW, Menon V, Schatzberg AF, Keller J, Glover GH, Kenna H, Reiss AL, Greicius MD. Dissociable intrinsic connectivity networks for salience processing and executive control. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(9):2349-56.
55. Craig AD. How do you feel — now? The anterior insula and human awareness. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(1):59-70.
56. Zang YF, He Y, Zhu CZ, Cao QJ, Sui MQ, Liang M, Tian LX, Jiang TZ, Wang YF. Altered baseline brain activity in children with ADHD revealed by resting-state functional MRI. *Brain and Development*. 2007;29(2):83-91.
57. Khadka S, Meda SA, Stevens MC, Glahn DC, Calhoun VD, Sweeney JA, Tamminga CA, Keshavan MS, O'Neil K, Schretlen D. Is aberrant functional connectivity a psychosis endophenotype? A resting state functional magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry*. 2013;74(6):458-66.
58. Manoliu A, Meng C, Brandl F, Doll A, Tahmasian M, Scherr M, Schwerthöffer D, Zimmer C, Förstl H, Bäuml J, Riedl V, Wohlschläger AM, Sorg C. Insular dysfunction within the salience network is associated with severity of symptoms and aberrant inter-network connectivity in major depressive disorder. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013;7:930.
59. Zheng H, Xu L, Xie F, Guo X, Zhang J, Yao L, Wu X. The altered triple networks interaction in depression under resting state based on graph theory. *BioMed Research International*. 2015;2015:386326.
60. Wu X, Li Q, Yu X, Chen K, Fleisher AS, Guo X, Zhang J, Reiman EM, Yao L, Li R. A triple network connectivity study of large-scale brain systems in cognitively normal APOE4 carriers. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2016;8:231.
61. Biswal B, Zerrin Yetkin F, Haughton VM, Hyde JS. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*. 1995;34(4):537-41.
62. Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *PNAS*. 2003;100(1):253-8.

63. Reineberg AE, Andrews-Hanna JR, Depue BE, Friedman NP, Banich MT. Resting-state networks predict individual differences in common and specific aspects of executive function. *NeuroImage*. 2015;104:69-78.
64. Raichle ME. The brain's default mode network. *Annual Review of Neuroscience*. 2015;38:433-47.
65. Andrews-Hanna JR. The brain's default network and its adaptive role in internal mentation. *Neuroscientist*. 2012;18(3):251-70.
66. Dixon ML, Andrews-Hanna JR, Spreng RN, Irving ZC, Mills C, Girn M, Christoff K. Interactions between the default network and dorsal attention network vary across default subsystems, time, and cognitive states. *NeuroImage*. 2017;147:632-49.
67. Figley TD, Bhullar N, Courtney SM, Figley CR. Probabilistic atlases of default mode, executive control and salience network white matter tracts: an fMRI-guided diffusion tensor imaging and tractography study. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2015;9:585.
68. Leech R, Sharp DJ. The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease. *Brain*. 2014;137(1):12-32.
69. Cavanna AE, Trimble MR. The precuneus: a review of its functional anatomy and behavioural correlates. *Brain*. 2006;129(3):564-83.
70. Xu X, Yuan H, Lei X. Activation and connectivity within the Default Mode Network contribute independently to future-oriented thought. *Scientific Reports*. 2016;6(1):21001.
71. Buckner RL, Carroll DC. Self-projection and the brain. *Trends in Cognitive Sciences*. 2007;11(2):49-57.
72. Buckner RL, Andrews-Hanna JR, Schacter DL. The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 2008;1124(1):1-38.
73. Krönke KM, Wolff M, Shi Y, Kräplin A, Smolka MN, Bühringer G, Goschke T. Functional connectivity in a triple-network saliency model is associated with real-life self-control. *Neuropsychologia*. 2020;149:107667.
74. Christoff K, Gordon AM, Smallwood J, Smith R, Schooler JW. Experience sampling during fMRI reveals default network and executive system contributions to mind wandering. *PNAS*. 2009;106(21):8719-24.

75. Beaty RE, Benedek M, Wilkins RW, Jauk E, Fink A, Silvia PJ, Hodges DA, Koschutnig K, Neubauer AC. Creativity and the default network: A functional connectivity analysis of the creative brain at rest. *Neuropsychologia*. 2014;64:92-8.
76. Mohan A, Roberto AJ, Mohan A, Lorenzo A, Jones K, Carney MJ, Liogier-Weyback L, Hwang S, Lapidus KA. Focus: the aging brain: the significance of the default mode network (DMN) in neurological and neuropsychiatric disorders: a review. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2016;89(1):49.
77. Zhou HX, Chen X, Shen YQ, Li L, Chen NX, Zhu ZC, Castellanos FX, Yan CG. Rumination and the default mode network: Meta-analysis of brain imaging studies and implications for depression. *NeuroImage*. 2020;206:116287.
78. Brewer JA, Worhunsky PD, Gray JR, Tang Y-Y, Weber J, Kober H. Meditation experience is associated with differences in default mode network activity and connectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(50):20254-9.
79. Chen L, Rao B, Li S, Gao L, Xie Y, Dai X, Fu K, Peng XZ, Xu H. Altered effective connectivity measured by resting-state functional magnetic resonance imaging in posterior parietal-frontal-striatum circuit in patients with disorder of consciousness. *Frontiers in Neuroscience*. 2021;15:766633.
80. Haber SN, Knutson B. The reward circuit: Linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):4-26.
81. Coenen VA, Schumacher LV, Kaller C, Schlaepfer TE, Reinacher PC, Egger K, Urbach H, Reisert M. The anatomy of the human medial forebrain bundle: Ventral tegmental area connections to reward-associated subcortical and frontal lobe regions. *NeuroImage: Clinical*. 2018;18:770-83.
82. Li W, Mai X, Liu C. The default mode network and social understanding of others: what do brain connectivity studies tell us. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2014;8:74.
83. Eickhoff SB, Laird AR, Fox PT, Bzdok D, Hensel L. Functional segregation of the human dorsomedial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. 2016;26(1):304-21.
84. Taren AA, Venkatraman V, Huettel SA. A parallel functional topography between medial and lateral prefrontal cortex: evidence and implications for cognitive control. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(13):5026-31.

85. Fettes P, Schulze L, Downar J. Cortico-striatal-thalamic loop circuits of the orbitofrontal cortex: promising therapeutic targets in psychiatric illness. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2017;11:25.
86. Roy M, Shohamy D, Wager TD. Ventromedial prefrontal-subcortical systems and the generation of affective meaning. *Trends in Cognitive Sciences*. 2012;16(3):147-56.
87. Von Der Heide RJ, Skipper LM, Klobusicky E, Olson IR. Dissecting the uncinate fasciculus: disorders, controversies and a hypothesis. *Brain*. 2013;136(Pt 6):1692-707.
88. Price G, Cercignani M, Parker GJ, Altmann DR, Barnes TR, Barker GJ, Joyce EM, Ron MA. White matter tracts in first-episode psychosis: a DTI tractography study of the uncinate fasciculus. *Neuroimage*. 2008;39(3):949-55.
89. Hau J, Sarubbo S, Houde JC, Corsini F, Girard G, Deledalle C, Crivello F, Zago L, Mellet E, Jobard G, Joliot M, Mazoyer B, Tzourio-Mazoyer N, Descoteaux M, Petit L. Revisiting the human uncinate fasciculus, its subcomponents and asymmetries with stem-based tractography and microdissection validation. *Brain Structure and Function*. 2017;222(4):1645-62.
90. Hare TA, Hakimi S, Rangel A. Activity in dlPFC and its effective connectivity to vmPFC are associated with temporal discounting. *Frontiers in Neuroscience*. 2014;8:50.
91. Marsh AA, Blair KS, Jones MM, Soliman N, Blair RJR. Dominance and submission: The ventrolateral prefrontal cortex and responses to status cues. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 2009;21(4):713-24.
92. Kamali A, Flanders AE, Brody J, Hunter JV, Hasan KM. Tracing superior longitudinal fasciculus connectivity in the human brain using high resolution diffusion tensor tractography. *Brain Structure and Function*. 2014;219(1):269-81.
93. Bushara KO, Weeks RA, Ishii K, Catalan M-J, Tian B, Rauschecker JP, Hallett M. Modality-specific frontal and parietal areas for auditory and visual spatial localization in humans. *Nature Neuroscience*. 1999;2(8):759-66.
94. Cauda F, D'Agata F, Sacco K, Duca S, Geminiani G, Vercelli A. Functional connectivity of the insula in the resting brain. *NeuroImage*. 2011;55(1):8-23.
95. Kuzmanovic B, Rigoux L, Tittgemeyer M. Influence of vmPFC on dmPFC predicts valence-guided belief formation. *Journal of Neuroscience*. 2018;38(37):7996-8010.

96. Mullette-Gillman OA, Huettel SA. Neural substrates of contingency learning and executive control: dissociating physical, valuative, and behavioral changes. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2009;3:23.
97. Cacciola A, Calamuneri A, Milardi D, Mormina E, Chillemi G, Marino S, Naro A, Rizzo G, Anastasi G, Quartarone A. A connectomic analysis of the human basal ganglia network. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2017;11.
98. Isaacs BR, Forstmann BU, Temel Y, Keuken MC. The connectivity fingerprint of the human frontal cortex, subthalamic nucleus, and striatum. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2018;12:60.
99. Kotz S. Differential input of the supplementary motor area to a dedicated temporal processing network: functional and clinical implications. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2011;5.
100. Eryilmaz H, Rodriguez-Thompson A, Tanner AS, Giegold M, Huntington FC, Roffman JL. Neural determinants of human goal-directed vs. habitual action control and their relation to trait motivation. *Scientific Reports*. 2017;7(1):6002.
101. Utevsky AV, Smith DV, Huettel SA. Precuneus is a functional core of the default-mode network. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(3):932-40.
102. Cavanna AE. The precuneus and consciousness. *CNS Spectrums*. 2007;12(7):545-52.
103. Bruner E, Pereira-Pedro AS, Chen X, Rilling JK. Precuneus proportions and cortical folding: a morphometric evaluation on a racially diverse human sample. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2017;211:120-8.
104. Bruner E, Rangel de Lázaro G, de la Cuétara JM, Martín-Loeches M, Colom R, Jacobs HI. Midsagittal brain variation and MRI shape analysis of the precuneus in adult individuals. *Journal of Anatomy*. 2014;224(4):367-76.
105. Bruton OJ. Is there a “g-neuron”? Establishing a systematic link between general intelligence (g) and the von Economo neuron. *Intelligence*. 2021;86:101540.
106. Margulies DS, Vincent JL, Kelly C, Lohmann G, Uddin LQ, Biswal BB, Villringer A, Castellanos FX, Milham MP, Petrides M. Precuneus shares intrinsic functional architecture in humans and monkeys. *PNAS*. 2009;106(47):20069-74.
107. Menon V, D'Esposito M. The role of PFC networks in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology*. 2022;47(1):90-103.

108. Jung J, Lambon Ralph MA, Jackson RL. Subregions of DLPFC display graded yet distinct structural and functional connectivity. *Journal of Neuroscience*. 2022;42(15):3241-52.
109. Wu Y, Sun D, Wang Y, Wang Y, Ou S. Segmentation of the cingulum bundle in the human brain: A new perspective based on DSI tractography and fiber dissection study. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2016;10:84.
110. Yeager BE, Bruss J, Duffau H, Herbet G, Hwang K, Tranel D, Boes AD. Central precuneus lesions are associated with impaired executive function. *Brain Structure and Function*. 2022;227(9):3099-108.
111. Spreng RN, Stevens WD, Chamberlain JP, Gilmore AW, Schacter DL. Default network activity, coupled with the frontoparietal control network, supports goal-directed cognition. *NeuroImage*. 2010;53(1):303-17.
112. Beaty RE, Seli P, Schacter DL. Network neuroscience of creative cognition: mapping cognitive mechanisms and individual differences in the creative brain. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2019;27:22-30.
113. Fuentealba-Villarreal FJ, Renner J, Hilbig A, Bruton OJ, Rasia-Filho AA. Spindle-shaped neurons in the human posteromedial (precuneus) cortex. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2021;13:769228.
114. Kelley WM, Macrae CN, Wyland CL, Caglar S, Inati S, Heatherton TF. Finding the self? An event-related fMRI study. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 2002;14(5):785-94.
115. Northoff G, Heinzel A, De Greck M, Berman F, Dobrowolny H, Panksepp J. Self-referential processing in our brain—a meta-analysis of imaging studies on the self. *NeuroImage*. 2006;31(1):440-57.
116. Macrae CN, Moran JM, Heatherton TF, Banfield JF, Kelley WM. Medial prefrontal activity predicts memory for self. *Cerebral Cortex*. 2004;14(6):647-54.
117. Kober H, Barrett LF, Joseph J, Bliss-Moreau E, Lindquist K, Wager TD. Functional grouping and cortical-subcortical interactions in emotion: a meta-analysis of neuroimaging studies. *NeuroImage*. 2008;42(2):998-1031.
118. Berman F, Pascual-Leone A, Amedi A, Merabet LB, Fregni F, Gaab N, Alsop D, Schlaug G, Northoff G. Attentional modulation of emotional stimulus processing: an fMRI study using emotional expectancy. *Human Brain Mapping*. 2006;27(8):662-77.

119. Phan KL, Fitzgerald DA, Nathan PJ, Moore GJ, Uhde TW, Tancer ME. Neural substrates for voluntary suppression of negative affect: a functional magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry*. 2005;57(3):210-9.
120. Báez-Mendoza R, Vázquez Y, Mastrobattista EP, Williams ZM. Neuronal circuits for social decision-making and their clinical implications. *Frontiers in Neuroscience*. 2021;15:720294.
121. Anticevic A, Cole MW, Murray JD, Corlett PR, Wang XJ, Krystal JH. The role of default network deactivation in cognition and disease. *Trends in Cognitive Sciences*. 2012;16(12):584-92.
122. Kolling N, O'Reilly JX. State-change decisions and dorsomedial prefrontal cortex: the importance of time. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2018;22:152-60.
123. Bressler SL, Menon V. Large-scale brain networks in cognition: emerging methods and principles. *Trends in Cognitive Sciences*. 2010;14(6):277-90.
124. Lieberman MD, Straccia MA, Meyer ML, Du M, Tan KM. Social, self, (situational), and affective processes in medial prefrontal cortex (MPFC): Causal, multivariate, and reverse inference evidence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2019;99:311-28.
125. Bzdok D, Langner R, Schilbach L, Engemann DA, Laird AR, Fox PT, Eickhoff SB. Segregation of the human medial prefrontal cortex in social cognition. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013;7:232.
126. Northoff G, Heinzl A, Bermpohl F, Niese R, Pfennig A, Pascual-Leone A, Schlaug G. Reciprocal modulation and attenuation in the prefrontal cortex: an fMRI study on emotional-cognitive interaction. *Human Brain Mapping*. 2004;21(3):202-12.
127. Forster SE, Brown JW. Medial prefrontal cortex predicts and evaluates the timing of action outcomes. *NeuroImage*. 2011;55(1):253-65.
128. Kang P, Lee J, Sul S, Kim H. Dorsomedial prefrontal cortex activity predicts the accuracy in estimating others' preferences. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013;7:686.
129. Moll J, de Oliveira-Souza R, Moll FT, Ignácio FA, Bramati IE, Caparelli-Dáquer EM, Eslinger PJ. The moral affiliations of disgust: a functional MRI study. *Cognitive and Behavioral Neurology*. 2005;18(1):68-78.

130. Greene J, Haidt J. How (and where) does moral judgment work? *Trends in Cognitive Sciences*. 2002;6(12):517-23.
131. Molenberghs P, Johnson H, Henry JD, Mattingley JB. Understanding the minds of others: A neuroimaging meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2016;65:276-91.
132. Wang Y, Olson IR. The original social network: White matter and social cognition. *Trends in Cognitive Sciences*. 2018;22(6):504-16.
133. Wagner DD, Haxby JV, Heatherton TF. The representation of self and person knowledge in the medial prefrontal cortex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*. 2012;3(4):451-70.
134. Zhang H, Dong Z, Cai S, Zhao J. Distinguishing the roles of the dorsomedial prefrontal cortex and right temporoparietal junction in altruism in situations of inequality: A transcranial direct current stimulation study. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2022;16:821360.
135. Soutschek A, Nadporozhskaia L, Christian P. Brain stimulation over dorsomedial prefrontal cortex modulates effort-based decision making. *Cognitive, Affective, and Behavioral Neuroscience*. 2022;22(6):1264-74.
136. Liu X, Jiang W, Yuan Y. Aberrant default mode network underlying the cognitive deficits in the patients with late-onset depression. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018;10.
137. Yang Y, Cui Q, Lu F, Pang Y, Chen Y, Tang Q, Li D, Lei T, He Z, Hu S, Deng J, Chen H. Default mode network subsystem alterations in bipolar disorder during major depressive episode. *Journal of Affective Disorders*. 2021;281:856-64.
138. Olson EA, Kaiser RH, Pizzagalli DA, Rauch SL, Rosso IM. Anhedonia in trauma-exposed individuals: Functional connectivity and decision-making correlates. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*. 2018;3(11):959-67.
139. Deligiannidis KM, Fales CL, Kroll-Desrosiers AR, Shaffer SA, Villamarin V, Tan Y, Hall JE, Frederick BB, Sikoglu EM, Edden RA, Rothschild AJ, Moore CM. Resting-state functional connectivity, cortical GABA, and neuroactive steroids in peripartum and peripartum depressed women: a functional magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44(3):546-54.

140. Zhang S, Wang W, Wang G, Li B, Chai L, Guo J, Gao X. Aberrant resting-state interhemispheric functional connectivity in patients with postpartum depression. *Behavioural Brain Research*. 2020;382:112483.
141. Molnar-Szakacs I, Uddin LQ. Self-processing and the default mode network: interactions with the mirror neuron system. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013;7:571.
142. Thaïss L, Petrides M. Autobiographical memory of the recent past following frontal cortex or temporal lobe excisions. *European Journal of Neuroscience*. 2008;28(4):829-40.
143. Wen T, Mitchell DJ, Duncan J. The functional convergence and heterogeneity of social, episodic, and self-referential thought in the Default Mode Network. *Cerebral Cortex*. 2020;30(11):5915-29.
144. Peng D, Liddle EB, Iwabuchi SJ, Zhang C, Wu Z, Liu J, Jiang K, Xu L, Liddle PF, Palaniyappan L, Fang Y. Dissociated large-scale functional connectivity networks of the precuneus in medication-naïve first-episode depression. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2015;232(3):250-6.
145. Hawton K, Casanas ICC, Haw C, Saunders K. Risk factors for suicide in individuals with depression: a systematic review. *Journal of Affective Disorders*. 2013;147(1-3):17-28.
146. Turecki G, Brent DA. Suicide and suicidal behaviour. *The Lancet*. 2016;387(10024):1227-39.
147. Malhi GS, Das P, Outhred T, Bryant RA, Calhoun V, Mann JJ. Default mode dysfunction underpins suicidal activity in mood disorders. *Psychological Medicine*. 2020;50(7):1214-23.
148. Brown RC, Plener PL, Groen G, Neff D, Bonenberger M, Abler B. Differential Neural Processing of Social Exclusion and Inclusion in Adolescents with Non-Suicidal Self-Injury and Young Adults with Borderline Personality Disorder. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;8:267.
149. Shao R, Gao M, Lin C, Huang CM, Liu HL, Toh CH, Wu C, Tsai YF, Qi D, Lee SH, Lee TMC. Multimodal neural evidence on the corticostriatal underpinning of suicidality in late-life depression. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*. 2022;7(9):905-15.

150. Marchand WR, Lee JN, Johnson S, Thatcher J, Gale P, Wood N, Jeong E-K. Striatal and cortical midline circuits in major depression: implications for suicide and symptom expression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012;36(2):290-9.
151. Kreuzer PM, Downar J, de Ridder D, Schwarzbach J, Schecklmann M, Langguth B. A comprehensive review of dorsomedial prefrontal cortex rTMS utilizing a double cone coil. *Neuromodulation*. 2019;22(8):851-66.
152. Schulze L, Feffer K, Lozano C, Giacobbe P, Daskalakis ZJ, Blumberger DM, Downar J. Number of pulses or number of sessions? An open-label study of trajectories of improvement for once-vs. twice-daily dorsomedial prefrontal rTMS in major depression. *Brain Stimulation*. 2018;11(2):327-36.
153. Bakker N, Shahab S, Giacobbe P, Blumberger DM, Daskalakis ZJ, Kennedy SH, Downar J. rTMS of the dorsomedial prefrontal cortex for major depression: safety, tolerability, effectiveness, and outcome predictors for 10 Hz versus intermittent theta-burst stimulation. *Brain Stimulation*. 2015;8(2):208-15.
154. Miron JP, Feffer K, Cash RFH, Derakhshan D, Kim JMS, Fettes P, Giacobbe P, Blumberger DM, Daskalakis ZJ, Downar J. Safety, tolerability and effectiveness of a novel 20 Hz rTMS protocol targeting dorsomedial prefrontal cortex in major depression: An open-label case series. *Brain Stimulation*. 2019;12(5):1319-21.
155. Boden R, Bengtsson J, Thornblom E, Struckmann W, Persson J. Dorsomedial prefrontal theta burst stimulation to treat anhedonia, avolition, and blunted affect in schizophrenia or depression - a randomized controlled trial. *Journal of Affective Disorders*. 2021;290:308-15.
156. Feffer K, Peters SK, Bhui K, Downar J, Giacobbe P. Successful dorsomedial prefrontal rTMS for major depression in borderline personality disorder: three cases. *Brain Stimulation*. 2017.
157. Shiota S, Okamoto Y, Okada G, Takagaki K, Takamura M, Mori A, Yokoyama S, Nishiyama Y, Jinnin R, Hashimoto RI, Yamawaki S. Effects of behavioural activation on the neural basis of other perspective self-referential processing in subthreshold depression: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychological Medicine*. 2017;47(5):877-88.

158. Abdallah CG, Averill LA, Collins KA, Geha P, Schwartz J, Averill C, DeWilde KE, Wong E, Anticevic A, Tang CY, Iosifescu DV, Charney DS, Murrough JW. Ketamine treatment and global brain connectivity in major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(6):1210-9.
159. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008;455(7215):894-902.
160. Cowen PJ. Neuroendocrine and neurochemical processes in depression. *Psychopathology Review*. 2016;3(1):3-15.
161. Gryglewski G, Lanzenberger R, Kranz GS, Cumming P. Meta-analysis of molecular imaging of serotonin transporters in major depression. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014;34(7):1096-103.
162. Meyer JH, Ginovart N, Boovariwala A, Sagrati S, Hussey D, Garcia A, Young T, Praschak-Rieder N, Wilson AA, Houle S. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Archives of General Psychiatry*. 2006;63(11):1209-16.
163. Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ. Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C] WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Archives of General Psychiatry*. 2000;57(2):174-80.
164. Sanacora G. Cortical inhibition, gamma-aminobutyric acid, and major depression: there is plenty of smoke but is there fire? *Biological Psychiatry*. 2010;67(5):397-8.
165. Croarkin PE, Levinson AJ, Daskalakis ZJ. Evidence for GABAergic inhibitory deficits in major depressive disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2011;35(3):818-25.
166. Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(5):426-37.
167. Rajkowska G, O'Dwyer G, Teleki Z, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ. GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(2):471-82.
168. Maciag D, Hughes J, O'Dwyer G, Pride Y, Stockmeier CA, Sanacora G, Rajkowska G. Reduced density of calbindin immunoreactive GABAergic neurons in the

occipital cortex in major depression: relevance to neuroimaging studies. *Biological Psychiatry*. 2010;67(5):465-70.

169. Machado-Vieira R, Salvadore G, Ibrahim LA, Diaz-Granados N, Zarate Jr CA. Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders. *Current Pharmaceutical Design*. 2009;15(14):1595-611.

170. Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biological Psychiatry*. 2007;62(11):1310-6.

171. Trullas R, Skolnick P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *European Journal of Pharmacology*. 1990;185(1):1-10.

172. Skolnick P, Legutko B, Li X, Bymaster FP. Current perspectives on the development of non-biogenic amine-based antidepressants. *Pharmacological Research*. 2001;43(5):411-22.

173. Pérez-Esparza R. Ketamine for treatment-resistant depression: a new advocate. *Revista de Investigación Clínica*. 2018;70(2):65-7.

174. Dhir A. Investigational drugs for treating major depressive disorder. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2017;26(1):9-24.

175. O'shea R. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2002;29(11):1018-23.

176. Conti F, Minelli A, Melone M. GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Research Reviews*. 2004;45(3):196-212.

177. John CS, Sypek EI, Carlezon WA, Cohen BM, Öngür D, Bechtholt AJ. Blockade of the GLT-1 transporter in the central nucleus of the amygdala induces both anxiety and depressive-like symptoms. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(7):1700-8.

178. John CS, Smith KL, Van't Veer A, Gompf HS, Carlezon WA, Cohen BM, Öngür D, Bechtholt-Gompf AJ. Blockade of astrocytic glutamate uptake in the prefrontal cortex induces anhedonia. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(11):2467-75.

179. Zhang X, Tang Y, Maletic-Savatic M, Sheng J, Zhang X, Zhu Y, Zhang T, Wang J, Tong S, Wang J. Altered neuronal spontaneous activity correlates with glutamate concentration in medial prefrontal cortex of major depressed females: an fMRI-MRS study. *Journal of Affective Disorders*. 2016;201:153-61.

180. Yüksel C, Öngür D. Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. *Biological Psychiatry*. 2010;68(9):785-94.
181. Rosa CE, Soares JC, Figueiredo FP, Cavalli RC, Barbieri MA, Schaufelberger MS, Salmon CE, Del-Ben CM, Santos AC. Glutamatergic and neural dysfunction in postpartum depression using magnetic resonance spectroscopy. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2017;265:18-25.
182. Brown ES, Varghese FP, McEwen BS. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biological Psychiatry*. 2004;55(1):1-9.
183. Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*. 2008;31(9):464-8.
184. Valdés-Tovar M, Estrada-Reyes R, Solís-Chagoyán H, Argueta J, Dorantes-Barrón AM, Quero-Chávez D, Cruz-Garduño R, Cercós MG, Trueta C, Oikawa-Sala J. Circadian modulation of neuroplasticity by melatonin: a target in the treatment of depression. *British Journal of Pharmacology*. 2018;175(16):3200-8.
185. Neumann ID, Landgraf R. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in Neurosciences*. 2012;35(11):649-59.
186. Frangou S, Shirali M, Adams MJ, Howard DM, Gibson J, Hall LS, Smith BH, Padmanabhan S, Murray AD, Porteous DJ, Haley CS, Deary IJ, Clarke T-K, McIntosh AM. Insulin resistance: Genetic associations with depression and cognition in population based cohorts. *Experimental Neurology*. 2019;316:20-6.
187. Lemche AV, Chaban OS, Lemche E. Depression contributing to dyslipidemic cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2017;40(5):539-46.
188. Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, de Groot M, Carney RM, Clouse RE. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. *Diabetes Care*. 2000;23(7):934-42.
189. Pouwer F, Beekman AT, Nijpels G, Dekker J, Snoek FJ, Kostense P, Heine R, Deeg D. Rates and risks for co-morbid depression in patients with Type 2 diabetes mellitus: results from a community-based study. *Diabetologia*. 2003;46(7):892-8.

190. Moulton CD, Pickup JC, Ismail K. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2015;3(6):461-71.
191. Hansen HH, Fabricius K, Barkholt P, Niehoff ML, Morley JE, Jelsing J, Pyke C, Knudsen LB, Farr SA, Vrang N. The GLP-1 receptor agonist liraglutide improves memory function and increases hippocampal CA1 neuronal numbers in a senescence-accelerated mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015;46(4):877-88.
192. Hölscher C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases. *Journal of Endocrinology*. 2014;221(1):T31-41.
193. Maskery MP, Holscher C, Jones SP, Price CI, Strain WD, Watkins CL, Werring DJ, Emsley HC. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists as neuroprotective agents for ischemic stroke: a systematic scoping review. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2021;41(1):14-30.
194. Lv M, Xue G, Cheng H, Meng P, Lian X, Hölscher C, Li D. The GLP-1/GIP dual-receptor agonist DA5-CH inhibits the NF- κ B inflammatory pathway in the MPTP mouse model of Parkinson's disease more effectively than the GLP-1 single-receptor agonist NLY01. *Brain and Behavior*. 2021;11(8):e2231.
195. Detka J, Głombik K. Insights into a possible role of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of depression. *Pharmacological Reports*. 2021;73(4):1020-32.
196. Nadkarni P, Chepurny OG, Holz GG. Regulation of glucose homeostasis by GLP-1. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2014;121:23-65.
197. Mainardi M, Fusco S, Grassi C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural Plasticity*. 2015;2015.
198. Onoviran OF, Li D, Toombs Smith S, Raji MA. Effects of glucagon-like peptide 1 receptor agonists on comorbidities in older patients with diabetes mellitus. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2019;10:2040622319862691.
199. Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ. Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes*. 2008;57(8):2046-54.

200. McMahon LR, Wellman PJ. PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *American Journal of Physiology*. 1998;274(1):R23-9.
201. Sisley S, Gutierrez-Aguilar R, Scott M, D'Alessio DA, Sandoval DA, Seeley RJ. Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(6):2456-63.
202. Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P. Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*. 1999;403(2):261-80.
203. Llewellyn-Smith IJ, Gnanamanickam GJ, Reimann F, Gribble FM, Trapp S. Preproglucagon (PPG) neurons innervate neurochemically identified autonomic neurons in the mouse brainstem. *Neuroscience*. 2013;229:130-43.
204. Hayes MR, Schmidt HD. GLP-1 influences food and drug reward. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2016;9:66-70.
205. Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai H-C, Finkelstein J, Kim S-Y, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*. 2013;493(7433):537-41.
206. Mohammadi M, Nasehi M, Zarrindast MR. Modulation of the effects of the cannabinoid agonist, ACPA, on spatial and non-spatial novelty detection in mice by dopamine D1 receptor drugs infused into the basolateral amygdala. *Behavioural Brain Research*. 2015;280:36-44.
207. Lietzau G, Magni G, Kehr J, Yoshitake T, Candeias E, Duarte AI, Pettersson H, Skogsberg J, Abbracchio MP, Klein T, Nyström T, Ceruti S, Darsalia V, Patrone C. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulfonylureas prevent the progressive impairment of the nigrostriatal dopaminergic system induced by diabetes during aging. *Neurobiology of Aging*. 2020;89:12-23.
208. Dunlop BW, Nemeroff CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of General Psychiatry*. 2007;64(3):327-37.
209. Anderberg RH, Anefors C, Bergquist F, Nissbrandt H, Skibicka KP. Dopamine signaling in the amygdala, increased by food ingestion and GLP-1, regulates feeding behavior. *Physiology and Behavior*. 2014;136:135-44.

210. Rebosio C, Balbi M, Passalacqua M, Ricciarelli R, Fedele E. Presynaptic GLP-1 receptors enhance the depolarization-evoked release of glutamate and GABA in the mouse cortex and hippocampus. *Biofactors*. 2018;44(2):148-57.
211. Dixit TS, Sharma AN, Lucot JB, Elased KM. Antipsychotic-like effect of GLP-1 agonist liraglutide but not DPP-IV inhibitor sitagliptin in mouse model for psychosis. *Physiology and Behavior*. 2013;114-115:38-41.
212. Cuomo A, Bolognesi S, Goracci A, Ciuoli C, Beccarini Crescenzi B, Maina G, Rosso G, Facchi E, Maccora C, Giordano N. Feasibility, adherence and efficacy of liraglutide treatment in a sample of individuals with mood disorders and obesity. *Frontiers in Psychiatry*. 2019;9:784.
213. Katsurada K, Maejima Y, Nakata M, Kodaira M, Suyama S, Iwasaki Y, Kario K, Yada T. Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: projection from nucleus tractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;451(2):276-81.
214. Li C, Navarrete J, Liang-Guallpa J, Lu C, Funderburk SC, Chang RB, Liberles SD, Olson DP, Krashes MJ. Defined paraventricular hypothalamic populations exhibit differential responses to food contingent on caloric state. *Cell Metabolism*. 2019;29(3):681-94 e5.
215. Farkas E, Szilvásy-Szabó A, Ruska Y, Sinkó R, Rasch MG, Egebjerg T, Pyke C, Gereben B, Knudsen LB, Fekete C. Distribution and ultrastructural localization of the glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) in the rat brain. *Brain Structure and Function*. 2021;226(1):225-45.
216. Alvarez E, Martínez MD, Roncero I, Chowen JA, García-Cuartero B, Gispert JD, Sanz C, Vázquez P, Maldonado A, de Cáceres J, Desco M, Pozo MA, Blázquez E. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *Journal of Neurochemistry*. 2005;92(4):798-806.
217. Ten Kulve JS, van Bloemendaal L, Balesar R, RG IJ, Swaab DF, Diamant M, la Fleur SE, Alkemade A. Decreased hypothalamic glucagon-like peptide-1 receptor expression in type 2 diabetes patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016;101(5):2122-9.

218. Andermann ML, Lowell BB. Toward a wiring diagram understanding of appetite control. *Neuron*. 2017;95(4):757-78.
219. Carrasco M, Portillo F, Larsen PJ, Vallo JJ. Insulin and glucose administration stimulates Fos expression in neurones of the paraventricular nucleus that project to autonomic preganglionic structures. *Journal of Neuroendocrinology*. 2001;13(4):339-46.
220. Liu J, Conde K, Zhang P, Lilascharoen V, Xu Z, Lim BK, Seeley RJ, Zhu JJ, Scott MM, Pang ZP. Enhanced AMPA receptor trafficking mediates the anorexigenic effect of endogenous glucagon-like peptide-1 in the paraventricular hypothalamus. *Neuron*. 2017;96(4):897-909 e5.
221. Mann JJ, Waternaux C, Haas GL, Malone KM. Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients. *American Journal of Psychiatry*. 1999;156(2):181-9.
222. Van Heeringen K. Stress-diathesis model of suicidal behavior. *The Neurobiological Basis of Suicide*. 51: Frontiers in Neuroscience; 2012. p. 113.
223. Berardelli I, Serafini G, Cortese N, Fiaschè F, O'Connor RC, Pompili M. The involvement of hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in suicide risk. *Brain Sciences*. 2020;10(9).
224. van Heeringen K, Mann JJ. The neurobiology of suicide. *Lancet Psychiatry*. 2014;1(1):63-72.
225. Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry*. 2001;58(6):545-53.
226. Khundakar A, Morris C, Oakley A, McMeekin W, Thomas AJ. Morphometric analysis of neuronal and glial cell pathology in the dorsolateral prefrontal cortex in late-life depression. *British Journal of Psychiatry*. 2009;195(2):163-9.
227. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological Psychiatry*. 1999;45(9):1085-98.
228. Rajkowska G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biological Psychiatry*. 2000;48(8):766-77.

229. O'Leary LA, Belliveau C, Davoli MA, Ma JC, Tanti A, Turecki G, Mechawar N. Widespread decrease of cerebral vimentin-immunoreactive astrocytes in depressed suicides. *Frontiers in Psychiatry*. 2021;12:640963.
230. Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Galfalvy H, Mann JJ, Arango V. Neuron density and serotonin receptor binding in prefrontal cortex in suicide. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2012;15(4):435-47.
231. Underwood MD, Khaibulina AA, Ellis SP, Moran A, Rice PM, Mann JJ, Arango V. Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biological Psychiatry*. 1999;46(4):473-83.
232. Boldrini M, Santiago AN, Hen R, Dwork AJ, Rosoklija GB, Tamir H, Arango V, John Mann J. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(6):1068-77.
233. Arango V, Underwood MD, Mann JJ. Fewer pigmented locus coeruleus neurons in suicide victims: preliminary results. *Biological Psychiatry*. 1996;39(2):112-20.
234. Erhardt S, Lim CK, Linderholm KR, Janelidze S, Lindqvist D, Samuelsson M, Lundberg K, Postolache TT, Träskman-Bendz L, Guillemin GJ, Brundin L. Connecting inflammation with glutamate agonism in suicidality. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(5):743-52.
235. Suzuki H, Ohgidani M, Kuwano N, Chrétien F, Lorin de la Grandmaison G, Onaya M, Tominaga I, Setoyama D, Kang D, Mimura M, Kanba S, Kato TA. Suicide and microglia: Recent findings and future perspectives based on human studies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13:31.
236. Brundin L, Sellgren CM, Lim CK, Grit J, Pålsson E, Landén M, Samuelsson M, Lundgren K, Brundin P, Fuchs D, Postolache TT, Traskman-Bendz L, Guillemin GJ, Erhardt S. An enzyme in the kynurenine pathway that governs vulnerability to suicidal behavior by regulating excitotoxicity and neuroinflammation. *Translational Psychiatry*. 2016;6(8):e865.
237. Pandey GN. Biological basis of suicide and suicidal behavior. *Bipolar Disorder*. 2013;15(5):524-41.
238. Witt K, Potts J, Hubers A, Grunebaum MF, Murrough JW, Loo C, Cipriani A, Hawton K. Ketamine for suicidal ideation in adults with psychiatric disorders: A

systematic review and meta-analysis of treatment trials. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2020;54(1):29-45.

239. Jimenez-Trevino L, Gonzalez-Blanco L, Alvarez-Vazquez C, Rodriguez-Revuelta J, Saiz Martinez PA. Glutamine and new pharmacological targets to treat suicidal ideation. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 2020;46:179-96.

240. Chiesa A, Crisafulli C, Porcelli S, Han C, Patkar AA, Lee S-J, Park MH, Jun T-Y, Serretti A, Pae C-U. Influence of GRIA1, GRIA2 and GRIA4 polymorphisms on diagnosis and response to treatment in patients with major depressive disorder. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2012;262(4):305-11.

241. Kertes DA, Kalsi G, Prescott CA, Kuo PH, Patterson DG, Walsh D, Kendler KS, Riley BP. Neurotransmitter and neuromodulator genes associated with a history of depressive symptoms in individuals with alcohol dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2011;35(3):496-505.

242. Myung W, Song J, Lim S-W, Won H-H, Kim S, Lee Y, Kang HS, Lee H, Kim J-W, Carroll BJ. Genetic association study of individual symptoms in depression. *Psychiatry Research*. 2012;198(3):400-6.

243. Kim S, Choi K-H, Baykiz AF, Gershenfeld HK. Suicide candidate genes associated with bipolar disorder and schizophrenia: an exploratory gene expression profiling analysis of post-mortem prefrontal cortex. *BMC Genomics*. 2007;8(1):1-10.

244. Klempan TA, Sequeira A, Canetti L, Lalovic A, Ernst C, Turecki G. Altered expression of genes involved in ATP biosynthesis and GABAergic neurotransmission in the ventral prefrontal cortex of suicides with and without major depression. *Molecular Psychiatry*. 2009;14(2):175-89.

245. Sequeira A, Klempan T, Canetti L, Benkelfat C, Rouleau GA, Turecki G. Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. *Molecular Psychiatry*. 2007;12(7):640-55.

246. Sequeira A, Mamdani F, Ernst C, Vawter MP, Bunney WE, Lebel V, Rehal S, Klempan T, Gratton A, Benkelfat C, Rouleau GA, Mechawar N, Turecki G. Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS One*. 2009;4(8):e6585.

247. Mann JJ. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003;4(10):819-28.

248. Jokinen J, Boström AE, Dadfar A, Ciuculete DM, Chatzittofis A, Åsberg M, Schiöth HB. Epigenetic changes in the CRH gene are related to severity of suicide attempt and a general psychiatric risk score in adolescents. *eBioMedicine*. 2018;27:123-33.
249. Merali Z, Du L, Hrdina P, Palkovits M, Faludi G, Poulter MO, Anisman H. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(6):1478-85.
250. Pandey GN, Rizavi HS, Bhaumik R, Ren X. Increased protein and mRNA expression of corticotropin-releasing factor (CRF), decreased CRF receptors and CRF binding protein in specific postmortem brain areas of teenage suicide subjects. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;106:233-43.
251. Pandey GN, Rizavi HS, Ren X, Dwivedi Y, Palkovits M. Region-specific alterations in glucocorticoid receptor expression in the postmortem brain of teenage suicide victims. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(11):2628-39.
252. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. 2021;82(11):801-11.
253. Li S, Tighe SW, Nicolet CM, Grove D, Levy S, Farmerie W, Viale A, Wright C, Schweitzer PA, Gao Y. Multi-platform assessment of transcriptome profiling using RNA-seq in the ABRF next-generation sequencing study. *Nature Biotechnology*. 2014;32(9):915-25.
254. Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *Journal of Clinical Psychiatry* 2000;61 Suppl 6:4-6.
255. Clayden RC, Zaruk A, Meyre D, Thabane L, Samaan Z. The association of attempted suicide with genetic variants in the SLC6A4 and TPH genes depends on the definition of suicidal behavior: a systematic review and meta-analysis. *Translational Psychiatry*. 2012;2(10):e166.
256. Thalamuthu A, Mills NT, Berger K, Minnerup H, Grotegerd D, Dannlowski U, Meinert S, Opel N, Repple J, Gruber M, Nenadić I, Stein F, Brosch K, Meller T, Pfarr J-K, Forstner AJ, Hoffmann P, Nöthen MM, Witt S, Rietschel M, Kircher T, Adams M, McIntosh AM, Porteous DJ, Deary IJ, Hayward C, Campbell A, Grabe HJ, Teumer A, Homuth G, van der Auwera-Palitschka S, Oliver Schubert K, Baune BT. Genome-wide

interaction study with major depression identifies novel variants associated with cognitive function. *Molecular Psychiatry*. 2022;27(2):1111-9.

257. Norkeviciene A, Gocentiene R, Sestokaite A, Sabaliauskaite R, Dabkeviciene D, Jarmalaite S, Bulotiene G. A systematic review of candidate genes for major depression. *Medicina*. 2022;58(2):285.

258. Chan RF, Turecki G, Shabalín AA, Guintivano J, Zhao M, Xie LY, van Grootheest G, Kaminsky ZA, Dean B, Penninx BWJH, Aberg KA, van den Oord EJCG. Cell type-specific methylome-wide association studies implicate neurotrophin and innate immune signaling in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*. 2020;87(5):431-42.

259. Bai T, Wei Q, Zu M, Xie W, Wang J, Gong-Jun J, Yu F, Tian Y, Wang K. Functional plasticity of the dorsomedial prefrontal cortex in depression reorganized by electroconvulsive therapy: Validation in two independent samples. *Human Brain Mapping*. 2019;40(2):465-73.

260. Ghosal S, Hare B, Duman RS. Prefrontal cortex GABAergic deficits and circuit dysfunction in the pathophysiology and treatment of chronic stress and depression. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2017;14:1-8.

261. Zhang JC, Yao W, Hashimoto K. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets. *Current Neuropharmacology*. 2016;14(7):721-31.

262. Pantazatos SP, Huang YY, Rosoklija GB, Dwork AJ, Arango V, Mann JJ. Whole-transcriptome brain expression and exon-usage profiling in major depression and suicide: evidence for altered glial, endothelial and ATPase activity. *Molecular Psychiatry*. 2017;22(5):760-73.

263. Labonte B, Engmann O, Purushothaman I, Menard C, Wang J, Tan C, Scarpa JR, Moy G, Loh YE, Cahill M, Lorsch ZS, Hamilton PJ, Calipari ES, Hodes GE, Issler O, Kronman H, Pfau M, Obradovic ALJ, Dong Y, Neve RL, Russo S, Kazarskis A, Tamminga C, Mechawar N, Turecki G, Zhang B, Shen L, Nestler EJ. Sex-specific transcriptional signatures in human depression. *Nature Medicine*. 2017;23(9):1102-11.

264. Cabrera B, Monroy-Jaramillo N, Fries GR, Mendoza-Morales RC, Garcia-Dolores F, Mendoza-Larios A, Diaz-Otanez C, Walss-Bass C, Glahn DC, Ostrosky-Wegman P, Fresno C, Nicolini H. Brain gene expression pattern of subjects with

- completed suicide and comorbid substance use disorder. *Molecular Neuropsychiatry*. 2019;5(1):60-73.
265. Cabrera-Mendoza B, Fresno C, Monroy-Jaramillo N, Fries GR, Walss-Bass C, Glahn DC, Ostrosky-Wegman P, Mendoza-Morales RC, Garcia-Dolores F, Diaz-Otanez CE, Gonzalez-Saenz EE, Genis-Mendoza AD, Martinez-Magana JJ, Romero-Pimentel AL, Flores G, Vazquez-Roque RA, Nicolini H. Sex differences in brain gene expression among suicide completers. *Journal of Affective Disorders*. 2020;267:67-77.
266. Romero-Pimentel AL, Almeida D, Munoz-Montero S, Rangel C, Mendoza-Morales R, Gonzalez-Saenz EE, Nagy C, Chen G, Aouabed Z, Theroux JF, Turecki G, Martinez-Levy G, Walss-Bass C, Monroy-Jaramillo N, Fernandez-Figueroa EA, Gomez-Cotero A, Garcia-Dolores F, Morales-Marin ME, Nicolini H. Integrative DNA methylation and gene expression analysis in the prefrontal cortex of mexicans who died by suicide. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2021.
267. Rihmer Z, Rihmer A. Depression and suicide - the role of underlying bipolarity. *Psychiatria Hungarica*. 2019;34(4):359-68.
268. Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. The human central nervous system: a synopsis and atlas. *Springer Science & Business Media*. 2007.
269. Mai JK, Majtanik M, Paxinos G. Atlas of the Human Brain. 4th ed. New York, NY: *Academic Press*; 2015.
270. Palkovits M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Research*. 1973;59:449-50.
271. Palkovits M. Microdissection of individual brain nuclei and areas. In: Boulton AA, Baker GB, editors. *General Neurochemical Techniques*. Totowa, NJ: Humana Press; 1985. p. 1-17.
272. Hardwick SA, Hu W, Joglekar A, Fan L, Collier PG, Foord C, Balacco J, Lanjewar S, Sampson MM, Koopmans F, Prjibelski AD, Mikheenko A, Belchikov N, Jarroux J, Lucas AB, Palkovits M, Luo W, Milner TA, Ndhlovu LC, Smit AB, Trojanowski JQ, Lee VMY, Fedrigo O, Sloan SA, Tombácz D, Ross ME, Jarvis E, Boldogkői Z, Gan L, Tilgner HU. Single-nuclei isoform RNA sequencing unlocks barcoded exon connectivity in frozen brain tissue. *Nature Biotechnology*. 2022;40(7):1082-92.
273. Durrenberger PF, Fernando S, Kashefi SN, Ferrer I, Hauw JJ, Seilhean D, Smith C, Walker R, Al-Sarraj S, Troakes C, Palkovits M, Kasztner M, Huitinga I, Arzberger T,

- Dexter DT, Kretzschmar H, Reynolds R. Effects of antemortem and postmortem variables on human brain mRNA quality: a BrainNet Europe study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 2010;69(1):70-81.
274. Zhurov V, Stead JD, Merali Z, Palkovits M, Faludi G, Schild-Poulter C, Anisman H, Poulter MO. Molecular pathway reconstruction and analysis of disturbed gene expression in depressed individuals who died by suicide. *PLoS One*. 2012;7(10):e47581.
275. Kormos V, Kecskés A, Farkas J, Gaszner T, Csernus V, Alomari A, Hegedüs D, Renner É, Palkovits M, Zelena D, Helyes Z, Pintér E, Gaszner B. Peptidergic neurons of the Edinger-Westphal nucleus express TRPA1 ion channel that is downregulated both upon chronic variable mild stress in male mice and in humans who died by suicide. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2022;47(3):E162-e75.
276. Cock PJ, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Research*. 2010;38(6):1767-71.
277. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 2012;9(4):357-9.
278. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*. 2015;12(4):357-60.
279. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(10):e108-e.
280. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014;15(12):550.
281. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
282. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(1):27-30.
283. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, Sidiropoulos K, Cook J, Gillespie M, Haw R, Loney F, May B, Milacic M, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Weiser J, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*. 2020;48(D1):D498-D503.

284. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D607-D13.
285. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27(3):431-2.
286. Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*. 2014;8 Suppl 4:S11.
287. Contreras-López O, Moyano TC, Soto DC, Gutiérrez RA. Step-by-step construction of gene co-expression networks from high-throughput arabidopsis rna sequencing data. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1761:275-301.
288. Leng N, Dawson JA, Thomson JA, Ruotti V, Rissman AI, Smits BM, Haag JD, Gould MN, Stewart RM, Kendzierski C. EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1035-43.
289. Su G, Kuchinsky A, Morris JH, States DJ, Meng F. GLay: community structure analysis of biological networks. *Bioinformatics*. 2010;26(24):3135-7.
290. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*. 2009;25(8):1091-3.
291. Thul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: a spatial map of the human proteome. *Protein Science*. 2018;27(1):233-44.
292. Khatri P, Sirota M, Butte AJ. Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS Computational Biology*. 2012;8(2):e1002375.
293. Pinero J, Bravo A, Queralt-Rosinach N, Gutierrez-Sacristan A, Deu-Pons J, Centeno E, Garcia-Garcia J, Sanz F, Furlong LI. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D833-D9.
294. Dobolyi A. Central amylin expression and its induction in rat dams. *Journal of Neurochemistry*. 2009;111(6):1490-500.

295. Dobolyi A, Ostergaard E, Bagó AG, Dóczy T, Palkovits M, Gál A, Molnár MJ, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Exclusive neuronal expression of SUCLA2 in the human brain. *Brain Structure and Function*. 2015;220(1):135-51.
296. Likhite N, Warawdekar UM. A unique method for isolation and solubilization of proteins after extraction of RNA from tumor tissue using trizol. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2011;22(1):37-44.
297. Dóra F, Renner É, Keller D, Palkovits M, Dobolyi Á. Transcriptome profiling of the dorsomedial prefrontal cortex in suicide victims. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(13).
298. Zhang MD, Su J, Adori C, Cinquina V, Malenczyk K, Girach F, Peng C, Ernfors P, Löw P, Borgius L, Kiehn O, Watanabe M, Uhlén M, Mitsios N, Mulder J, Harkany T, Hökfelt T. Ca²⁺-binding protein NECAB2 facilitates inflammatory pain hypersensitivity. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(9):3757-68.
299. Miczán V, Kelemen K, Glavinics JR, László ZI, Barti B, Kenesei K, Kisfali M, Katona I. NECAB1 and NECAB2 are prevalent calcium-binding proteins of CB1/CCK-positive GABAergic interneurons. *Cerebral Cortex*. 2021;31(3):1786-806.
300. Ramaker RC, Bowling KM, Lasseigne BN, Hagenauer MH, Hardigan AA, Davis NS, Gertz J, Cartagena PM, Walsh DM, Vawter MP, Jones EG, Schatzberg AF, Barchas JD, Watson SJ, Bunney BG, Akil H, Bunney WE, Li JZ, Cooper SJ, Myers RM. Post-mortem molecular profiling of three psychiatric disorders. *Genome Medicine*. 2017;9(1):72.
301. Schurch NJ, Schofield P, Gierliński M, Cole C, Sherstnev A, Singh V, Wrobel N, Gharbi K, Simpson GG, Owen-Hughes T. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA*. 2016;22(6):839-51.
302. Jabbi M, Arasappan D, Eickhoff SB, Strakowski SM, Nemeroff CB, Hofmann HA. Neuro-transcriptomic signatures for mood disorder morbidity and suicide mortality. *Journal of Psychiatric Research*. 2020;127:62-74.
303. Underwood MD, Arango V. Evidence for neurodegeneration and neuroplasticity as part of the neurobiology of suicide. *Biological Psychiatry*. 2011;70(4):306-7.
304. Punzi G, Ursini G, Chen Q, Radulescu E, Tao R, Huuki LA, Di Carlo P, Collado-Torres L, Shin JH, Catanesi R, Jaffe AE, Hyde TM, Kleinman JE, Mackay TFC,

- Weinberger DR. Genetics and brain transcriptomics of completed suicide. *American Journal of Psychiatry*. 2022;179(3):226-41.
305. Han L, Wang L, Tang S, Yuan L, Wu S, Du X, Xiang Y, Qu X, Liu H, Luo H, Qin X, Liu C. ITGB4 deficiency in bronchial epithelial cells directs airway inflammation and bipolar disorder-related behavior. *Journal of Neuroinflammation*. 2018;15(1):246.
306. Hlavacova N, Wes PD, Ondrejckova M, Flynn ME, Poundstone PK, Babic S, Murck H, Jezova D. Subchronic treatment with aldosterone induces depression-like behaviours and gene expression changes relevant to major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2012;15(2):247-65.
307. Lee PH, Perlis RH, Jung JY, Byrne EM, Rueckert E, Sibirian R, Haddad S, Mayerfeld CE, Heath AC, Pergadia ML, Madden PA, Boomsma DI, Penninx BW, Sklar P, Martin NG, Wray NR, Purcell SM, Smoller JW. Multi-locus genome-wide association analysis supports the role of glutamatergic synaptic transmission in the etiology of major depressive disorder. *Translational Psychiatry*. 2012;2(11):e184.
308. Luo Y, Zeng B, Zeng L, Du X, Li B, Huo R, Liu L, Wang H, Dong M, Pan J, Zheng P, Zhou C, Wei H, Xie P. Gut microbiota regulates mouse behaviors through glucocorticoid receptor pathway genes in the hippocampus. *Translational Psychiatry*. 2018;8(1):187.
309. Petrykey K, Lippé S, Robaey P, Sultan S, Laniel J, Drouin S, Bertout L, Beaulieu P, St-Onge P, Boulet-Craig A, Rezgui A, Yasui Y, Sapkota Y, Krull KR, Hudson MM, Laverdière C, Sinnott D, Krajcinovic M. Influence of genetic factors on long-term treatment related neurocognitive complications, and on anxiety and depression in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: The Petale study. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217314.
310. Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cerebral Cortex*. 2002;12(4):386-94.
311. Öngür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(22):13290-5.

312. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological Psychiatry*. 2010;67(5):446-57.
313. Farooq RK, Asghar K, Kanwal S, Zulqernain A. Role of inflammatory cytokines in depression: focus on interleukin-1 β . *Biomedical Reports*. 2017;6(1):15-20.
314. Kitagishi Y, Kobayashi M, Kikuta K, Matsuda S. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR pathway in cell signaling of mental illnesses. *Depression Research and Treatment*. 2012;2012.
315. Zarate CA, Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, Singh J, Charney DS, Manji HK. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders - Role of the glutamatergic system. *Glutamate and Disorders of Cognition and Motivation*. 2003;1003:273-91.
316. Nagy C, Suderman M, Yang J, Szyf M, Mechawar N, Ernst C, Turecki G. Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. *Molecular Psychiatry*. 2015;20(3):320-8.
317. Li CY, Mao X, Wei L. Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Computational Biology*. 2008;4(1):e2.
318. Biernacka JM, Geske J, Jenkins GD, Colby C, Rider DN, Karpyak VM, Choi D-S, Fridley BL. Genome-wide gene-set analysis for identification of pathways associated with alcohol dependence. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2013;16(2):271-8.
319. Gray AL, Hyde TM, Deep-Soboslay A, Kleinman JE, Sodhi MS. Sex differences in glutamate receptor gene expression in major depression and suicide. *Molecular Psychiatry*. 2015;20(9):1057-68.
320. Laje G, Paddock S, Manji H, Rush AJ, Wilson AF, Charney D, McMahon FJ. Genetic markers of suicidal ideation emerging during citalopram treatment of major depression. *American Journal of Psychiatry*. 2007;164(10):1530-8.
321. Menke A, Lucae S, Kloiber S, Horstmann S, Bettecken T, Uhr M, Ripke S, Ising M, Müller-Myhsok B, Holsboer F. Genetic markers within glutamate receptors associated with antidepressant treatment-emergent suicidal ideation. *American Journal of Psychiatry*. 2008;165(7):917-8.

322. Shaltiel G, Maeng S, Malkesman O, Pearson B, Schloesser R, Tragon T, Rogawski M, Gasior M, Luckenbaugh D, Chen G. Evidence for the involvement of the kainate receptor subunit GluR6 (GRIK2) in mediating behavioral displays related to behavioral symptoms of mania. *Molecular Psychiatry*. 2008;13(9):858-72.
323. Jacobs JM, Traeger L, Eusebio J, Simon NM, Sequist LV, Greer JA, Temel JS, Pirl WF. Depression, inflammation, and epidermal growth factor receptor (EGFR) status in metastatic non-small cell lung cancer: A pilot study. *Journal of Psychosomatic Research*. 2017;99:28-33.
324. Löfberg C, Ågren H, Harro J, Orelund L. Cholecystokinin in CSF from depressed patients: possible relations to severity of depression and suicidal behaviour. *European Neuropsychopharmacology*. 1998;8(2):153-7.
325. Jahangard L, Solgy R, Salehi I, Taheri SK, Holsboer-Trachsler E, Haghghi M, Brand S. Cholecystokinin (CCK) level is higher among first time suicide attempters than healthy controls, but is not associated with higher depression scores. *Psychiatry Research*. 2018;266:40-6.
326. Harro J, Marcusson J, Orelund L. Alterations in brain cholecystokinin receptors in suicide victims. *European Neuropsychopharmacology*. 1992;2(1):57-63.
327. Yin H, Pantazatos SP, Galfalvy H, Huang YY, Rosoklija GB, Dwork AJ, Burke A, Arango V, Oquendo MA, Mann JJ. A pilot integrative genomics study of GABA and glutamate neurotransmitter systems in suicide, suicidal behavior, and major depressive disorder. *American Journal of Medical Genetics, Part B, Neuropsychiatric Genetics*. 2016;171b(3):414-26.
328. De la Cruz-Cano E. Association between FKBP5 and CRHR1 genes with suicidal behavior: A systematic review. *Behavioural Brain Research*. 2017;317:46-61.
329. Karolewicz B, Stockmeier CA, Ordway GA. Elevated levels of the NR2C subunit of the NMDA receptor in the locus coeruleus in depression. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(8):1557-67.
330. Gibbons AS, Brooks L, Scarr E, Dean B. AMPA receptor expression is increased post-mortem samples of the anterior cingulate from subjects with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*. 2012;136(3):1232-7.

331. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2010;50:295-322.
332. Cleva RM, Olive MF. Positive allosteric modulators of type 5 metabotropic glutamate receptors (mGluR5) and their therapeutic potential for the treatment of CNS disorders. *Molecules*. 2011;16(3):2097-106.
333. Ha CM, Park D, Han JK, Jang JI, Park JY, Hwang EM, Seok H, Chang S. Calcyon forms a novel ternary complex with dopamine D1 receptor through PSD-95 protein and plays a role in dopamine receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(38):31813-22.
334. Maher MP, Wu N, Ravula S, Ameriks MK, Savall BM, Liu C, Lord B, Wyatt RM, Matta JA, Dugovic C, Yun S, Ver Donck L, Steckler T, Wickenden AD, Carruthers NI, Lovenberg TW. Discovery and characterization of AMPA receptor modulators selective for TARP- γ 8. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;357(2):394-414.
335. Cannon DM, Klaver JM, Peck SA, Rallis-Voak D, Erickson K, Drevets WC. Dopamine type-1 receptor binding in major depressive disorder assessed using positron emission tomography and [11 C]NNC-112. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(5):1277-87.
336. Kang HJ, Voleti B, Hajszan T, Rajkowska G, Stockmeier CA, Licznarski P, Lepack A, Majik MS, Jeong LS, Banasr M, Son H, Duman RS. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nature Medicine*. 2012;18(9):1413-7.
337. Kioka N, Ueda K, Amachi T. Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Structure and Function*. 2002;27(1):1-7.
338. Park SJ, Frake RA, Karabiyik C, Son SM, Siddiqi FH, Bento CF, Sterk P, Vicinanza M, Pavel M, Rubinsztein DC. Vinexin contributes to autophagic decline in brain ageing across species. *Cell Death and Differentiation*. 2021.
339. Howard DM, Adams MJ, Clarke TK, Hafferty JD, Gibson J, Shirali M, Coleman JRI, Hagenars SP, Ward J, Wigmore EM, Alloza C, Shen X, Barbu MC, Xu EY, Whalley HC, Marioni RE, Porteous DJ, Davies G, Deary IJ, Hemani G, Berger K, Teismann H,

- Rawal R, Arolt V, Baune BT, Dannlowski U, Domschke K, Tian C, Hinds DA, and Me Research T, Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics C, Trzaskowski M, Byrne EM, Ripke S, Smith DJ, Sullivan PF, Wray NR, Breen G, Lewis CM, McIntosh AM. Genome-wide meta-analysis of depression identifies 102 independent variants and highlights the importance of the prefrontal brain regions. *Nature Neuroscience*. 2019;22(3):343-52.
340. Xiao J, Dai R, Negyessy L, Bergson C. Calcyon, a novel partner of clathrin light chain, stimulates clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(22):15182-93.
341. Chander P, Kennedy MJ, Winckler B, Weick JP. Neuron-specific gene 2 (NSG2) encodes an AMPA receptor interacting protein that modulates excitatory neurotransmission. *Eneuro*. 2019;6(1).
342. Davidson HT, Xiao JP, Dai RJ, Bergson C. Calcyon is necessary for activity-dependent AMPA receptor internalization and LTD in CA1 neurons of hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2009;29(1):42-54.
343. Sakakibara S, Nakamura Y, Satoh H, Okano H. Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *Journal of Neuroscience*. 2001;21(20):8091-107.
344. Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, Nakafuku M, Okano H. The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21(12):3888-900.
345. Adams ME, Kramarcy N, Krall SP, Rossi SG, Rotundo RL, Sealock R, Froehner SC. Absence of α -syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *The Journal of Cell Biology*. 2000;150(6):1385-98.
346. Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini MG, Thomas GM, Buée-Scherrer V, Cohen P, Goedert M. Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of α 1-syntrophin: a mechanism for specific substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(18):12626-31.
347. Bell S, Rousseau J, Peng H, Aouabed Z, Priam P, Theroux JF, Jefri M, Tanti A, Wu H, Kolobova I, Silveira H, Manzano-Vargas K, Ehresmann S, Hamdan FF, Hettige N, Zhang X, Antonyan L, Nassif C, Ghaloul-Gonzalez L, Sebastian J, Vockley J, Begtrup

- AG, Wentzensen IM, Crunk A, Nicholls RD, Herman KC, Deignan JL, Al-Hertani W, Efthymiou S, Salpietro V, Miyake N, Makita Y, Matsumoto N, Østern R, Houge G, Hafström M, Fassi E, Houlden H, Klein Wassink-Ruiter JS, Nelson D, Goldstein A, Dabir T, van Gils J, Bourgeron T, Delorme R, Cooper GM, Martinez JE, Finnila CR, Carmant L, Lortie A, Oegema R, van Gassen K, Mehta SG, Huhle D, Abou Jamra R, Martin S, Brunner HG, Lindhout D, Au M, Graham JM, Jr., Coubes C, Turecki G, Gravel S, Mechawar N, Rossignol E, Michaud JL, Lessard J, Ernst C, Campeau PM. Mutations in *ACTL6B* cause neurodevelopmental deficits and epilepsy and lead to loss of dendrites in human neurons. *American Journal of Human Genetics*. 2019;104(5):815-34.
348. de la Torre-Ubieta L, Bonni A. Combinatorial assembly of neurons: from chromatin to dendrites. *Trends in Cell Biology*. 2008;18(2):48-51.
349. Morley JE. The ascent of cholecystokinin (CCK)—from gut to brain. *Life Sciences*. 1982;30(6):479-93.
350. Reisi P, Ghaedamini AR, Golbidi M, Shabrang M, Arabpoor Z, Rashidi B. Effect of cholecystokinin on learning and memory, neuronal proliferation and apoptosis in the rat hippocampus. *Advanced Biomedical Research*. 2015;4:227.
351. Miraglia del Giudice E, Santoro N, Fiumani P, Dominguez G, Kuhar MJ, Perrone L. Adolescents carrying a missense mutation in the *CART* gene exhibit increased anxiety and depression. *Depression and Anxiety*. 2006;23(2):90-2.
352. Ahmadian-Moghadam H, Sadat-Shirazi M-S, Zarrindast M-R. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript (*CART*): a multifaceted neuropeptide. *Peptides*. 2018;110:56-77.
353. Wiehager S, Beiderbeck DI, Gruber SH, El-Khoury A, Wamsteeker J, Neumann ID, Petersén Å, Mathé AA. Increased levels of cocaine and amphetamine regulated transcript in two animal models of depression and anxiety. *Neurobiology of Disease*. 2009;34(2):375-80.
354. Han SJ, Kim HJ, Choi YJ, Lee KW, Kim DJ. Increased risk of suicidal ideation in Korean adults with both diabetes and depression. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2013;101(3):e14-e7.
355. Wang B, An X, Shi X, Zhang JA. Suicide risk in patients with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Endocrinology*. 2017;177(4):R169-r81.

356. Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2001;24(6):1069-78.
357. Conti C, Mennitto C, Di Francesco G, Fraticelli F, Vitacolonna E, Fulcheri M. Clinical characteristics of diabetes mellitus and suicide risk. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;8:40.
358. Löfman S, Hakko H, Mainio A, Timonen M, Räsänen P. Characteristics of suicide among diabetes patients: A population based study of suicide victims in Northern Finland. *Journal of Psychosomatic Research*. 2012;73(4):268-71.
359. Iwasaki Y, Bartlett J, O'neil J. An examination of stress among Aboriginal women and men with diabetes in Manitoba, Canada. *Ethnicity & Health*. 2004;9(2):189-212.
360. Cheng TYL, Boey KW. Coping, social support, and depressive symptoms of older adults with Type II diabetes mellitus. *Clinical Gerontologist*. 2000;22(1):15-30.
361. Avcı D, Cetinkaya A, Karahan S, Oğuzhan N, Karagöz H, Başak M, Erden A. Suicide commitment with metformin: our experience with five cases. *Renal Failure*. 2013;35(6):863-5.
362. Canela L, Fernández-Dueñas V, Albergaria C, Watanabe M, Lluís C, Mallol J, Canela EI, Franco R, Luján R, Ciruela F. The association of metabotropic glutamate receptor type 5 with the neuronal Ca²⁺-binding protein 2 modulates receptor function. *Journal of Neurochemistry*. 2009;111(2):555-67.
363. Chen Z, Long H, Guo J, Wang Y, He K, Tao C, Li X, Jiang K, Guo S, Pi Y. Autism-risk gene *necab2* regulates psychomotor and social behavior as a neuronal modulator of mGluR1 signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022;15:901682.
364. Zhao J, Verwer RWH, Gao SF, Qi XR, Lucassen PJ, Kessels HW, Swaab DF. Prefrontal alterations in GABAergic and glutamatergic gene expression in relation to depression and suicide. *Journal of Psychiatric Research*. 2018;102:261-74.
365. Mazuir E, Fricker D, Sol-Foulon N. Neuron-oligodendrocyte communication in myelination of cortical GABAergic cells. *Life-Basel*. 2021;11(3).
366. Zhu Q, Ke W, He Q, Wang X, Zheng R, Li T, Luan G, Long YS, Liao WP, Shu Y. Laminar distribution of neurochemically-identified interneurons and cellular co-expression of molecular markers in epileptic human cortex. *Neuroscience Bulletin*. 2018;34(6):992-1006.

367. Kim YK, Kim OY, Song J. Alleviation of depression by glucagon-like peptide 1 through the regulation of neuroinflammation, neurotransmitters, neurogenesis, and synaptic function. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:1270.
368. Gribble FM, Reimann F. Metabolic messengers: glucagon-like peptide 1. *Nature Metabolism*. 2021;3(2):142-8.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A doktori disszertáció alapját képező publikációk:

1. **Dóra F**, Renner É, Keller D, Palkovits M, Dobolyi Á. (2022) Transcriptome profiling of the dorsomedial prefrontal cortex in suicide victims. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7067. (IF: 6,208)
2. *Renner É, ***Dóra F**, Oszwald E, Dobolyi Á, Palkovits M. (2022) Elevated glucagon-like peptide-1 receptor level in the paraventricular hypothalamic nucleus of type 2 diabetes mellitus patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15945. (IF: 6,208). *: egyenlő hozzájárulás

Egyéb publikációk:

1. Csikós V, Oláh S, **Dóra F**, Arrasz N, Cservenák M, Dobolyi Á. (2023) Microglia depletion prevents lactation by inhibition of prolactin secretion. *iScience*, 24;26(3):106264. (IF: 6,107)
2. Keller D, Láng T, Cservenák M, Puska G, Barna J, Csillag V, Farkas I, Zelena D, **Dóra F**, Küppers S, Barteczko L, Usdin TB, Palkovits M, Hasan MT, Grinevich V, Dobolyi Á. (2022) A thalamo-preoptic pathway promotes social grooming in rodents. *Current Biology*, 32(21), 4593–4606.e8. (IF: 10,900)
3. Kumari R, Fazekas EA, Morvai B, Udvari EB, **Dóra F**, Zachar G, Székely T, Pogány Á, Dobolyi Á. (2022) Transcriptomics of parental care in the hypothalamic-septal region of female zebra finch brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2518. (IF: 6,208)
4. Lékó AH, Kumari R, **Dóra F**, Keller D, Udvari EB, Csikós V, Renner É, Dobolyi Á. (2021) Transcriptome sequencing in the preoptic region of rat dams reveals a role of androgen receptor in the control of maternal behavior. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1517. (IF: 6,208)
5. Fazekas EA, Morvai B, Zachar G, **Dóra F**, Székely T, Pogány Á, Dobolyi Á. (2020) Neuronal activation in zebra finch parents associated with reintroduction of nestlings. *Journal of Comparative Neurology*, 528(3), 363–379. (IF: 3,215)

6. Zachar G, Montagnese C, Fazekas EA, Kemecei RG, Papp SM, **Dóra F**, Renner É, Csillag A, Pogány Á, Dobolyi Á. (2020) Brain distribution and sexually dimorphic expression of amylin in different reproductive stages of the zebra finch (*taeniopygia guttata*) suggest roles of the neuropeptide in song learning and social behaviour. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1401. (IF: 4,677)
7. Luz LL, Fernandes EC, **Dora F**, Lukoyanov NV, Szucs P, Safronov BV. (2019) Trigeminal A δ - and C-afferent supply of lamina I neurons in the trigeminocervical complex. *Pain*, 160(11), 2612–2623. (IF: 5,483)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Palkovits Miklós és Dr. Dobolyi Árpád professzor uraknak, akik biztosították a doktori munkámhoz szükséges feltételeket, illetve fáradhatatlan támogatásukkal, ötleteikkel és kiváló szakmai iránymutatásukkal segítettek és ösztönözték tudományos fejlődésemet. Külön szeretném megköszönni, hogy lehetőséget adtak arra, hogy részese lehessek egy egyedülálló és színvonalas tudományos munkaközösségnek.

Köszönettel tartozom Dr. Dobolyiné dr. Renner Éva és Toronyay-Kasztner Magdolna kolleganőimnek, akik hozzájárulása nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre. Külön köszönettel tartozom nekik, amiért kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk, segítségükre és véleményükre mindig számíthattam.

Szeretnék köszönetet mondani munkacsoportunk valamennyi volt és jelenlegi tagjának, mindenekelőtt Dellaszéga-Lábas Viktóriának, Deák Szilviának, Horváthné Oszwald Erzsébetnek és Hanák Nikolettnek, akik kiváló technikai hozzájárulásukkal segítettek munkámat. Köszönettel tartozom Dr. Keller Dávidnak lelkesítő támogatásáért és munkámban nyújtott segítségéért.

Hálával tartozom az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet valamennyi munkatársának, akik pozitív hozzáállásukkal támogatták és motiválták a mindennapjaimat.

Köszönetemet szeretném kifejezni az Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani intézet vezetőjének, Dr. Alpár Alán professzor úrnak, a Neuromorfológia és sejtbiológia program vezetőjének, hogy lehetővé tette és támogatta kutatómunkámat az Intézetben. Köszönettel tartozom továbbá Dr. Pálfi Emesének, aki dolgozatom előbírálójaként értékes kritikájával és kérdéseivel segítette munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, akik a doktori munkám kezdetétől fogva támogattak, és amikor a legnagyobb szükségem volt rá, mindig mellettem álltak.