

A dorsomediális prefrontális kéreg transzkriptom szintű vizsgálata öngyilkos személyekben

Doktori értekezés

Dóra Fanni

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai 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, PhD, 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, PhD, tudományos főmunkatárs

Budapest
2023

1. Bevezetés

Az elmúlt két évtized meghatározó jelentőségű volt az emberi agy ideghálózatainak topográfiai megismerésében. Ebben kiemelkedő szerepet játszott a funkcionális mágneses rezonancia (fMRI) és a traktográfiai technikák fejlődése, mely vizsgálatok először nyújtottak nagy felbontású képet az élő emberi agyról. Ezáltal számos korábban ismert agypálya nyert finomabb topográfiai bizonyítást, ugyanakkor új dimenziók is nyíltak az agykutatásban. A nyugalmi állapotú funkcionális konnektivitást vizsgáló tanulmányok, az alkalmazott vizsgálati módszerektől függően, számos olyan idegi hálózatot mutattak be, amelyek szoros kapcsolatban állnak a nyugalmi állapottal. Ide sorolhatók a *default mode*, *salience* és *central executive control* agykérgi ideghálózatok. A default mode hálózat (DMN) topográfiaileg egy felső és egy alsó részre osztható. A felső rész a mediális prefrontális kéregtől, ezen belül is főleg a dorsomediális prefrontális kéregtől kezdődik és az anterior cinguláris kérgen (ACC) át a parietális kéreg felső mediális részében (hátulsó cinguláris kéreg és precuneus) végződik. Innen indul a DMN alsó része, amely a parietális kéreg alsó részén át (inferior lobulus) a temporális kéreg mediális részén a parahippokampális kéreg közvetítésével a hátulsó cinguláris kéregben (PCC) végződik. A precuneus az emberi agykéreg speciális struktúrája, mely az egyén szerepét határozza meg olyan agykérgi tevékenységekben, mint az események egyéni értékelése, önvizsgálat, egyéni gondolatok, elképzelések, kreativitás. Mindezek alapján a precuneust az intelligencia központjának is tartják. Az ezen kognitív folyamatokhoz szükséges információk zöme a DMN-on keresztül érkezik a cinguláris kérgen át a precuneusba.

Eddigi kísérleti és klinikai megfigyelések egyaránt arra utalnak, hogy a DMN funkcionális zavara és a depresszió, illetve öngyilkos viselkedés között szoros kapcsolat figyelhető meg, azonban jelenleg kevés adat számol be arról, hogy DMN kitüntetett területein mely fehérréjk és ezek által jelzett anyagcsere útvonalak azok, amelyek expressziójának változása depresszió és öngyilkosság vonatkozásban zavart szenvednek, továbbá melyek vannak jelen mind a kontroll, mind a beteg szövetekben. A precuneus aktivitásában jelentős szerepet visz az egyén elvárásai önmagával szemben. Ha az elvárások nem teljesülnek, elmarad a sikerélmény (reward), melyek

többszörös ismétlődése depresszióhoz vezethet. A DMN egyik központi régiója a *dorsomediális prefrontális kéreg* (DMPFC). Ide érkeznek mind a külvilági, mind a belszervi viszceroszenzoros információk a dorsolaterális prefrontális kérgen (DLPFC), a ventromediális prefrontális kérgen (kortikális kognitív „központ”) és az orbitofrontális kérgen (kortikális emocionális és motivációs „központ”) át. A DMPFC-ben történik ezen információkra történő motoros válasz programja, mely a premotoros és szupplemeneter motoros áréakon keresztül a motoros rendszert aktiválja. Egyidőben ezzel a DMPFC a DMN-on át informálja a precuneust és a PCC-t, amelyek a central executive control network részeként módosíthatják - akár le is állíthatják - a motoros választ. E folyamatok kóros működése hozzájárul a depresszió és öngyilkos viselkedés kialakulásához. Egy korábbi nyugalmi aktivitást vizsgáló tanulmány beszámolója szerint a DMPFC és precuneus közötti fokozott funkcionális konnektivitás pozitívan korrelált a depresszió súlyosságával. Mások azt is megfigyelték, hogy az öngyilkosságot megkísérelt depressziósokban a precuneus és DMPFC régiók abnormális funkcionális konnektivitása összefüggésbe hozható a vizsgált egyének közelmúltban elkövetett öngyilkossági kísérleteikkel. Ezen eredmények alapján tehát feltételezhető, hogy affektív zavarok esetében az öngyilkosság elkövetése, mint következmény, a DMN, azon belül is két régió, a DMPFC és a precuneus megváltozott integritásból adódik. Jelenleg a depressziót és öngyilkos viselkedést érintő agyi hálózatok molekuláris szintű vizsgálataiból származó információk az irodalomban igen kis mértékben állnak rendelkezésre, ezért célunk, hogy munkánk eredményeképpen teljesebb kép alakulhasson ki az emberi agy ideghálózatának öngyilkosságban betöltött szerepéről és funkciójáról.

A biológiai problémák megértésének széleskörben alkalmazott és folyamatosan újuló megközelítései a nagy áteresztőképességű vagy *high-throughput* technológiák, amelyek egyszerre több száz mintát, azok akár több ezer összetevőjét elemzik egyetlen mérés során. Ezek a technológiák felhasználhatók a neurokémiai és idegtudományi kutatásokban is. 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 sejtípus- és

régióspecifikus neuroanatómiai vizsgálatokat, valamint a neurológiai és pszichiátriai betegségekben szerepet játszó molekuláris útvonalak azonosítását. A közelmúltban több high-throughput módszert alkalmaztak az öngyilkos áldozatokban megváltozott gének szélesebb körű megismerése céljából. Microarray vizsgálatok számos megváltozott gént azonosítottak, amelyek szabályozzák pl. a *glia aktivitást*, valamint az *endotheliális és mitokondriális funkciókat*, némelyikük szexuális dimorfizmust és szerhasználati zavarral való komorbiditást is mutattak. A közelmúltban szekvenálási megközelítésekkel további új potenciális géneket és útvonalakat azonosítottak depressziós állatmodellekben, valamint depresszióval és öngyilkossággal kapcsolatos humán vizsgálatok során. Bár ezek a génexpressziós vizsgálatok értékes adatokat szolgáltatnak az öngyilkos viselkedés neuronális mechanizmusairól, legtöbbjük a DLPFC-t vizsgálta. A DLPFC és a DMPFC elhelyezkedésükben ugyan hasonló (ugyanazon gyrus részei egymás mellett), funkciójukban azonban 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.

Tekintettel a DMPFC fentebb leírt szerepére, feltételeztük, hogy az öngyilkos viselkedéssel összefüggő génexpressziós változások a DMPFC-ben is végbe mennek. Mivel e területnek speciálisan a depressziót és öngyilkosságot érintő expressziós változásairól még nem áll rendelkezésünkre adat, célul tűztük ki öngyilkos személyek DMPFC mintáinak transzkriptom szintű vizsgálatát RNS szekvenálás módszerrel. Kísérleteink során öngyilkos személyek agyából vett viszonylag rövid posztmortem idejű DMPFC mintákat elemeztünk. 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. 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. Ezért az

öngyilkos minták vizsgálata hasznos betekintést nyújthat az öngyilkos viselkedés háttérében húzódó folyamatokba.

Irodalmi adatok beszámoltak a glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) jelátvitel érintettségéről depresszióban. Mivel eddig még kevés adat származik a humán agyi GLP-1 rendszer vizsgálataiból, célul tűztük ki a 2-es típusú cukorbetegség (T2DM) gyógyszeres kezelésének egyik célpontjának, a GLP-1 receptor (GLP-1R) expressziójának vizsgálatát T2DM betegségben érintett személyek hipotalamikus paraventriculáris magjában (PVN).

2. Célkitűzés

1. A dolgozat elsődleges célja az öngyilkosok DMPFC-ben bekövetkező génexpressziós változásainak a vizsgálata volt. E cél megvalósítása érdekében az alábbi feladatokat tűztük ki:
 - a) az öngyilkosság függvényében bekövetkező transzkriptomikai változásokat teljes transzkriptóm 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 és igazoltan depresszióban érintett gének validálása RT-qPCR technikával,
 - e) a funkcionálisan kiemelkedő gének agykérgi eloszlásának jellemzése hisztológiai technikák alkalmazásával.
2. Vizsgálataink második fő célkitűzése a GLP-1R expressziójának vizsgálata volt T2DM személyek hipotalamuszának paraventrikuláris magjában (PVN). Ennek megvalósítására RT-qPCR és Western blot technikákat alkalmazunk.

3. Módszerek

Humán minták

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. Minden agyminta tekintetében a boncolás majd az agyak lefagyasztása a halált követően 10 órán belül történt. A DMPFC szöveti mintákat összesen 16 alanyból gyűjtöttük. A kontroll csoportot 8 pszichiátriai és neurológiai szempontból negatív személyekből származott (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 $53,6 \pm 4,8$). A hipotalamusz paraentrikuláris magját tartalmazó szöveti minták összesen 18 alanyból származtak, melyeket 9 cukorbetegségben nem szenvedő kontroll alanyból (4 nő és 5 férfi, átlagéletkor $71,1 \pm 3,8$ év), illetve 9 T2DM betegből (4 nő és 5 férfi, átlagéletkor $77,4 \pm 2,6$ év) gyűjtöttük.

RNS szekvenálás és adatfeldolgozás

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, az RNS szekvenálást és a leolvasott értékek referencia szekvenciára történő leképezését a Pekingi Genomikai Intézet (BGI, Hongkong, Shenzhen, Kína) végezte. A differenciálisan expresszázó gének (DEG-ek) azonosításához a lefedettség értékeket használtuk. Az elemzést az RStudio programban végeztük, amelyben a DEG-ek meghatározásához a DESeq2 csomagot (1.34.0) alkalmaztuk. A génexpresszióból adódó különbségek megbízhatósága érdekében szigorúbb szűrési paramétereket állítottunk be, amely során a DEG-eket a Benjamini és Hochberg-korrigált p-érték ($p_{adj} < 0,05$) 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 érték felett szignifikánsan fel- vagy le-regulált géneket határoztunk meg.

Az RNS szekvenálási adatok bioinformatikai értékelése

Az RNS szekvenálási adatok elemzését követően a változó gének és biológiai útvonalainak azonosítása érdekében különböző bioinformatikai módszereket használtuk fel, melyek általános célja olyan változó géncsoportok azonosítása az öngyilkosokban, melyek funkciójukban hasonlóak, illetve azonos celluláris útvonalhoz tartoznak. Gén ontológia (GO) analízissel megvizsgáltuk a több mint kétszeres változást mutató DEG-eket azok molekuláris funkcióban, sejtes lokalizációban és biológiai folyamatban való részvételük szerint. A funkcionális dúsulást külön-külön vizsgáltuk a le- és fel-regulált DEG-ek esetében. A le- és fel-regulált gének biológiai útvonalelemzéséhez a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) és a Reactome adatbázisokat használtuk. A 10 legszignifikánsabb le- és fel-regulált gén funkcionális génannotációját a Database for Annotation, Visualization and Integration Discovery (DAVID) online programcsomag segítségével végeztük. 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 alkalmaztuk. A DEG-ek ko-expressziós hálózatának elemzése során kitűzött célunk volt olyan gének azonosítása, amelyeket ugyanaz a transzkripció szabályozó program irányít, vagy amelyek funkcionálisan rokonok vagy géntermékek egy közös biológiai folyamatban vesznek részt.

A változó gének expressziójának validálása és a GLP-1R mRNS expressziójának vizsgálata valós idejű kvantitatív PCR technikával

Az RNS szekvenálási adatok megerősítésére 14 depresszióban érintett és/vagy neuron-specifikus funkciót ellátó változó gének expresszióját RT-qPCR módszerrel validáltuk. Annak megállapítására, hogy a T2DM betegségben szenvedő személyek GLP-1R mRNS expressziójában változások következnek-e be a hipotalamusz egy meghatározott részében, a PVN-ben, kvantitatív expressziós vizsgálatokat végeztünk RT-qPCR technikával. Referencia génként az aktin béta (ACTB), glicer aldehid-3-

foszfat-dehidrogenáz (GAPDH) és laktát dehidrogenáz A (LDHA) géneket használtuk, és ezek átlagából számítottuk ki a relatív génexpressziós értékeket $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel.

A NECAB2 agykérgi eloszlásának vizsgálata hisztológiai módszerekkel

A neuronális kalcium-kötő fehérje 2 (NECAB2) DMPFC-ben való eloszlásának felmérésére *in situ* hibridizációs (ISH) és immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk. Az ISH vizsgálatokhoz két alany fagyasztott DMPFC agyblokkját használtuk fel: egyet egy 75 éves kontroll női alanytól, akinek jelentősebb betegsége utaló klinikai jelentései nem voltak, illetve egyet egy 72 éves öngyilkos női alanytól. Kriosztát használatával 12 μm vastag koronális sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket pozitív töltésű tárgylemezre rögzítettünk. Az immunjelöléshez egy 62 éves kontroll női egyén DMPFC agyblokkját használtuk fel, amelyet fixálást követően fagyasztott állapotában 60 μm vastag koronális metszetekre vágtuk. A NECAB2 immunjelölést diamino-benzidín (DAB) és immunfluoreszcens technikákkal végeztük. A NECAB2 asztrocitában, illetve mikroglia sejtekben történő expresszióját kombinált immunjelöléssel vizsgáltuk meg anti-S100 és anti-Iba1 antitestek segítségével.

GLP-1R fehérje expressziójának vizsgálata

A T2DM betegek PVN mintáiban bekövetkező GLP-1R fehérje expressziós változások vizsgálatára Western blot analízist végeztünk. A vizsgálatához a PVN mintákból vett 20 μg totál fehérjét használtunk.

Statisztikai analízis

A statisztikai számításokat a GraphPad Prism 8.0.1 szoftvert használva végeztük. A demográfiai adatokat a Khi-négyzet teszt vagy Welch t-teszt segítségével hasonlítottuk össze. Az RT-qPCR és Western blot eredmények kvantitatív kiértékelése során a csoportok normális eloszlását Shapiro-Wilk teszttel, a két csoport értékeinek összehasonlítását pedig Welch t-teszttel vizsgáltuk. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak vettük, ha a p-érték 0,05-nél kisebb volt. Az adatokat az átlag \pm SEM formájában adtuk meg.

4. Eredmények

Az öngyilkos és kontroll csoportok közötti DEG-ek azonosítása

A kontroll és öngyilkos minták hierarchikus klaszteranalízisét az összes differenciáltan expresszáldó gén felhasználásával kétféle módszerrel, az Euklideszi távolságot és a Pearson korrelációt használva végeztük. Vizsgálataink alapján az öngyilkos minták jól elkülönültek 5 kontrolltól, de további 3 kontrolltól kisebb mértékű volt az elkülönülés. Miután megkaptuk az egyes génekhez tartozó adatokat, az öngyilkos áldozatok génexpressziójának elemzésére a DESeq2 módszert használtunk. Ez a módszer statisztikai próbák segítségével képes kiszűrni a valódi változásokat egy adott rendszeren belül. A DMPFC-ben 19 692 fehérjét kódoló gén expresszióját detektáltuk, amelyek közül 1400 eltérően expresszáldott a kontroll és öngyilkos csoportok között. A DEG-ek közül 1262 gén lefelé, 138 gén pedig felfelé szabályozódott.

A szekvenálási adataink megerősítése céljából és az öngyilkos viselkedéssel összefüggő génexpresszió változások igazolására 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, NRG1, SYT5 és NECAB2, mint emelkedett expressziójú géneket, valamint AQP1, ITPKB, ITGB4, SLCO2B1, GJA1, PRKCH, GLUL és S100B csökkentett expressziójú géneket vizsgáltuk. Eredményeink szerint a vizsgált gének expressziójának változása összhangban volt a szekvenálási eredményekkel.

A DEG-ek funkcionális annotációja és osztályozása

Annak megértésére, hogy a DMPFC változó expressziójú génjei milyen tulajdonságokkal bírnak, a DEG-eken GO analízist végeztünk. 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. 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 le-regulált gének esetében a sejtfelszíni receptor jelátviteli útvonalhoz és a fehérje kötődéshez kapcsolódó gének felülreprezentálódtak, míg a fel-regulált gének körében a szinaptikus jelátviteli útvonalhoz és a nátriumcsatorna-aktivitáshoz tartozó gének dúsultak az öngyilkosok DMPFC-ben.

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 *le-regulált DEG*-ek szignifikánsan felülreprezentálódtak 1.) a sejtfelszíni receptor jelátviteli útvonalban, 2.) a növekedési faktor kötődésében, 3.) a PI3K-Akt jelátviteli útvonalban, 4.) a TNF jelátviteli útvonalban és a 5.) citokin-citokin receptor kölcsönhatásban, míg a *fel-regulált DEG*-ek szignifikánsan felülreprezentálódtak 1.) a szinaptikus funkciókban, 2.) 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.

DEG-ek közötti fehérjekapcsolat (PPI) vizsgálata és a hub fehérjék azonosítása

A PPI hálózatokat elemző módszereket a génexpressziós változások biológiai vonatkozásának megértéséhez használtunk. 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 ezen hálózatokat a Cytoscape szoftverbe. A PPI hálózat analízisének egyik lehetősége a kiemelkedő fontossággal bíró *hub*-ok azonosítása. Egy gén/fehérjehálózatban azokat a géneket/fehérjéket, amelyek a hálózatot alkotó többi elemmel jelentős számú kölcsönhatásban vannak,

hub-oknak nevezzük. A kölcsönhatások magas száma miatt a hub-ok általában fontos szerepet játszanak egy adott biológiai rendszerben. A legkiemelkedőbb hub fehérjék analízisét a cytoHubba beépülő modul segítségével végeztük. A 10 legnagyobb fokszámmal rendelkező le-regulált hub funkciójának analízise során megállapítottuk, hogy ezek a fehérjék kiemelkedő szerepet játszanak az asztrocita differenciációban és a gyulladásos folyamatokban. A 10 legnagyobb fokszámmal rendelkező fel-regulált hub zömében a membránpotenciál szabályozásában vesznek részt, illetve ezen fehérjék többsége a szinapszisokban található. A 10 legfőbb le-regulált hub fehérje közül az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), míg a fel-regulált hub fehérjék közül a kolecisztoxinin (CCK) rendelkezik a legnagyobb kapcsolattal a változó gének fehérje hálózatában. Az Allen Human Brain Atlas (AHBA) adatbázis adatai alapján a legtöbb leszabályozott hub fehérje bőségesen expresszálódik asztrocitákban, míg a 10 legkiemelkedőbb fel-regulált hub fehérje a serkentő és gátló neuronokban található.

A DEG-ek ko-expressziós hálózat analízise

A DEG-ek további elemzésének céljából megvizsgáltuk a gének ko-expressziós tulajdonságait, a keletkező hálózatot pedig *klaszterekre* bontottuk. Ezzel a módszerrel olyan génhalmazokat azonosíthatunk, melyek szinkron expressziójuk révén hasonló szereppel bírhatnak egyes biológiai folyamatokban. Emellett, egy adott ko-expressziós génhalmazban, a hub gének azonosításai is lehetségesek. Két független ko-expressziós hálózatot alkottunk a le- és fel-regulált gének számára, hogy azonosítsuk a le- és felregulált gének közötti moduláris kapcsolatokat. A gének közötti ko-expresszió mértékét a Pearson-féle korrelációs együttható felhasználásával végeztük. *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 gyulladási válaszkészségre utalnak. *A fel-regulált ko-expressziós hálózat* főbb génhalmazai viszont a neurotranszmitter receptor internalizációjához, a nátriumcsatorna aktivitáshoz és a peptidok neuromodulátor funkciójához kapcsolódtak.

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 citoszkeleton szabályozása, továbbá képes negatívan szabályozni az autofágiát. A fel-regulált ko-expressziós hálózat legfőbb klaszterének hub-ja a *calcyon neuron specifikus vezikuláris protein* (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

A ko-expressziós hálózat 10 le és fel-regulált hub génjének további 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. 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. Az annotációs eredményeinkhez hasonlóan a top hub gének AHBA adatbázisban történő sejtípus függésének elemzése alapján a legtöbb le-regulált hub gén asztrocitákban, míg a fel-regulált hubok serkentő és gátló neuronokban, illetve oligodendrocitákban expresszálódnak.

Depresszióban érintett gének azonosítása

A top 10 le- és fel-regulált DEG-eket, 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 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. A GAD adatbázisban való keresés alapján több depressziós zavarral komorbid dúsult betegséget azonosítottunk. A pszichiátriai

rendellenességek mellett számos komorbid betegség, mint az alkoholfogyasztás, evészavar (bulimia, elhízás) vagy a T2DM érintettsége is megfigyelhető volt. 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.

A NECAB2 eloszlása a DMPFC-ben

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-es típusú metabotróp glutamát receptor (mGluR) csoportba tartozó receptorokhoz (mGluR1 és mGluR5), így modulálni képes azok funkcióját. Szekvenálási eredményeink bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a glutamáterg jelátviteli rendszer aktiválódása részt vesz az öngyilkos viselkedés patogenezisében. Így valószínűsíthető, hogy a *NECAB2* a mGluR5 aktivitásának növelésével szerepet játszik 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. Az AHBA adatai szerint a *NECAB2*-t expresszáló sejtek többsége olyan GABAerg interneuronokban fejeződik ki, amelyek zömében a vazoaktív intesztinális peptid (VIP), a lizoszóma-asszociált membránlikoprotein 5 (LAMP5), a páros dobozfehérje 6 (PAX6) illetve a szomatosztatin (SST) molekulák expressziójával jellemezhetők. 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 NECAB2 expressziója nemcsak a sejttestben, hanem a szomatodendritikus kompartmentekben, illetve axonterminálisokban is azonosítható volt. Eredményeinket összegezve valószínű, hogy a NECAB2-t expresszáló sejtípusok az mGluR-ok szabályozásán keresztül érintettek lehetnek az öngyilkos viselkedés kialakulásában.

Emelkedett GLP-1R expresszió a T2DM betegek PVN mintáiban

Irodalmi adatok beszámoltak a GLP-1 jelátvitel érintettségéről depresszióban. 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 PVN régiójában. A génexpressziós vizsgálatokat RT-qPCR és Western blot technikák segítségével végeztük. A mennyiségi expresszió analízis alapján elmondható, hogy a GLP-1R mRNS expressziója szignifikánsan megnőtt a T2DM betegekben: a GLP-1R relatív mRNS expressziójának aránya a diabéteszes betegek PVN mintáiban $2,89 \pm 0,9$, míg a kontroll egyének esetében $0,52 \pm 0,13$ volt ($p < 0,05$). A relatív GLP-1R mRNS expresszió $1,39 \pm 0,83$ volt a metforminnal kezelt T2DM betegek esetében ($p < 0,05$). A denzitometriás mennyiségi analízis kimutatta, hogy a GLP-1R fehérje expressziója szintén megnövekedett a T2DM betegek PVN mintájában. A relatív GLP-1R fehérje szint a T2DM betegekben $1,25 \pm 0,18$ (köztük $1,45 \pm 0,48$ a metforminnal kezelt betegeknel) illetve $0,71 \pm 0,13$ a kontroll egyénekben ($p < 0,05$). Adataink azonban arról nem adnak információt, hogy mely szubdivíziókban történik változás, illetve arról, hogy a GLP-1R mRNS szintje milyen mechanizmusok által nő a T2DM betegekben. Jelen munkában elsőként számoltunk be a GLP-1R expressziójának emelkedéséről T2DM betegek PVN mintáiban. Ezáltal feltételezzük, hogy a GLP-1R különleges szerepet játszik a táplálkozás és a glükóz homeosztázis zavarában.

5. Következtetések

1. A szekvenálási eredményeink alapján változó gének funkcióit és útvonalait elemezve megállapítottuk az immunválaszok inaktiválódását és a gliasejtek differenciálódásában szerepet játszó gének expressziójának csökkenését, valamint a glutamáterg szinaptikus jelátvitelben részt vevő gének expressziójának emelkedését öngyilkosok DMPFC mintáiban, ami ezen folyamatok érintettségére utal az öngyilkos viselkedés kialakulásában.
2. A DEG-ek fehérje interakciós hálózatának elemzése kimutatta, hogy a le-regulált gének esetében az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), a fel-regulált gének közül pedig a kolecisztokinin (CCK) rendelkezik a legnagyobb kapcsolattal, ami ezen gének központi szerepére utal az öngyilkos viselkedés kialakulásában.
3. A DEG-ek ko-expressziós hálózatának elemzése során a le-regulált gének legfőbb ko-expressziós klaszterei csökkent gyulladásoz válasz-kész-ség-gel állnak kapcsolatban, míg a fel-regulált gének főbb ko-expressziós klaszterei a neurotranszmitter receptor internalizációhoz, nátrium csatorna aktivitáshoz és peptidek neuromodulátor funkciójához kapcsolódnak. A legfontosabb le-regulált hub gén a vinexin (SORBS3), amely autofágiában és neurodegeneratív állapotok kialakulásában vesz részt. A legfontosabb fel-regulált hub gén a calcyon (CALY), amely a neurotranszmitter felszabadulás optimalizálásában játszik szerepet. E két legfőbb hub gén potenciális biomarkerként szolgálhat az öngyilkos viselkedésben.
4. Az RT-qPCR validálás során 14 igazoltan depresszióban érintett gén mRNS expressziójának változása összhangban volt a szekvenálási eredményeinkkel, így annak validálásának tekinthető. Az ITPKB, GJA1 és GLUL depresszióban érintett gének változását eddig csak depressziósok DLPFC-ben írták le, így új eredménynek tekinthető ezen gének öngyilkosok DMPFC-ben történő változásának azonosítása. Az AQP1 és ITGB4 gének esetében, amelyek expressziós változását eddig állatok depresszió-szerű viselkedésében írták csak le, jelen tanulmányunk az első, amely összefüggésbe hozza őket az emberi öngyilkos viselkedéssel.

5. A NECAB2 öngyilkos áldozatok DMPFC-ében emelkedett expressziót mutatott. A nagyagykérgi eloszlásának vizsgálata során intenzív mRNS expressziót figyeltünk meg a DMPFC II., illetve VI. rétege között. Expressziója ugyanakkor megfigyelhető két interneuron altípusban, melyek eltérő rétegekben helyezkednek el. A NECAB2 fehérje jelen volt a neuronok szomatodendritikus és axonális kompartmentjében is. Dupla immunhisztológiai vizsgálataink során igazoltuk, hogy a NECAB2 nem expresszálódik gliasejtekben.
6. Gén-betegség asszociációs elemzéseink során megfigyeltük, hogy a depresszióban szignifikánsan felülreprezentálódott hub gének egy része 2-es típusú cukorbetegséggel (T2DM) is összefüggésbe hozhatók.
7. Eredményeink alapján a GLP-1R szignifikánsan emelkedett mRNS és fehérje expresszióját találtuk T2DM betegek hipotalamuszának PVN területén. Eredményeink megbízhatósága érdekében fontos kiemelnünk, hogy egyik T2DM beteg sem részesült GLP-1R agonista kezelésben, illetve a cukorbetegyek fele ugyan részesült más alternatív antidiabetikus terápiában, azonban az expressziós eredményeinket elemezve az antidiabetikus terápia nem volt hatással a GLP-1R expresszióra.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

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

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

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)