

Állatorvostudományi Egyetem

Biológiai Intézet

Egyes kortikális neuronpopulációk érintettsége skizofréniában

Tyler Teadora

biológus MSc

Témevezető: Dr. Adorján István

Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet

Belső konzulens: Dr. Hornung Erzsébet

Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Intézet

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések listája	3
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	4
1.1. Az emberi agy	4
1.2. A humán prefrontális kortex.....	5
1.3. Interneuronok	7
1.3.1. Calretinin immunpozitív interneuronok	8
1.3.2. SMI 311+ neuronok.....	9
1.4. Neuropszichiátriai zavarok. A skizofrénia.	9
1.5. Célkitűzés, kérdések	12
2. Anyag és módszer	13
2.1. Alanyok	13
2.2. Immunhisztokémia	14
2.3. Fluoreszcens in situ RNS-hibridizáció (RNA-scope technika)	15
2.3.1. Előkezelés.....	15
2.3.2. Hibridizáció	15
2.3.3. Amplifikáció, blokkolás és fluoreszcens jelölés.....	16
2.3.4. RNAscope immunhisztokémia	16
2.4. Digitális képelemzés, sejtszámlálás.....	17
2.5. Leíró statisztika, statisztikai analízis	17
3. Eredmények.....	18
3.1. Kérgi CR+ interneuronok vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel.....	18
3.1.1. Kérgi CR+ neuronok kvalitatív elemzése.....	18
3.1.2. Kérgi CR+ interneuronok denzitása	20
3.2. Kérgi SMI 311+ neuronok vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel	21
3.2.1. Kvalitatív elemzés	21
3.2.2. Kérgi SMI 311+ neuronok denzitása.....	22
3.4. CR+ alpopulációk feltérképezése RNA-scope módszerrel	24
3.4.1. CR+ neuron alpopulációk feltérképezése	24
3.4.2. CR+CRH+VIP+ sejtek a kontroll és skizofrén csoportban.....	24
4. Diskusszió.....	26
5. Összefoglalás.....	30
6. Summary	31
7. Irodalom	32
8. Köszönetnyilvánítás	43
Függelék.....	44
Témavezetői ellenjegyzés.....	46
Belső konzulensi nyilatkozat.....	47

Rövidítések listája

ADHD = figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar

ASD = autizmus spektrum zavar

BA9 = Brodmann area 9

CB = calbindin

CR = calretinin

CRH = kortikotropin-releasing hormon

CTR = kontroll

DAB = 3,3-diaminobenzidin

DLPFC = dorzolaterális prefrontális kortex

GABA = gamma-amino-vajsav

ip = immunpozitív (+)

iPSC = indukált pluripotens őssejt

HRP = horseradish peroxidaze, torna-peroxidáz

PFA = paraformaldehid

PBS = „phosphate buffer saline”, foszfátpufferes sóoldat

PV = parvalbumin

PMI = post mortem idő (a halál beállta és a fixálás között eltelt idő órában mérve)

RNS = ribonukleinsav

SCH = skizofrénia/skizofrén

SMI 311 = neurofilamentum közepes és nehéz lánc antitest koktél

TBST = Tris-EDTA sóoldat Triton 100X detergenssel

TSA = Tyramide Signal Amplification

VIP = vazointesztinális peptid

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

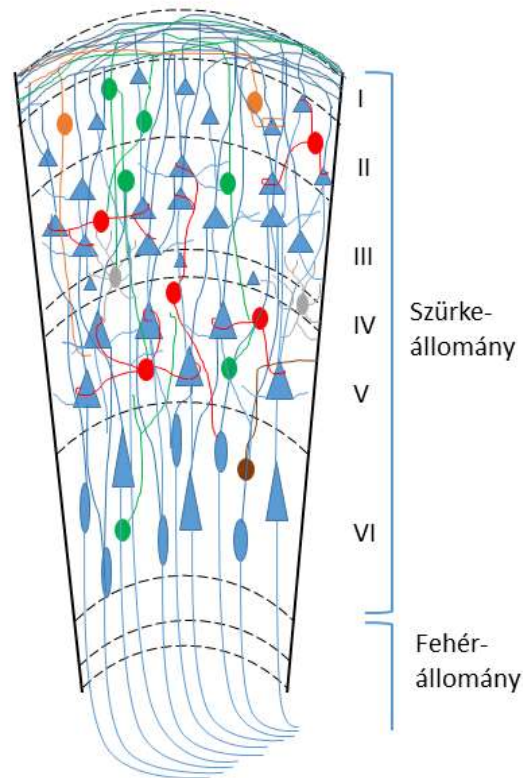
1.1. Az emberi agy

A több, mint százmilliárd sejtből álló humán agy (*Azevedo és mtsai., 2009*) az evolúció egyik legkomplexebb terméke. Legnagyobb részét az agyvelő (cerebrum) teszi ki. Szövettanilag külső szürkeállományra (agykéreg) és az alatta húzódó, axonok dús rosthálózatából álló fehérállományra különíthető. Az agykéregben is futnak különféle idegrostkötegek (pályák), melyek egyrészt az agykéreg egyes területeit kötik össze (asszociációs pályák), másrészt a két félteke közt tartanak fenn szimmetrikus kapcsolatot (commissurális pályák). Ezen kívül az agykéregben indulnak a leszálló motoros pályák és végződnek a felszálló érző pályák, melyeket együtt projekciós pályáknak nevezünk (*Réthelyi és Szentágothati, 2014*). A cerebrum anatómiailag von Economo munkássága nyomán frontális, parietális, insuláris, temporális, limbikus superior és inferior valamint occipitális lebenyekre osztható (*von Economo és Koskinas, 1927*), melyek mind-mind más funkciókkal függnek össze. Brodmann úttörő citoarchitektonikai megfigyelései során a humán agykéreg eredetileg 44 „aréára”, régióra osztotta (*Brodmann, 1909*). Ezekről azóta számos esetben kimutattak funkcionális különbségeket is (*Broca 1861, Tsuchida és Fellows 2009*). Bár von Economo és Koskinas 1927-ben egy sokkal nagyobb felbontású atlaszt publikált (*von Economo és Koskinas, 1927*), mégis Brodmann munkássága épült be szervezesebben a tudományos köztudatba. A humán neocortex hat morfofunkcionálisan elkülönülő rétegből áll (*Brodmann, 1909*), szemben az ősi cerebrális régiókkal, amelyek öt (allocortex), illetve három (paleocortex) rétegből épülnek fel. A legelterjedtebb módszer a rétegek azonosítására a Nissl által kifejlesztett krezil-ibolya alapú festés.

A felnőtt humán agykéreg legkülső rétege (*stratum moleculare*) sejttestekben szegény. Dús idegrost-hálózat szövi át, melyben elszórtan többek közt Cajal-Retzius és neurogliaform sejtek találhatóak (*Ramón y Cajal 1904; Marín-Padilla 1990, Oláh és mtsai 2007*). A serkentő piramissejtek jellegzetes kúp alakú sejtteste a II rétegtől a VI.-ig egyaránt megtalálható, de két rétegben szemmel láthatóan sűrűbben fordulnak elő: ez a III. (*stratum pyramidale externum*) és az V. (*stratum pyramidale internum*) réteg. A piramissejtek az agykéregnek körülbelül 70-80%-át teszik ki, míg a fennmaradó ~20-30 % legnagyobb részét a gátló interneuronok alkotják (*Rio és DeFelipe 1993, Markram és mtsai 2004*). A kérgi serkentő sejtek fő neurotranszmittere a glutamát. Méret és morfológia tekintetében réteg szerinti változatosságot mutatnak, de közös jellemzőjük a sűrűn tüskézett, kitüntetett irányultságú apikális dendrit (*Andjelic és mtsai 2009*,

Peters és Jones 1984). Az V. réteg piramisisejtjeinek axonja lokális kollaterális ágakra oszolhat, de az axon főága a fehérállományba lépve más kérgi vagy kéreg alatti területeket céloz – ezért nevezzük ezeket a sejteket projekciós vagy principális neuronnak. A III. réteg sejtei ezzel szemben a stimulusok fogadásában és az asszociációs kapcsolatok fenntartásában vesz részt (*von Economo, 2009*). A II. (*stratum granulosum externum*) illetve a prefrontális kéregben a IV. réteg (*stratum granulosum internum*) elsősorban nem-piramidális sejteknek ad otthont.

Ezek lehetnek a piramisisejtekhez hasonlóan serkentő, de lokális kapcsolatot fenntartó interneuronok (IV. rétegi tüskés csillagsejt; *spiny stellate neuron, Meyer és mtsai 1989, Andjelic és mtsai 2009*), vagy gátló interneuronok (kosársejt, csillársejt, neurogliaform sejt, stb.) amelyek morfológiájukban és elektrofiziológiai tulajdonságaikban változatosak. Az egymásra épülő rétegek oszlopos szerveződést mutatnak, létrehozva az agykéreg működési egységeit, az ún. minikolumnákat (1. ábra). A minikolumnák makro- és hiperkolumnákba szerveződnek, többszintű kapcsolatrendszerben működnek együtt a hierarchikus információfeldolgozásban (*Mountcastle 1957; Buldyrev és mtsai 2000, Opris és Casanova 2013*).



1. ábra A kérgi kolumna sematikus ábrája. (Kék sejtek: piramisisejtek. Színes sejtek: interneuronok.)

1.2. A humán prefrontális kortex

A prefrontális kortex a nagyagykéreg frontális lebenyének elülső részét foglalja magába, amely emberi agy esetében a teljes frontális lebenynek körülbelül 2/3 részét jelenti. Rostralis, orbitofrontalis, dorzolateralis, dorzomedialis, ventrolateralis és ventromedialis régiókra osztható, melyek közül strukturálisan leginkább a dorsolateralis (DLFPC), az orbitofrontalis

(OFPPFC) és a ventromedialis (VMPFC) különíthető el. A prefrontális kéreghez kötjük a munkamemóriát (amely lehetővé teszi az információ rövid távú tárolását és manipulációját olyan tevékenységekben, mint pl. nyelvi megértés (*Baddeley és Hitch 1974, Goldman-Rakic 1995, Finn és mtsai 2019*), emellett a pszichét és a viselkedés elemeinek legmagasabb szintű integrációját (*Arteaga és mtsai 2015*). Az eddigi tanulmányok többek közt olyan jelenségekkel hozták összefüggésbe, mint a döntéshozatal, célorientált viselkedés (*Domenech és Koehlin 2015*), szelektív figyelem, absztrakt információk értelmezése és tárolása (*Fuster és mtsai 1989*), illetve a viselkedés organizációja és kontrollja (*Miller és Cohen 2002, Szczepanski és Knight 2014, Arteaga és mtsai 2015*). Integráló és információszelekciós szerepét támasztja alá a magas fokú konnektivitás, amely mind kortikális, mind a legtöbb szubkortikális agyterülettel kapcsolatban jellemzi (*Barbas és mtsai 1991, Bates és Goldman-Rakic 1995, Jarbo és Verstynen 2015, Haber és mtsai 2016*). Funkcióját modellállatokon léziós kísérletekkel (*Heuer és Bachevalier 2013*), embereken pedig pozitron emissziós tomográfiával (PET) és mágneses magrezonancia képalkotó eljárással (MRI) vizsgálják (*Abrahams és mtsai 1996, Kahnt és mtsai 2011*). Fontos kiemelni azonban az elmúlt évszázadban a traumás agysérülésen vagy lobotómián átesett főemlősökön és embereken végzett megfigyeléseket is, hiszen ezek alapozták meg az agyterületek funkcionális feloszthatóságának koncepcióját. Ezek az esetek közvetlen információval szolgálnak a sérült vagy eltávolított agyterületek funkcionális szerepéről (*Szczepanski és Knight 2014*). Ilyen megfigyelések és kísérletek (*Pochon és mtsai 2001, Koenigs és Grafman 2009*) eredményei alapján ma úgy gondoljuk, hogy a DLPFC fontos szerepet tölt be a munkamemória működésében (*Jacobsen, 1935; Tsuchida és Fellows 2009*), a koncentrációban, a figyelem fenntartásában (*Chao és Knight, 1998*), valamint az újdonságkeresésben, motivációban (*Ferrier 1876, Daffner és mtsai 2000a*). Hasonlóképp a VMPFC-ről régóta tudjuk, hogy szerepe van a beszéd létrehozásában (*Broca, 1861; Ries és mtsai 2013*), az OFPPFC-nek pedig az érzelmi kontrollban és a szociális viselkedés flexibilitásában (*Wallis 2012*).

Emiatt a prefrontális kéreg a neuropszichiátriai kórképek kutatásában kiemelten vizsgált agyterület. Érintettnek bizonyult többek közt az autizmus spektrum zavarban (*Gilbert és mtsai 2008*), skizofréniában (*Benes 1991*), bipoláris zavarban (*Oh és mtsai 2012*), depresszióban (*Koenigs és Grafman 2009*) és ADHD-ban (*Halperin és mtsai 2006*).

1.3. Interneuronok

A főemlős evolúció egyik legjellegzetesebb neuroanatómiai jelensége a prefrontális kéreg expanziója (*Condé és mtsai 1994*). Az eddigi eredmények alapján (*Rio és Defelipe 1996, Gabbott és mtsai 1996, Gabbott és mtsai 1997, Kawaguchi és Kubota 1997*) az interneuronok száma nagyobb arányban növekedett, mint a serkentő sejteké, ami jelentős funkcionális diverzifikálódással járt (*Hodge és mtsai 2019, Krienen és mtsai 2019*). Ráadásul ez a növekedés az egyes interneuron populációkat nem azonos mértékben érintette. Több kutatás a calretinin interneuronok szelektív expanzióját találta (*Rio és Defelipe, 1996; Džaja és mtsai 2014; Hladnik és mtsai, 2014*), ami azt sugallja, hogy ez a sejtpopuláció kulcsfontosságú lehet a humán kogníció létrejöttében.

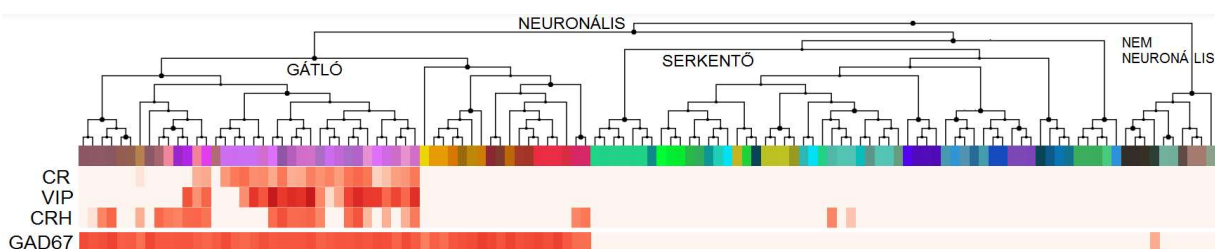
A kortikális interneuronok általában gátló aktivitású, lokális szabályzó idegsejtek, melyeknek fő neurotranszmittere a gamma-amino-vajsav (GABA). Ezek a neuronok más idegsejtek közt tartanak fenn kapcsolatot, vagyis a piramissejtekkel ellentétben axonjuk jellemzően nem hagyja el a kéregállományt (bár egy részükről úgy tartják, hogy hosszú távú kortiko-kortikális kapcsolatokat is létesít (*Tomioka és Rockland 2007*)). Fontos feladatuk a serkentő sejtek működésének összehangolása; amit az tesz lehetővé, hogy bár sokkal kisebb számban vannak jelen, mint a piramissejtek, egy interneuron akár több száz piramissejtet is beidegezhet (pl csillársejt (*Freund és mtsai 1983, Somogyi és mtsai 1985, Tai és mtsai 2014*)).

Az interneuronok heterogén populációja többféle szempont alapján csoportosítható, például morfológiai, biokémiai, vagy elektrofiziológiai tulajdonságaik, illetve a kimeneti szinapszisok lokalizációja alapján (*DeFelipe 1993; Freund és Buzsáki 1996, Cauli és mtsai 1997, Szabadics és mtsai 2006*). Ez utóbbi tulajdonság tekintetében egyfajta niche-szegregáció figyelhető meg: egyes interneuronok közvetlenül a piramissejtek sejttestén szinaptizálnak, egyesek az axon iniciális szegmentumon, míg mások a távoli dendriteket célozzák, más-más fázisában szabályozva a impulzusok haladását. Az újgenerációs szekvenálás forradalma óta elterjedt egysejt-szintű RNS-szekvenálás segítségével a sejtek génexpressziós profiljuk alapján is csoportosíthatóak (*Hodge és mtsai 2019, Velmeshev és mtsai 2019, Krienen és mtsai 2019*). Fontos leszögezni, hogy a rendelkezésre álló szakirodalom döntő többsége rágcsáló adatokon alapul. A humán kérgi interneuron típusok fiziológiájáról és funkciójáról alig van közvetlen információk (*Oláh és mtsai 2007, Szegedi és mtsai 2016, Poorthuis és mtsai 2018*). Biokémiai alapon klasszikus módszernek számít a fő interneuron csoportok kalciumkötő-fehérje típus alapján történő elkülönítése: a legfontosabb ilyen marker-fehérjék a parvalbumin (PV),

calbindin (CB) és calretinin (CR). Kutatásunkban mind klasszikus, mind modern módszereket ötvöztünk, igyekezve, hogy eredményeink összevethetőek legyenek az eddigi irodalmi adatokkal, emellett kiaknázzák a technikai fejlődés nyújtotta lehetőségeket.

1.3.1. Calretinin immunpozitív interneuronok

Szakedolgozatom fókuszában az agykérgi calretinin-immunpozitív (CR+) interneuronok állnak. A calretinin egy troponin C szupercsaládba tartozó kalciumkötő fehérje, mely a szinaptikus folyamatok szabályzásában és a szignáltranszdukcióban játszik fontos szerepet, valamint citoszolikus kalcium-pufferként fontos feladata az intracelluláris kalciumszint szabályzása (*Barinka és mtsai 2010*). Egér és makákó modellállatokon végzett kutatások alapján a prefrontális kérgi CR+ interneuronok egy része más interneuronokon szinaptizál, vagyis dezinhibíciót hajt végre; gátlásoldással közvetett módon facilitálja a serkentő sejtek működését (*Meskenaite 1997b, Meltchitzky és Lewis 2008, Caputi és mrsai 2009*). Legnagyobb sűrűségben a II. – III. rétegben fordulnak elő (*Rio és DeFelipe 1996, Condé és mtsai 1994*), ez a mintázat evolúciósan konzerváltnak tűnik a rágcsáló, majom és humán eredményeket összevetve (*Barinka 2010*). Morfológiájuk leggyakrabban bipoláris jellegű, orientációjuk a kérgi kolumnában vertikális, sejttestük ovális vagy orsó alakú. Ritkábban multipoláris horizontálisan orientált sejtek is előfordulnak (*Condé és mtsai 1994, Gonchar és Burkhalter 1997, Barinka és mtsai 2010, Zaitsev és mtsai 2005*). Mivel tulajdonságaik nem egységesek, feltételezhető, hogy a CR+ neuronok populációja különböző alpopulációkat tartalmaz. Ez a kérdés jól vizsgálható biokémiai tulajdonságaik feltérképezésével (pl. egyes neuropeptidok koexpressziója; *Gabott és Bacon 1997b, Cauli és mtsai 1997*). Az Allen Brain Institute munkatársai egy publikus adatbázisban közzétették eddigi transzkriptomikai eredményeiket a humán agykéreg több agyterületéről (*Hodge és mtsai 2019*). Ennek segítségével és korábbi eredmények alapján (*Cauli és mtsai 1997*) választottuk a vazointesztinális peptidet (VIP) és a kortikotropin releasing hormont (CRH), amelyekkel potenciálisan elkülöníthetőek a CR+ neuronok bizonyos alpopulációi. (2. ábra).



2. ábra. CR, VIP és CRH mRNS expressziós hőtérképe. A GAD67 általános interneuron marker. (Allen Brain Institute, <https://celltypes.brain-map.org/rnaseq/human/cortex>)

A humán adatok alapján a patkány agykérgéhez hasonlóan a legtöbb CR+ sejt egyben VIP+ (Kubota és Hattori 1994, Gabbott és Bacon 1997, Cauli és mtsai 1997), míg az egér agykérgében a CR+ neuronoknak mintegy 30%-a VIP- (Perrenoud és mtsai, 2013). A CRH a humán neocortexben a patkánnyal és egérrel ellentétben (Gallopín és mtsai 2005, Kubota és mtsai 2011) a CR+ neuronok nagy részében kifejeződik, de egyes alcsoportokban a transzkriptomikus adatok alapján nem (2. ábra).

A korábban említett evolúciós trend és az excitátoros/inhibitoros teória nyomán az elmúlt évtizedekben egyre több kutatás célozta az egyes interneuron populációk érintettségének feltárását neuropszichiátriai zavarokban, melyek eredményeit összevetve egyre biztosabbnak tűnik az interneuron diszfunkció jelensége ezekben a kórállapotokban (Marín, 2012).

1.3.2. SMI 311+ neuronok

Az SMI 311 olyan neuronális marker-koktél, amely a neuronokra jellemző neurofilamentum nehéz (NEFH) és közepes (NEFM) láncát jelöli. Nem specifikus markere a serkentő populációnak, de a kutatás idején tudomásunk szerint nem állt rendelkezésre ennél jobb, forgalomban elérhető „általános” excitátoros marker. Az SMI 32 vagy NF200 markert (melyek csak a neurofilamentum nehéz láncát jelölik) más kutatásokban is használták már piramisajt markerként (Law és Harrison 2003, Miguel-Hidalgo 2005). A legújabb, publikusan elérhető humán egysejtszintű transzkriptomikus adatok szerint (Hodge és mtsai 2019) a közepes láncot is jelölő SMI 311 koktéllal átfogóbb képet kaphatunk a kérgi piramisajtokról.

1.4. Neuropszichiátriai zavarok. A skizofrénia.

A mentális problémák világszerte hatalmas terhet rónak a társadalomra. Kialakulásuk hátterében genetikai és környezeti faktorok bonyolult összjátéka áll (Ripke és mtsai 2014). Az egyes kórképek genetikai háttere közt gyakran átfedés van (pl. autizmus spektrum zavar és skizofrénia között; Rapoport és mtsai 2009). Annak ellenére, hogy a kóroki tényezőkkel kapcsolatban már jelentős szakirodalmi információval rendelkezünk, mechanizmusuk és neuropatológiai hátterük a mai napig nagyrészt ismeretlen. Ennek hiányában pedig a célzott gyógyszerfejlesztés is gyakorlatilag stagnál (Moghaddam és Javitt 2019). Számos, állatmodellből származó ígéretes eredményt nehéz emberre extrapolálni, figyelembe véve például, hogy a prefrontális cortex egyes területeinek nincs egyértelmű homológ régiója rágcsálókban (Perelman és mtsai, 2011). A post-mortem humán kutatások lehetőséget nyújtanak az egyes kórállapotok molekuláris szintű felderítésére és biomarkereik felfedezésére (Wang és mtsai 2016, Velmeshev és mtsai 2019). A lehetséges - és valószínű - fejlődéstani

rendellenességeket pedig indukált pluripotens őssejt (iPSC) tenyészetekkel és iPSC-eredetű organoid modellekkel érdemes vizsgálni (*Takahashi és Yamanaka 2006, Nicholas és mtsai 2013, Stachowiak és mtsai 2017*). Mindent összevetve bizonyos, hogy a neuropszichiátriai zavarok kialakulásának megértéséhez rendszer-szemléletű, multidiszciplináris megközelítés szükséges.

A skizofrénia heterogén, súlyos neuropszichiátriai zavar, mely jelentős terhet ró mind az érintett páciensre és hozzátartozóira, mind a társadalomra. Prevalenciáját igen nehéz becsülni, nem utolsósorban a gyakori anozognózia (a betegségtudat hiánya) és a felmérések alapjául szolgáló nagy mennyiségű adat heterogenitása miatt. A diagnózis felállítása viselkedésteszteken alapul, nincs objektív klinikai biomarker. A legfrissebb metaanalízisek az egész élet során valamely ponton jelen lévő skizofrénia prevalenciáját 0,4 – 0,86% közé teszik (*Saha és mtsai 2006, Perala és mtsai 2007*). Karakterisztikus tünetei, melyeken a diagnózis is alapul: pszichózis (delúziók, hallucinációk jelentkezése), dezorganizált beszéd és gondolkodás, inkoherens, furcsa mozgás vagy katatonikus állapot. Emellett gyakran negatív tünetek jelentkeznek (pl. antiszocialitás, anhedonia, érzelemmentes beszéd, szótlanság). Az első epizód jellemzően 16 és 30 év közt jelentkezik (férfiak esetében 16 – 25 év, nők esetében 18 – 30 év). Korai tünetei lehetnek a türelmetlenség, irritabilitás, alvásproblémák, szociális visszahúzódás és izoláció, azonban ezeket gyermek-és tinédzserkorban nehéz skizoid tünetként észlelni, hiszen az egészséges serdülőkorban is előfordulnak. Egészen a legutóbbi, ötödik kiadásig, a DSM (*Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders*) a skizofréniának 5 alcsoportját különítette el tünetek alapján: paranoid, dezorganizált, katatonikus, reziduális és definiálatlan típus. Azonban az altípusok közt dinamikus átfedés volt jellemző, ami jelentősen nehezítette a diagnózist és a terápiát. A tünetek alapján kategorizált páciensek gyakran hirtelen viselkedésváltozást mutattak, és más altípushoz „tartozó” tüneteket manifesztáltak. Emiatt a legújabb kiadás elhagyta a kategóriákat és spektrumbetegségként kezeli a skizofréniát. Ez mind a tünetek változatosságára és változékonyságára, mind maga a kórállapot súlyosságára nézve is indokolt. A skizofrénia kialakulásában mind genetikai, mind környezeti faktorok szerepet játszanak, melyek egymással interakcióban is állnak (*Sullivan és mtsai 2012*). Heritabilitása magas, a források 0,64 és 0,81 közé teszik (*Falk és mtsai 2016, Lichtenstein és mtsai 2006, Sullivan és mtsai 2012*). GWAS és RNS-szekvenálásos kísérletekből számos kockázati gént ismerünk, melyek valószínűleg egymással komplex interakcióban állva fejtik ki hatásukat sok más, még ismeretlen gén és faktor mellett (*Ripke és mtsai 2014, Fromer és mtsai 2014*). Neuropatológiáját az elmúlt évszázad során tüzetesen vizsgálták, ám pontos mechanizmusát

még nem ismerjük. A két legszélesebb körben elfogadott és alátámasztott elmélet a dopaminerg és a glutamáterg elmélet, egy újabb pedig az interneuron elmélet. A klasszikusnak számító dopaminerg elmélet a hallucinációkat, delúziókat a dopaminerg rendszer hiperszenzitivitásával magyarázza (*Wong és mtsai 1986, Cassidy és mtsai 2018*). Az elmélet azon alapul, hogy a legtöbb antipszichotikumként bevált gyógyszer dopamin D2 receptor antagonistá (és egyes esetekben agonista) hatással bír (*Santoro és mtsai 2014, Rampino és mtsai 2019*). Azonban meg kell jegyezni, hogy ezek az anyagok sok esetben több más neurotranszmitter jelátviteli útvonalára is hatással lehetnek (pl. szerotonin). A dopamin jelátviteli rendszer abnormális működése az egész agy fiziológiájára, konnektivitására, szinaptikus plaszticitására kihat (*Kesby és mtsai 2018, Rössler és mtsai 2020*). A glutamáterg elmélet azon a megfigyelésen alapul, hogy a glutamát receptor antagonistá szerek skizofrénia-szerű tüneteket keltenek egészséges kontroll alanyokban (*Javitt és mtsai 1987, Javitt és Zukin 1991*), és lényegében a glutamáterg neurotranszmisszió átfogó szerepét veti fel skizofréniaiban. Ezt a hipotézist számos rágesáló és főemlős kutatás eredménye is támogatja (*Kitzinger és Arnold 1949, Weickert és mtsai 2013, Javitt 2010*), melyek bizonyos glutamát receptorokat érintettek találtak (NMDA receptor hipofunkció). Ennek kapcsán a humán gyógyszerfejlesztés lehetőségét is komolyan felvetették (*Pei és mtsai 2019*). Több kutatás vizsgálta a piramissejteket, mint a glutamáterg neurotranszmisszió agykérgi főszereplőit, ám denzitásuk változatlanak bizonyult skizofrén esetek agykérgében (*Akbarian és mtsai 1995*). Korai munkák abnormálisan magas össz-neurondenzitást figyeltek meg a DLPFC területén (*Selemon és mtsai 1995*), azonban az eredmények azt sugallták, hogy nem a sejtek, hanem a sejtközötti állomány (neuropil) redukciójáról lehet szó. Ezzel ellentétes eredmények is születtek (*Benes 1991, Thune és mtsai 2001*), amelyek nem találtak az össz-neurondenzitás növekedését skizofréniaiban. Számos kutatás a kéregvastagság és a szinaptikus denzitás csökkenését mutatta ki skizofréniaiban, mely a neuropil redukciós elmélettel párhuzamba állítható (*Feinberg 1989, Yan és mtsai 2019, Onwordi és mtsai 2020*). A dopaminerg, glutamáterg és interneuron elméletek már kialakult patológiás állapotokat vesznek alapul és korreláltatják a skizofrénia különféle tüneteivel. Az oki tényező azonban valószínűleg – az autizmus spektrum zavarhoz és az ADHD-hoz hasonlóan – az embrionális fejlődés során végbemenő rendellenességekben keresendő (*Owen és mtsai 2011, Birnbaum és Weinberger 2017*).

A GABAerg neuronok kulcsszerepe skizofréniaiban szinte biztos (*Fung és mtsai 2010, Marin 2012*), de részleteiben ismeretlen. Ahhoz, hogy ezt megérthessük, először az egészséges serkentő/gátló rendszer működését kell elemeiben megismernünk. Eddig egy munkacsoport írta

le a parvalbumin tartalmú sejtek denzitásának csökkenését skizofréniában (*Beasley és Reynolds 1997, Reynolds és Beasley 2001, Reynolds és mtsai 2002, Beasley és mtsai 2002*), és bár ezt több független negatív eredményű megfigyelés is követte (*Woo és mtsai 1997, Cotter és mtsai 2002, Tooney és mtsai 2004*), az eredmény mégis beépült a tudományos köztudatba. Egy friss metaanalízis szerint a jelenség valóban releváns lehet a skizofrénia patomechanizmusában (*Kaar és mtsai, 2019*), de erre vonatkozólag jelenleg nincs elegendő humán bizonyíték. Az elmúlt harminc évben nem alakult ki végleges konszenzus az egyes interneuron csoportok érintettségéről. A calbindin interneuronok denzitásának növekedését (*Daviss és Lewis 1995, Cotter és mtsai 2002*) és csökkenését (*Beasley és mtsai 2002*) is leírták. Az eddigi immunhisztokémiai tanulmányok a CR+ interneuronok denzitását nem találták megváltozottnak skizofréniában a DLPFC területén (*Daviss és Lewis 1995, Reynolds és Beasley 2001, Beasley és mtsai 2002, Tooney és mtsai 2004 Hashimoto és mtsai 2003, Oh és mtsai 2012*). Azonban a betegség fenotípusos és molekuláris heterogenitása (*Bowen és mtsai 2019*), valamint a CR+ interneuronok evolúciobiológiai jelentősége (*Dzaja és mtsai 2014, Hladnik és mtsai 2014*) együtt indokolják a kérdés újvizsgálását.

1.5. Célkitűzés, kérdések

Szakedolgozatom célja a kortikális calretinin-immunpozitív interneuronok és az SMI 311 immunpozitív neuronok morfológiájának és réteg szerinti denzitásának vizsgálata a DLPFC területén skizofréniában immunhisztokémiai módszerrel. Emellett szeretném bemutatni előzetes in situ RNS-hibridizációs (RNA-scope) eredményeinket a CR+ sejtpopuláció VIP-és CRH mRNS expresszió alapján elkülöníthető alcsoportjainak feltérképezéséről.

Hosszú távon célunk átfogó képet alkotni a humán prefrontális kéreg interneuronális összetételéről és skizofréniában fellépő mRNS-és fehérje szintű változásairól.

Kutatási kérdéseink:

Különbözik-e a CR+ neuronpopuláció denzitása a DLPFC területén kontroll és skizofrén alanyok között?

Különbözik-e a SMI 311+ neuronpopuláció denzitása a DLPFC területén kontroll és skizofrén alanyok között?

El tudjuk-e különíteni a CR+ neuronok egyes altípusait az mRNS expresszió alapján?

Megállapítható-e, hogy mely potenciális altípus lehet érintett skizofréniában?

2. Anyag és módszer

2.1. Alanyok

A kutatáshoz felhasznált agyszövetet a Holland Agybank (The Netherlands Brain Bank, Amszterdam) biztosította. A donor páciensek még életükben írásos beleegyezésüket adták agyuk kutatási célra történő felhasználására. A kutatási projekt az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével folyik (45102-2/2016/EKU).

Kísérletünkben 6 skizofrén alanyból származó minta szerepelt a DLPFC területéről, melyek a DSM III és DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3rd and 4th edition – A mentális betegségek diagnosztikai és statisztikai útmutatója, 3. és 4. kiadás) kritériumai alapján voltak diagnosztizálva. A korban- és nemben egyező kontroll agyminták olyan alanyokból származtak, melyek kórtörténetében nem szerepelt neuropszichiátriai zavar/mentális betegség (1. táblázat)

1. táblázat. CTR és SCH minták fő demográfiai adatai

Azonosító	Diagnózis	Kor	Nem	PMI (h)	Halál oka	Régió	Medikáció	Ideje (év)
S12/071	Kontroll	57	Nő	7	Urothelium karcinóma, eutanázia	BA9	-	0
S10/196	Kontroll	60	Nő	8	Vérmérgezés	BA9	-	0
S12/059	Kontroll	78	Nő	5	Tüdőgyulladás	BA9	-	0
S11/096	Kontroll	70	Nő	6	Tüdő karcinóma	BA9	-	0
S11/081	Kontroll	55	Férfi	8	Nyelőcsőrák, eutanázia	BA9	Tipikus*	0,16*
S12/002	Kontroll	55	Férfi	7	A. mes. sup trombózis	BA9	-	0
S05/161	Skizofrén	66	Nő	11	Hasnyálmirigy karcinóma	BA9	T+A	30
S10/158	Skizofrén	64	Férfi	19	Tüdőembólia	BA9	T	2
S10/360	Skizofrén	79	Nő	5	Szívelégtelenség	BA9	A	40
S12/031	Skizofrén	55	Nő	10	Öngyilkosság	BA9	T+A	10
S04/021	Skizofrén	92	Nő	8	Tüdőgyulladás	BA9	T+A	50
S10/049	Skizofrén	59	Férfi	13	Koronária elégtelenség	BA9	-	0

*Tipikus antipszichotikum alkalmazása euthanázia előtti 1 hónapban (palliatív szedáció).

2.2. Immunhisztokémia

A PFA-fixált, paraffinba ágyazott agyszövet blokkokból 6 mikrométer vastagságú koronális metszeteket készítettünk (Leica mikrotom), a kész metszeteket UltraFrost tárgylemezre szárítottuk szobahőmérsékleten.

Az immunhisztokémiai festést megelőzően leszálló alkoholsorban deparaffináltuk a metszeteket. Üveg küvettában először 2 x 5 percig xilolban, majd 1-1 percig abszolút, 96%-os, 70%-os és 50%-os alkoholban álltak a metszetek. A deparaffinálást követően az endogén peroxidáz reaktivitás minimalizálásának érdekében hidrogén-peroxid oldatban inkubáltuk a metszeteket, (20', 3%-os töménységű H₂O₂, foszfát puffer sóoldatban oldva, pH = 7,4), ezután citrát pufferben (0,01 M, pH = 6,0) történő autoklávus kezelést alkalmaztunk antigénfeltáró lépésként (10', 121 °C).

Az immunhisztokémiai jelöléshez a következő primer antitesteket használtuk: anti-calretinin (nyúl, 1:300, Chemicon, AB5054) és SMI 311 (egér, 1:500, BioLegend, 837801), 0,05% Triton™ X-100 detergenssel kevert (pH = 7,4) Tris-pufferes sóoldatban oldva. A primer antitestekkel 1 órán keresztül inkubáltuk a metszeteket. TBST-s mosást követően torna-peroxidázhoz kapcsolt szekunder antitest került a metszetekre újabb 1 órán keresztül (Envision Kit, Dako, K-5007).

A jelöléseket enzimatiskus úton, DAB segítségével hívtuk elő (Envision Kit, Dako, K-5007). A DAB szubsztrát és DAB kromogén aránya 50:1, inkubációs ideje 90 másodperc/metszet. A DAB ebben a környezetben a torna-peroxidáz enzim szubsztrátjaként funkcionál. Oxidációja során barna csapadékot képezve láthatóvá teszi az antitestekkel jelölt képleteket.

Az immunhisztokémiai kísérletekhez a Sequenza System tárgylemez befogóit és tartóit használtuk (Thermo Scientific, 72110017, 73310017). A DAB-os előhívás után desztillált vízzel állítottuk le a reakciót, majd a metszeten haematoxylin-os magfestést alkalmaztunk (20 másodperc). Ezután a metszeteket felszálló alkoholsorban (mely a leszálló alkoholsor hígításaival megegyezik, csak sorrendje fordított) víztelenítettük, végül DePeX fedőanyaggal lefedtük őket.

Minden immunhisztokémiai festés során használtunk negatív kontrollt, melyre a primer antitest nem került fel. Ezek esetében nem tapasztaltunk specifikus jelölődést.

2.3. Fluoreszcens in situ RNS-hibridizáció (RNA-scope technika)

A kísérletek zágrábi kollaborátoraink segítségével történtek (Zágrábi Egyetem, Orvostudományi Kar, Horvát Agykutatási Intézet), amelyek elvégzésében szakmai tanulmányút keretében magam is részt vettem. Az elkészült metszeteket Budapesten digitalizáltam és elemeztem. Az in situ RNS-hibridizációs próbánál a lépések közti mosáshoz RN-áz mentes vízzel készült PBS-t használtunk.

2.3.1. Előkezelés

Elsőként a fentebb leírt módon leszálló alkoholsorban deparaffináltuk a metszeteket, majd 3 x 10 perc PBS-es mosás után 10 percig inkubáltuk a metszeteket 3%-os H₂O₂ oldatban, szobahőmérsékleten. Ezt 3 x 10 perc mosás után a második, antigén feltárási előkezelő lépés követte, melynek során melegítőlapon inkubáltuk a metszeteket vízben oldott Target Retrieval reagenssekkel fedve (RNAscope Fluorescent Multiplex Reagent Kit, Pretreatment Kit, ACDBio, 320850). A metszeteket 10 percig tartottuk 100 fokon, majd 3 x 5 perc PBS-es mosás és 2 x 2 perc abszolút alkoholos mosás után hagytuk őket szobahőmérsékleten száradni. Száradás után a tárgylemezen Immedge™ hidrofób tollal körbehatároltuk a szövetet. A hidrofób barriert 40 percig hagytuk száradni szobahőmérsékleten. Száradás után a harmadik előkezelési lépés során Protease plus reagenssel inkubáltuk a metszeteket 30 percig 40 fokon (RNAscope Fluorescent Multiplex Reagent Kit, Pretreatment Kit, ACDBio, 320850), speciális termosztátban (HybEZ hybridization oven, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA), amely megbízhatóan tartja a hőmérsékletet. Ezt 3 x 5 perc PBS-es mosás követte.

2.3.2. Hibridizáció

A target mRNS komplementer szekvenciáit tartalmazó hibridizációs próbaelegyet a protokollnak megfelelően használat előtt 10 percig 40 fokon inkubáltuk, majd hűlés után feltöltöttük az eleggyel a tárgylemez hidrofób anyaggal határolt részeit. A kísérletben két mRNS próbát alkalmaztunk: humán kortikotropin-releasing hormon (CRH, ACDBio, 475211, C1) és humán vazointesztinális peptid (VIP, ACDBio, 452751-C2, C2) ellen. A protokoll felépítése miatt az egyik próba (C1) már gyárilag hígítva érkezik. A másikat (C2) 1:50 arányban kell hígítani a C1 oldatában, tehát ennek megfelelően jártunk el. A hibridizációs próbaelegy felhelyezése után a tárgylemezeket újra a 40 fokos termosztátba helyeztük, ahol 2 órán keresztül inkubáltuk őket. Az idő letelte után 2 perces PBS-es mosást alkalmaztunk.

2.3.3. Amplifikáció, blokkolás és fluoreszcens jelölés

Az amplifikáló és blokkoló reagenseket (melyek készen rendelkezésre állnak a kitben) a protokoll utasításait követve jóval használat előtt szobahőmérsékletre helyeztük. A továbbiakban a mosáshoz 0.05 % Tween 20 detergenssel kevert PBS-t használtunk.

A hibridizáció után három, egymásra épülő amplifikáló lépés következett, melynek során az első amplifikáló elegy a specifikus célpróbán lévő preamplifikáló szekvenciával hibridizál (30'), a következő az elsővel (30'), a harmadik pedig a másodikkal (15'), ezáltal erőteljesen felerősítve a specifikus jelet. A lépések közt 2 perces mosást alkalmaztunk. Ez a target-specifikus amplifikáció az RNA-scope technika (*Wang és mtsai 2012*) újdonsága és erőssége. Az amplifikáló lépések az előzőekhez hasonlóan 40 fokos termosztátban mentek végbe.

Az utolsó amplifikáló lépés alatt szobahőmérsékletre helyeztük a hibridizált próbák detektálásához szükséges torna-peroxidáz enzimet és a fluoreszcens festékanyagokat (HRP, Cyanin 3, Cyanin 5; Perkin Elmer, TSA Plus Systems). A C1 és C2 mRNS próbák előhívásához először specifikus tormaperoxidáz oldatban inkubáltuk a metszeteket, (30'), majd a kitben található TSA Plus elegyben 1:50 arányban oldott fluorofórban (TSA Plus, 30'), végül 15 percig HRP-blokkoló szérumban. Ezek az inkubációs lépések mind 40 fokos termosztátban történtek, először a C1 próbára specifikusan, (C1-HRP, Cy5-TSA Plus, Blocking Reagent), majd a C2 próbára specifikusan (C2-HRP, Cy3-TSA Plus, Blocking Reagent), a lépések közt 1 x 2 perces mosással. Ezek a lépések biztosítják a specifikus jelölés vizualizálását.

2.3.4. RNAscope immunhisztokémia

A hibridizációs próba fluoreszcens jelölését követően egyszerű immunhisztokémiai festést végeztünk el a metszeteken. Alapos PBS-es mosást követően a metszeteket 20 percen keresztül 0.3 %-os Tritonnal kevert PBS-ben oldott normál szamar szérummal (NDS, 1:100, Sigma) blokkoltuk, majd ugyanebben 1:2000 arányban oldott anti-calretinin primer antitestet helyeztünk a metszetekre (nyúl, 1:2000, Sigma AB5054) másnap reggelig, majd 3 x 10 perc PBS-es mosás után a PBS-ben hígított szekunder antitesttel inkubáltuk őket 2 órán keresztül (Alexa 488, 1:1000, Invitrogen). Ezt követően az utolsó 3 x 10 perc mosás után a tárgylemezeket lefedtük DAPI magfestéket tartalmazó VectaShield fedőanyaggal (Vector Laboratories, VectaShield® Hardset™ Antifade Mounting Medium with DAPI – (H-1500).

2.4. Digitális képelemzés, sejtszámlálás

Az immunhisztokémiai módszerrel megfestett metszeteket metszetszkennerekben digitalizáltuk (Aperio ScanScope AT Turbo, Leica Biosystems) 20-szoros nagyításon. A kiválasztott régiókat (~ 2x1 milliméteres, az összes réteget tartalmazó kérgi kolumnákat) az ImageScope képfeldolgozó programban (Aperio, v11.2.0.780) jelöltük ki. Alanyonként egy metszeten kijelölt három kolumnában manuális sejtszámlálás során rögzítettük minden specifikusan jelölt sejt leghosszabb átmérőjét. A statisztikai analízishez a 3 kolumna átlagolt értékeit használtuk fel. A képeket random kódoltuk, így a sejtszámlálást végző kutatók nem tudták, hogy az adott metszet skizofrén vagy kontroll mintából származik-e.

A hibridizációs próbával jelölt metszeteket a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet konfokális mikroszkópjával (Zeiss LSM780) fényképeztem. A gerjesztő lézereket a következő hullámhosszokon használtam: : 493 – 552 nm (Alexa 488), 552 – 633 nm (Cy3), 633 – 725 nm (Cy5). A sejtszámoláshoz 7x7-9x9 képkockás csempe (tile) scaneket készítettem, a CR+CRH+VIP+ sejteket az Aperio ImageScope programban annotáltam.

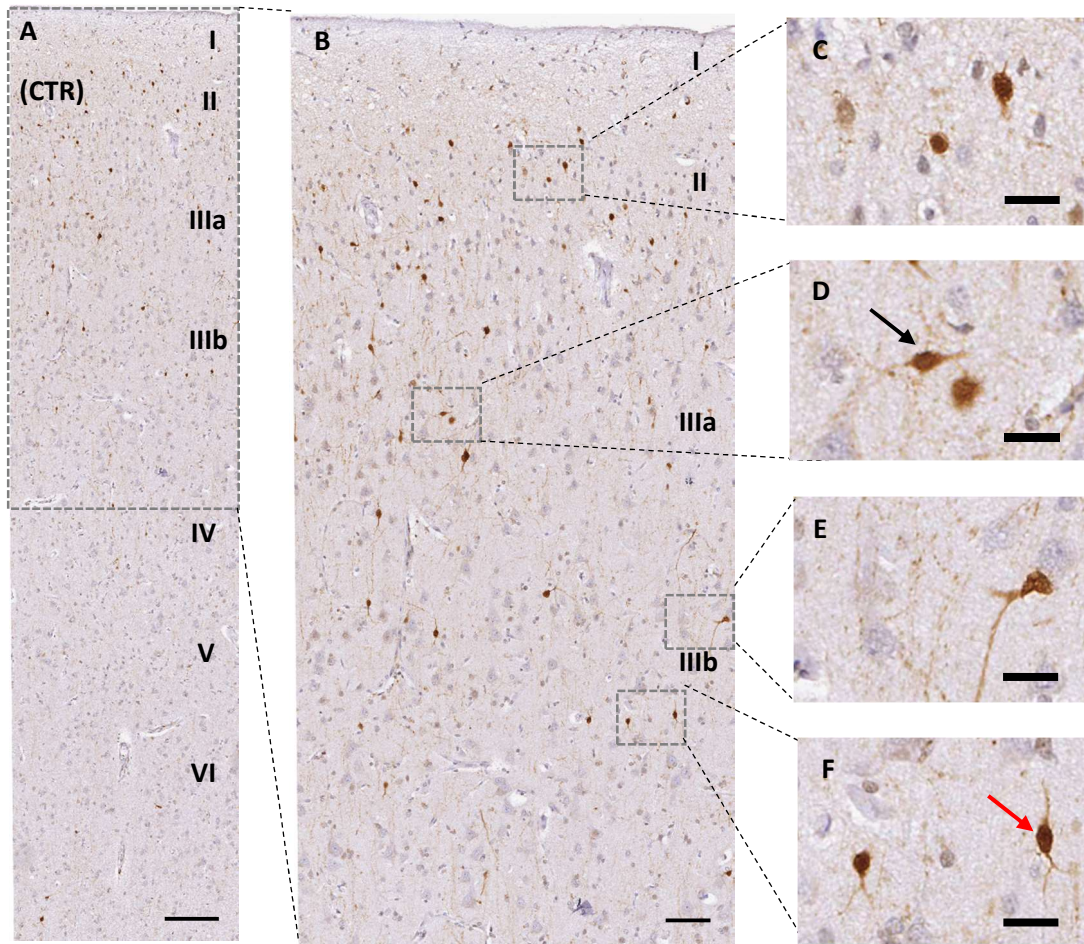
2.5. Leíró statisztika, statisztikai analízis

A statisztikai analízist az R 3.6.2. szoftverrel végeztem. A leíró statisztikát a ggplot csomaggal készítettem. Az adatokra általános lineáris kevert modellt (glmm) illesztettem (nlme csomag, lme függvény) random faktoral (ID), ahol a diagnózis szubjektumok közötti, a kérgi réteg szubjektumon belüli faktor volt. A célváltozó a neurondenzitás, a magyarázó változók a diagnózis és a kérgi réteg száma voltak; interakciójuk nem volt szignifikáns, ezért a modelltől kivettem. A modelldiagnosztikai ábrán a reziduumok szórása nem volt homogén, ezért logaritmizáltam a célváltozót. Ezután már elfogadható modelldiagnosztikát kaptam. A két csoport között az egyes rétegek közötti különbséget kontrasztmátrixokkal vizsgáltam (multcomp csomag, glht függvény). Az neurondenzitás és a PMI illetve a kor közötti potenciális összefüggést Pearson-féle korreláció számolásával vizsgáltam, majd a p-értékeket Bonferroni módszerrel korrigáltam.

3. Eredmények

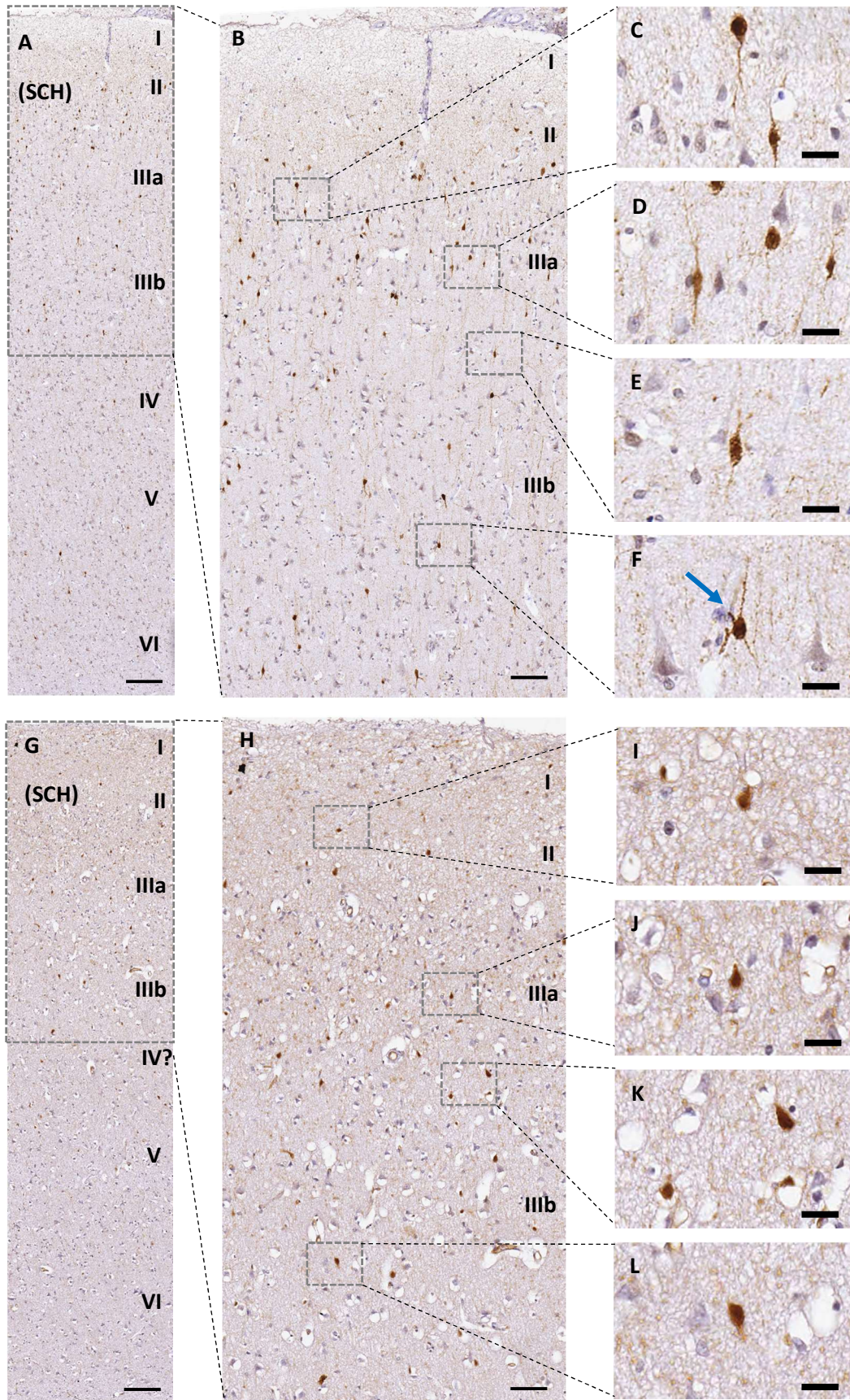
3.1. Kérgi CR+ interneuronok vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel

3.1.1. Kérgi CR+ neuronok kvalitatív elemzése



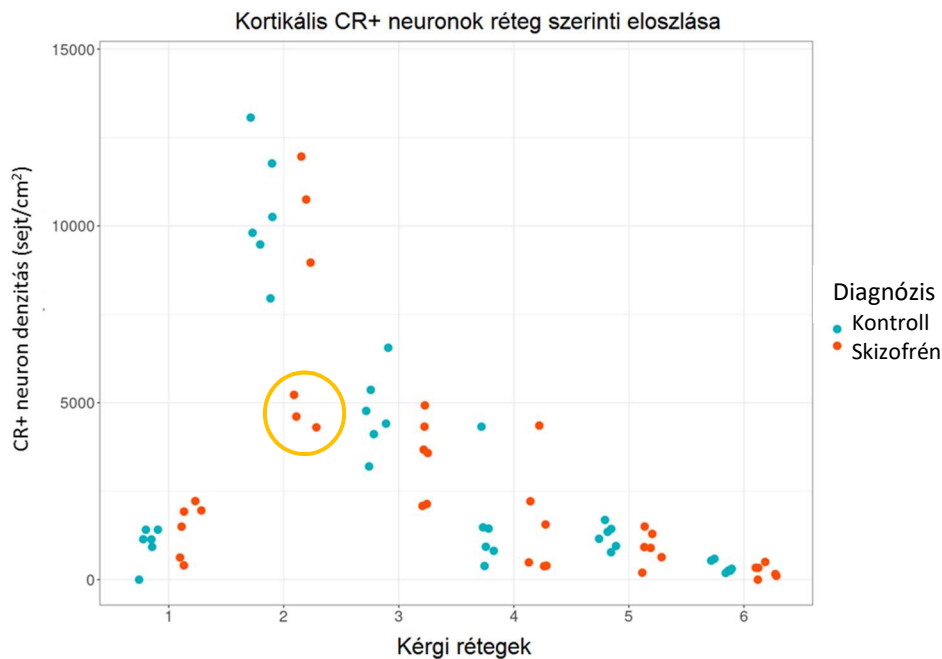
3. ábra. Balról jobbra: kontroll alany DLPFC régiójából származó kérgi kolumna (A, 5x), ugyanezen kolumna felső rétegei (B, 10x), és a jellegzetes morfológiákat bemutató sejtek. A III. rétegben gyakori volt a bipoláris (D, fekete nyíl; F, piros nyíl) morfológia, melyeknek egy része horizontális orientációt mutatott (D, fekete nyíl). A skála balról jobbra haladva: 300 μ m, 100 μ m, 20 μ m.

A kérgi rétegek azonosításához az egyes esetek megfelelő Nissl-és SMI 311-festett metszeteit használtuk. Metszeteinken a szakirodalmi adatokkal megegyezően a II. és III. rétegekben fordultak elő legnagyobb mennyiségben a CR+ neuronok, a mélyebb rétegekben csak elvétve voltak jelen (3. ábra). Szintén egyezik az irodalmi adatokkal, hogy igen gyakori volt a bipoláris (3. ábra, D - fekete, F) vagy kettős csokor jellegű morfológia (3. ábra, E), de előfordult multipoláris (4. ábra, kék nyíl) is. A 4. ábra a skizofrén csoporton belül megfigyelt két alcsoportot mutatja be: egy kontrollhoz hasonló CR+ denzitást mutató, ép nyúlványokkal rendelkező csoportot (4. ábra, A-F, N=3) és egy csökkent CR+ denzitású, redukált vagy kevésbé jelölődő nyúlványú csoportot (4. ábra, G-L, N=3).



4. ábra. Változatlan CR+ denzitást mutató skizofrén minta (A-F) összehasonlítása jelentősen csökkent CR+ denzitású skizofrén mintával (G-L). A skála balról jobbra: 300 μm , 100 μm , 20 μm .

3.1.2. Kérgi CR+ interneuronok denzitása



5 ábra. Kérgi CR+ neuronok réteg szerinti denzitásértékeit mutató scatterplot. Összeségében a CTR és SCH csoport értékei közt egyik rétegben sem volt szignifikáns eltérés.

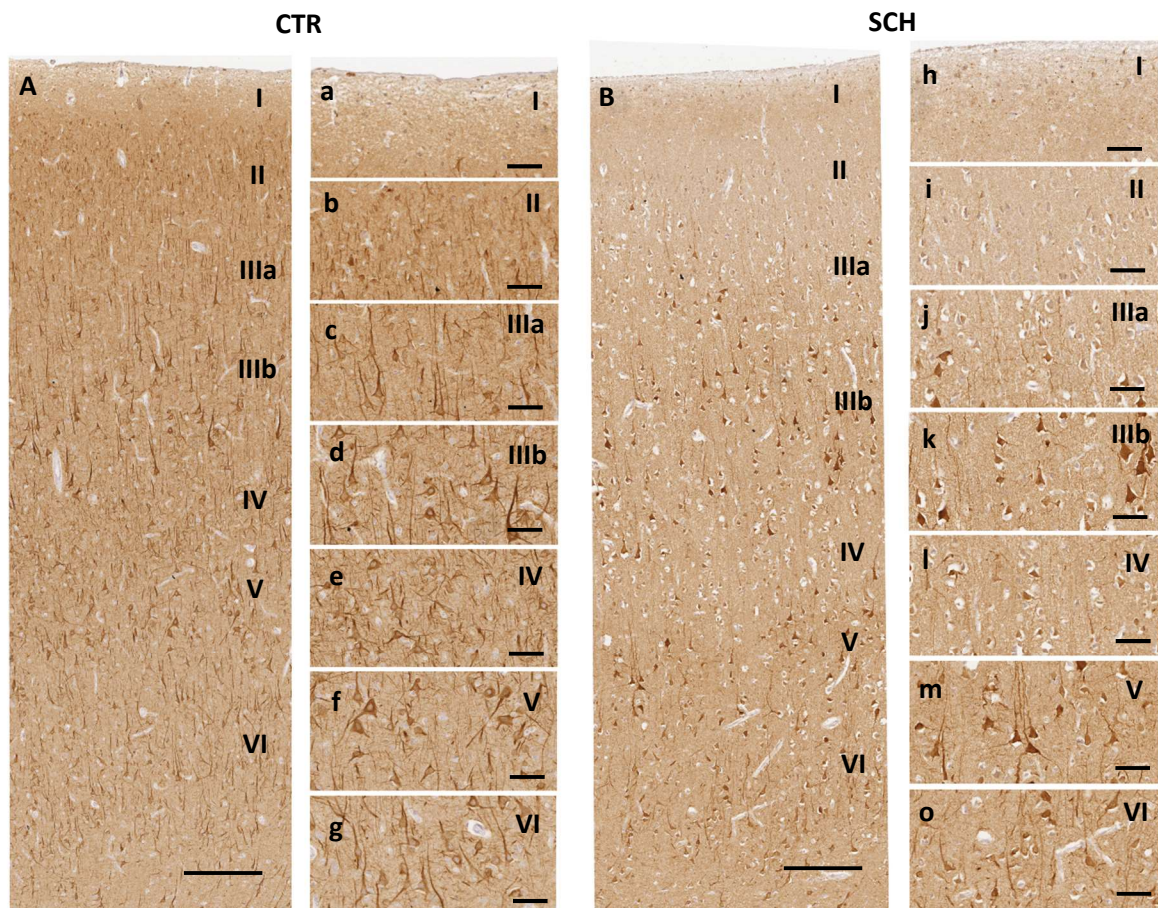
A manuális sejtszámolás során metszetenként 3 kérgi kolumnában összesen 2192 db pozitív sejtet mértünk. A kontroll minták teljes kolumnára vonatkozó denzitásértéke $2185,28 \pm 318,52$ sejt/cm² (átlag \pm SD), a skizofrén csoportban ez az érték $2178,56 \pm 685,99$ sejt/cm² (átlag \pm SD). A sejtszámolás eredményei alapján látható, hogy mintáink esetében a CR+ neuronok a II. rétegben fordultak elő legnagyobb sűrűségben (2. Táblázat). A sejtszámok és az egyes rétegek területének (cm²) elosztásával kapott denzitás adatokra általános lineáris kevert modellt illeszttem. A kontrollhoz képest a skizofrén diagnózisnak 5%-os szignifikanciaszint mellett nem volt szignifikáns hatása ($p = 0,2566$), és egyik réteg denzitásértékeiben sem különbözött szignifikánsan a két csoport. Ezt a kérdést kontrasztmátrixok segítségével vizsgáltam. A leíró statisztika alapján a II. réteg látszott leginkább érintettnek (5. ábra), de ez sem volt szignifikáns ($p = 0,229$). Emögött részben az állhat, hogy a II. rétegben szemmel láthatóan 2 alcsoportra oszlik a skizofrén csoport: az egyik a kontroll értékek tartományába esik, a másik azonban jóval alacsonyabb értékekkel bír (5. ábra, sárga kör). A kontroll tartományba eső alcsoport átlagos denzitása a II. rétegben $10556,7 \pm 1508,5$ (átlag \pm SD), ehhez képest a csökkent alcsoport átlagos denzitása ebben $4712,9 \pm 467,5$ (átlag \pm SD), ami több, mint 50%-os különbség. Erre a megfigyelésre a diszkusszióban visszatérek.

2. Táblázat. CR+ neuronok réteg szerinti denzitása a CTR és SCH csoportokban (átlag ± SD, neuron/cm²).

Kérgi réteg	CTR	SCH
I.	1004,93 ± 525,77	1438,23 ± 755,43
II.	10385,82 ± 1798,99	7634,828 ± 3353,39
III.	4735,97 ± 1145,45	3454,99 ± 1148,64
IV.	1562,94 ± 1413,74	1565,39 ± 1558,55
V.	1225,92 ± 333,39	907,55 ± 465,13
VI.	355,79 ± 166,77	239,33 ± 183,25

3.2. Kérgi SMI 311+ neuronok vizsgálata immunhisztokémiai módszerrel

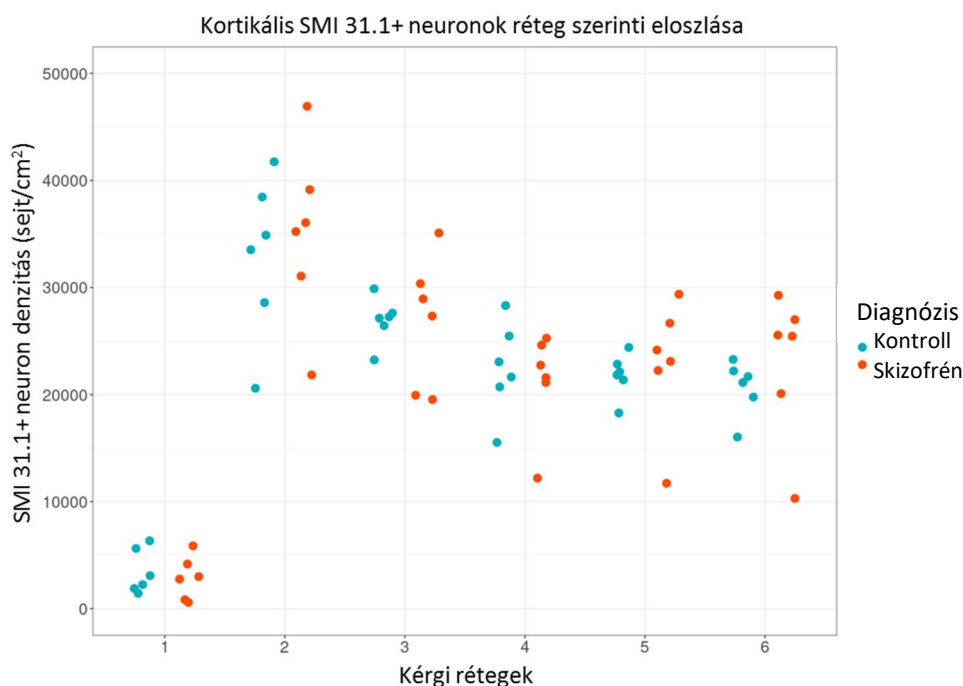
3.2.1. Kvalitatív elemzés



6. ábra. Bal: kontroll alanyból származó kérgi kolumna SMI 311 markerrel jelölve (A), mellette az egyes rétegek nagyított részleteivel (a-g). Jobb: skizofrén alanyból származó kérgi kolumna (B), mellette az egyes rétegek nagyított részleteivel (h-o). A skála a teljes kolumnák esetében 300 µm, a nagyított részleteken 50 µm.

Az SMI 311 marker igen látványosan jelölte a kérgi piramissejtek szómáját és nyúlványait. A skizofrén és kontroll csoportok közt morfológiai, vagy szembetűnő mintázatbeli különbséget nem találtunk.

3.2.2. Kérgi SMI 311+ neuronok denzitása



7. ábra. Kortikális SMI 311+ neuronok rétegek szerinti denzitás értékeit mutató scatterplot.

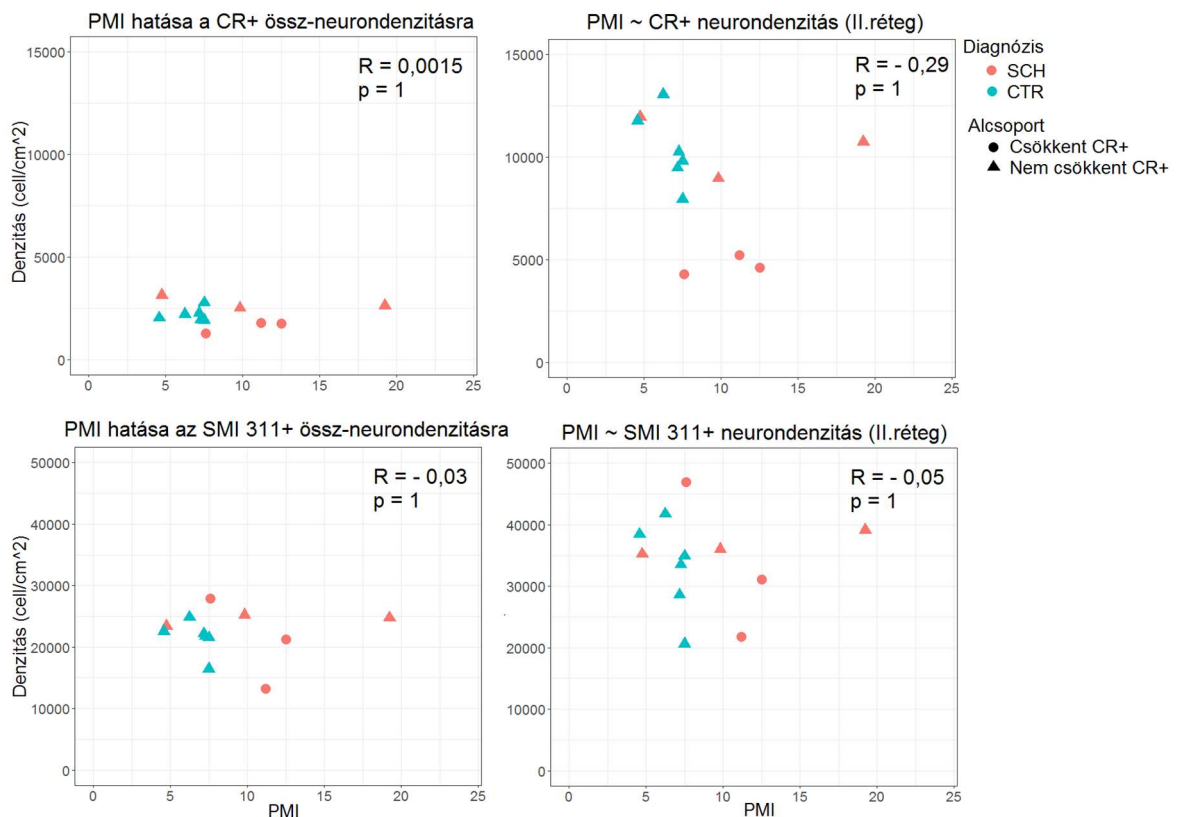
A manuális sejtszámolás során összesen 41310 SMI 311+ neuront mértünk. Az SMI 311+ sejt populáció denzitásában a két diagnosztikai csoport közt nem találtunk szignifikáns különbséget egyik kérgi rétegben sem (3. Táblázat), a diagnózisnak nem volt szignifikáns hatása a denzitás értékekre ($p = 0.8$).

3. Táblázat. SMI 311+ neuronok réteg szerinti denzitása a kontroll és skizofrén csoportokban (átlag \pm SD, neuron/cm²).

Kérgi réteg	CTR	SCH
I.	3439,39 \pm 2057,93	2871,77 \pm 2002,32
II.	32969,51 \pm 7530,20	35045,32 \pm 8359,95
III.	26929,02 \pm 2153,89	26868,14 \pm 6103,32
IV.	22457,38 \pm 4370,54	21259,05 \pm 4730,23
V.	21808,92 \pm 2026,64	22879,95 \pm 6053,21
VI.	20683,95 \pm 2557,68	22945,24 \pm 6893,43

3.3. A PMI vagy kor esetleges hatása a neuronenzitásra

Igen releváns kérdés, hogy vajon a megfigyelt különbségek és a nagy variancia háttérben nem állhatnak-e a minták különböző tulajdonságai. A Pearson-féle korreláció vizsgálata a CR+, SMI 311+ neuronenzitások és a PMI intervallum értékei közt minden esetben nem szignifikáns, gyenge negatív korrelációt mutatott (korrigált p-értékek: 1, 8. ábra). A CR+ neuronenzitások az életkorral szintén nem szignifikáns, gyenge negatív korrelációt mutattak (korrigált p-értékek: 1). Az SMI 311+ neuronenzitások az életkorral nem szignifikáns, gyenge pozitív korrelációt mutattak (korrigált p-értékek > 0.2). Az összes kérgi rétegre vonatkozó scatterplot és a hozzá tartozó korrelációs vizsgálat eredménye a mellékletben található.

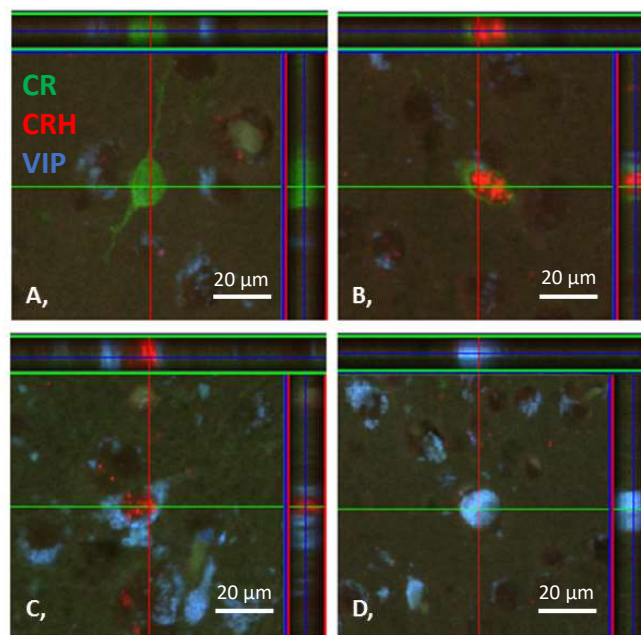


8. ábra. PMI és neuronenzitás kapcsolatát bemutató scatterplotok. Egyik összehasonlítás sem mutatott erős korrelációt, az összehasonlítások adjusztált p-értékek erősen nemszignifikánsak voltak ($p = 1$).

3.4. CR+ alpopulációk feltérképezése RNA-scope módszerrel

3.4.1 CR+ neuron alpopulációk feltérképezése

Az expressziós hőtérkép alapján (Hodge és mtsai 2019) várt sejtpopulációk a következők voltak: CR+CRH-VIP-, CR+CRH+VIP-, CR+CRH-VIP+, valamint CR+CRH+VIP+. A metszetek kvalitatív analízise során az összes várt alpopuláció megtalálható volt. A csak CR+ neuron populáció esetében (9. ábra, A), amely sem VIP, sem CRH mRNS-t nem tartalmazott, nagymértékű variabilitást tapasztaltunk az alanyok között. A CR+CRH+VIP- sejtek csak elvétve fordultak elő (9. ábra, B). A tripla jelölt, CR+CRH+VIP+ sejtek fordultak elő legnagyobb mennyiségben. Igen jellemző volt, hogy a CRH mRNS a sejtmagban jelölődött, míg a CR és a VIP a sejt citoplazmatikus részére lokalizálódott (9. ábra, C). A CR+CRH-VIP+ sejtekről sokszor nehéz volt megállapítani, hogy valóban nem tartalmaznak-e minimális mennyiségű CRH mRNS-t (9. ábra, D).

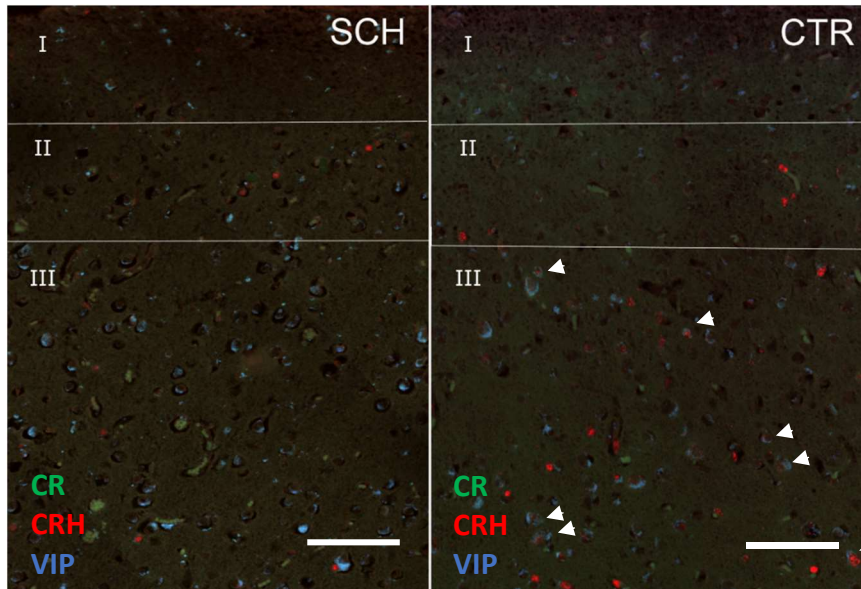


9. ábra A négy CR+ alpopuláció a hozzájuk tartozó ortogonális nézettel. A skála 20 mikrométert reprezentál.

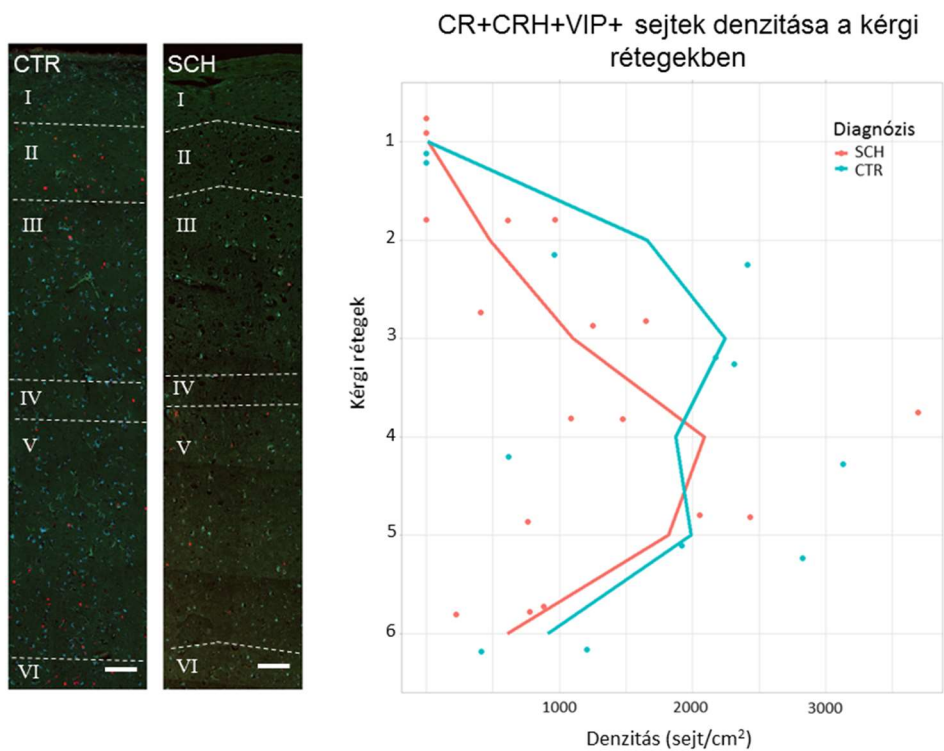
3.4.2. CR+CRH+VIP+ sejtek a kontroll és skizofrén csoportban

A hibridizáció eredményeképp megjelenő pontok (ld. 9. ábra, D) 1-1 transzkriptnek felelnek meg. A kutatás jelen stádiumában még nem transzkript, csak sejtszintű felmérést végeztem a CR+CRH+VIP+ sejtek számát illetően, ugyanis a kvalitatív analízis során úgy tapasztaltuk,

hogy ez a populáció mutathat leginkább különbséget a CTR és a SCH csoportok között. (10.ábra).



10. ábra. Kontroll és skizofrén kérgi kolumnák 1-3 rétege. A kvalitatív analízis alapján a CR+CRH+VIP+ populációt (fehér nyilak) a II-III. rétegben sok esetben minimális számban találtuk a skizofrén csoportban. A skála 100 μm -t reprezentál.



11. ábra. Előzetes felmérés a CR+CRH+VIP+ populációról 2 kontroll és 2 skizofrén alanyból. A két skizofrén a csökkent CR+ denzitást mutató csoportból való. A skála 100 μm -t reprezentál.

Kutatásunk következő stádiumában a hibridizációs próba kvantitatív analízisét is tervezzük, korreláltatva az immunhisztokémiai eredményekkel. Ehhez azonban standard digitalizálási és számolási módszer kidolgozása szükséges. Előzetes eredményeim 2 skizofrén és 2 kontroll minta alapján az immunhisztokémiai eredmények segítségével megfigyelt mintázatot támogatják (11. ábra).

4. Diszkusszió

Kísérletünkben immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk a CR+ és SMI 311+ neuronok réteg szerinti denzitását a DLPFC területén skizofréniaiban. A diagnosztikus csoportok közt nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált sejtpopulációk réteg szerinti- és össz-kortikális denzitásában. Azonban a II. rétegben a skizofrén minták CR+ denzitásértékei látványosan két alcsoportra különültek el. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a köztudomásúan heterogén betegségcsoporton belül létezhet egy, a kortikális 2-es réteg szerkezetét érintő altípus.

A CR+ interneuronok denzitását vizsgáló kutatások eddig nem találtak szignifikáns különbséget skizofréniaiban a DLPFC területén (Daviss 1995, Woo 1997, Tooney 2004, , Reynolds és Beasley 2001, Beasley és mtsai 2002, Hashimoto 2003, Oh és mtsai 2012). Kísérletünkben a CR+ sejtpopuláció a skizofrén minták egyik felében csökkent, másik felében a kontrollhoz hasonló denzitást mutatott, mely jelenség a korrelációs tesztek szerint nem állt összefüggésben a minták PMI értékével. A két SCH alcsoport jelenlétét a medikációs kórtörténet sem magyarázta: a csökkent CR+ denzitás két hosszán medikált páciensre és egy szociálisan izolált, medikáció-mentes betegre volt jellemző. A megfigyelt két alcsoport sejtszintű fenotípusok jelenlétét sugallja skizofréniaiban. Ezt a hipotézist nem csak a szakdolgozatban nem részletezett, további eredményeink támogatják (úm. parvalbumin-, calbindin-immunpozitív neuronok a DLPFC-ben), hanem egy átfogó transzkriptomikai metaanalízis is (Bowen et al, 2019). Ebben a tanulmányban több, mint 200 skizofrén minta egysejt-szintű mRNS szekvenálós adata alapján két „skizofrénia típust” különítettek el: egy, a kontrollhoz hasonló génexpressziós profilt mutatót, és egy, a kontrolltól nagy mértékben eltérő csoportot. A két transzkriptomikus alcsoport közt eltérően expresszálódó gének közt szerepel például a VIP, amely – mivel a humán CR+ neuronok nagy része kifejezi (Cauli 1994, Hodge és mtsai 2019, Krienen és mtsai 2019) - a CR+ neuronok érintettségét támogatja.

A fő interneuron populációk érintettségét az elmúlt két évtizedben folyamatosan kutatták, (Beasley és Reynolds 1997, Reynolds és Beasley 2001, Reynolds és mtsai 2002, Beasley és mtsai

2002, Woo 1997, Tooney és Cahl 2004, Oh és mtsai 2012), az eredmények azonban nem konzekvensek. Beasley és Reynolds 1997 és 2002 közt négy egymást követő munkában írta le a PV+ sejtek denzitásának csökkenését a prefrontális kortexben (Beasley és Reynolds 1997, Reynolds és Beasley 2001, Reynolds és mtsai 2002, Beasley és mtsai 2002), ám eredményeiket független munkacsoportok nem tudták reprodukálni (Woo 1997, Tooney és Cahl 2004, Hashimoto és mtsai 2003). Egyes kutatások nem a neuronok denzitásában, hanem a PV+ kosársejteken végződő glutamáterg axon terminálisok számában (Lewis és mtsai 2001), illetve a PV+ neuronok GABA szintézisében találtak negatív különbséget a kontroll csoporthoz képest (Lewis és Volk 2005). Ezek az eredmények a PV+ sejtek diszfunkcióját feltételezik a csökkent glutamáterg bemenet miatt. A CB+ neuronok denzitásának növekedését (Daviss és mtsai 1995), csökkenését (Beasley és mtsai 2002) és a kontrollhoz képest nem szignifikánsan eltérő szintjét is (Reynolds és mtsai 2002) leírták a prefrontális kéregben.

A kalciumkötő fehérjéket tartalmazó (úm. calbindin, calretinin, parvalbumin) interneuronoknak korai munkák bizonyos neuroprotektív szerepét feltételezték (Lukas és Jones 1994, Möckel és Fisher 1994). Ez azon alapult, hogy a jobb intracelluláris kalciumkötő képesség védhet a citotoxikus magas kalciumszint ellen. Az elméletet vizsgáló kísérletekben – amelyben patkány neuronális sejttenyészetét használták - a CR+ neuronok egy része kevésbé degenerálódott olyan faktorok hatására, mint a glutamáterg stressz (Möckel és Fisher 1994) vagy toxikus kalcium szint (Lukas és Jones 1994), amelyek más neuronokat elpusztítottak. Mindemellett már Möckel kísérletében látszódott, hogy a jelenség igen komplex; nem mindegy például, hogy a kalciumstressz indukciója milyen receptorokon keresztül történik. Szintén patkányon végzett kutatások később kimutatták, hogy a CR+ neuronok szenzitivitása egy agyterületen belül is variábilis, ami arra utal, hogy a környező agyszövet kapillárisainak átjárhatósága fontosabb faktor lehet, mint maga a calretinin-tartalom (Jászai és mtsai 1998). Későbbi munkák a CR+ neuronokat más kalciumkötő fehérjét tartalmazó neuronokhoz képest érzékenyebbnek találták az epilepsziás rohamot előidéző kainsavra és metabolikus stresszre (Lee és mtsai 2002, Hipólito és mtsai 2013). További in vitro és humán iPSC sejttenyészetes kísérletek szükségesek annak megállapítására, hogy biztosítanak-e a nagyobb ellenálló képességet a kalciumkötő fehérjék, és lehet-e ennek köze a skizofréniában megfigyelt mintázatokhoz.

Az inkonzisztens eredmények mögött állhatnak módszertani tényezők; például az egyes antitestek különböző hatékonysága (poliklonális vs monoklonális), vagy a 2D és 3D sejtszámolási stratégiák korlátai és torzításai – különösen az agyszövet regionális heterogenitásának fényében. A mintaelemszám sok esetben korlátozó tényezője a

neuropszichiátriai zavarok kutatásának. Skizofrén alanyokból származó, kutatható agyszövet világszerte kb. 200 esetből áll rendelkezésre. A fent említett vizsgálatok egy részét szakdolgozatokhoz hasonlóan alacsony mintaelemszámmal végezték (*Daviss 1995 N=5, Tooney 2004 N=6*), de többségük elérte az $N=10$ feletti elemszámot (*Beasley és Reynolds 1997, Reynolds és Beasley 2001, Reynolds és mtsai 2002, Beasley és mtsai 2002, Woo 1997, Hashimoto és mtsai 2003, Oh 2012*). A neuronenzitást vizsgáló kutatások másik korlátoló tényezője a szövetfeldolgozás közben bekövetkező térfogatváltozás (*Thune és mtsai 2001, Gundersen 1992*); a különböző fixálási, beágyazási és metszési technikákkal elért eredmények egymással közvetlenül nem vethetők össze. A potenciális celluláris mintázatok feltárását a skizofrén páciensek közt meglévő molekuláris szintű variancia is hátráltathatja. A viszonylag alacsony mintaelemszámú mérések nagy szórású eredményét átlagolva szinte biztosan információt veszünk; a heterogén mintázat összerosódik.

Eredményeink alapján az SMI 311+ serkentő sejtpopuláció denzitása nem változott szignifikánsan skizofréniában, és a csoportok közt vagy a csoportokon belül mintázat sem volt felismerhető. Az SMI 311 a nem-foszforilált neurofilamentum közepes és nehéz láncát jelöli (NEFM, NEFH). A rendelkezésre álló transzkriptomikai adatok alapján (*Hodge és mtsai 2019*) a serkentő sejtek legnagyobb részén kívül a PV+ interneuron populáció kb. 70%-át is jelöli. Tudomásunk szerint azonban jelenleg nincs kereskedelmi forgalomban hozzáférhető jobb általános excitátoros neuronmarker. Kutatásunkban az SMI 311+ sejteknek sem össz-kérgi, sem réteg szerinti denzitása nem tért el szignifikánsan skizofréniában a DLPFC területén. Korábbi kutatások sem találtak változást a prefrontális kérgi piramisisejtek vagy neurofilamentum-marker pozitív sejtek denzitásában (*Akbarian és mtsai 1995, Miguel-Hidalgo és mtsai, Cullen és mtsai 2006*). Megfigyelték azonban a prefrontális kéreg piramisisejtjeinek méret- (*Rajkowska és mtsai 1998*) és dendrittüske-sűrűségének csökkenését (*Garey és mtsai 1998, Glantz és Lewis 2000, Konopaske és mtsai 2017*), amely jelenségeket a szürkeállomány-vékonyodás jelenségével és a redukált neuropil hipotézissel hoztak összefüggésbe (*Feinberg 1989, Onwordi és mtsai 2020*). Leírták emellett a középső (II-IV) rétegbeli piramisisejteket szabályzó csillársejtek szinaptikus denzitásának csökkenését is skizofréniában (*Pierri és mtsai 1999*), amely az interneuron elméletet támogatja.

A dendrittüske-sűrűség és a szinaptikus denzitás csökkenése fejlődéstani kérdéseket vet fel a neuropszichiátriai zavarok kapcsán. Az autizmus spektrum zavarról (ASD) már szinte biztosan tudjuk, hogy a kiváltó okok egy része a méhen belüli és/vagy a korai posztnatális fejlődés időszakára tehető (*Willsey és mtsai 2013, Mariani és mtsai 2015*). Az ASD és a SCH mind

tüneti, mind genetikai és molekuláris szinten mutat hasonlóságokat (*Velthorst és mtsai 2018*), és a skizofrénia kutatásának igen fontos aspektusa a fejlődés közben bekövetkező változások feltárása. Ehhez elengedhetetlen az indukált pluripotens őssejt technika, amely segítségével a páciensek testi sejtjeivel genetikailag azonos sejtek tenyésztése válik lehetővé. Így a sejtek fejlődése sokszor ismételtető, kontrollált környezetben folytatott kísérletekben reprodukálható. A sejtek közti kapcsolatok esetleges fejlődési rendellenességei organoid modellekben vizsgálhatóak (*Stachowiak és mtsai 2017*).

Eredményeinkkel kapcsolatban alapvető jelentőségű Benes és munkatársainak 1991-es munkája. A szerzők Nissl-alapú össz-neurondenzitás mérést végeztek skizofrén és kontroll esetekből származó prefrontális kérgi mintákon. Eredményeik alapján a skizofrén csoportban szignifikánsan csökkent a II-es rétegben található „kis méretű neuronok” denzitása, amely nagyrészt megfeleltethető a nem-piramidális sejteknek (interneuronoknak). Kutatásunk során hasonló mintázatot találtunk a II. kérgi rétegben. A megfigyelt alcsoportok jelenléte – Bowen és mtsai (2019) hasonló mintázatot feltáró eredményeinek fényében – igen fontos lehet. A sejtszintű mintázatok azonosítása elengedhetetlen a skizofrénia fenotípusos heterogenitásának genetikai, molekuláris és celluláris szinten való megértéséhez. A jövőben célunk post mortem kutatásainkat egysejt-szintű RNS szekvenálással kiegészíteni, majd a több technikával megállapított, in situ hibridizációval validált, leginkább érintettnek tűnő csoportot iPSC módszerrel tenyésztetni. Ezzel a multidiszciplináris megközelítéssel sikerülhet megtalálni a skizofrénia celluláris, receptoriális és molekuláris biomarkereit és talán nem csak sejt, hanem rendszer szinten is közelebb kerülni a heterogén tünetek megértéséhez.

5. Összefoglalás

Az eddigi kutatások alapján az excitátoros/inhibitoros egyensúly felborulása több neuropszichiátriai zavarban – például skizofréniában és autizmus spektrum zavarban – kulcsjelenség. Ennek nyomán számos vizsgálat célozta a prefrontális kéreg neuronális összetételét skizofréniában, ám az eredmények nem konzisztensek, ami a neuropatológiai biomarkerek validálását és alkalmazását hátráltatja. Kutatási projektünkben ezért célunk újravizsgálni ezt a kérdést a prefrontális kortex fő neuronpopulációit vizsgálva. Szakdolgozatom keretében a calretinin immunpozitív (CR+) interneuronok és az SMI 311 immunpozitív (SMI 311+) kérgi serkentő sejtek réteg szerinti eloszlását mutatom be a dorzolaterális prefrontális kéreg területén.

Kutatásunkhoz a Holland Agybank biztosított 6 skizofrén és 6 korban-és nemben egyeztetett kontroll páciensből származó mintát. Immunhisztokémiai módszerrel festett majd digitalizált metszeteken annotáltuk az immunpozitív neuronokat. Publikus transzkriptomikai adatok szerint a CR+ interneuronok bizonyos alpopulációi elkülöníthetők a CRH és VIP expressziója alapján, ezért a következő lépésben in situ RNS hibridizációt alkalmaztunk az említett alcsoportok feltérképezésére.

Egyik vizsgált sejtpopuláció denzitásában sem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két diagnosztikus csoport között. A II. kérgi rétegben azonban a CR+ sejtek tekintetében a skizofrén minták szemmel láthatóan két alcsoportra különültek: egy kontroll értékek tartományába eső, és egy jelentősen csökkent CR+ denzitású alcsoportra. Fluoreszcens in situ mRNS hibridizációval sikerült azonosítanunk 4 különböző transzkriptomikai profillal rendelkező CR+ altípust. Előzetes felméréseink alapján a CR+CRH+VIP+ alcsoport lehet a leginkább érintett skizofréniában.

A CR+ denzitás tekintetében megfigyelt 2 SCH alcsoport recens transzkriptomikai eredmények fényében igen fontos lehet, és további, nagyobb mintaelemszámú fehérje- és mRNS szintű vizsgálatok szükségességét jelzi az esetleges molekuláris fenotípusok feltárására. A skizofréria bonyolult patomechanizmusa és heterogén megjelenése rendkívüli kihívást jelent a post mortem humán kutatás számára. Ám az egyre fejlődő iPSC, transzkriptomikai, bioinformatikai és proteomikai módszereket klasszikus metodikákkal ötvözve lehetővé válik az érintett sejtpopulációk azonosítása és validálása. A feltárt sejtszintű mintázatokat a kórtörténettel korreláltatva fény derülhet olyan specifikus jelenségekre, melyek új farmakológiai megközelítésekhez, a személyes orvoslás irányába vezethetnek.

6. Summary

According to the current view, excitatory/inhibitory imbalance plays a major role in neuropsychiatric disorders such as schizophrenia (SCH) and autism spectrum disorder. The prefrontal cortex is a well-studied area, yet there is no consensus on alterations in neuronal composition in patients with SCH. We aimed to revisit the question with layerwise quantification focusing on the main neuronal populations of the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) in SCH.

Formalin-fixed tissue from 6 cases with Sch and 6 age- and gender matched control cases was obtained from the Netherlands Brain Bank. We quantified calretinin immunopositive interneurons and excitatory neuronal populations (SMI 311) on immunohistochemically stained slides. We applied single molecule fluorescent in situ mRNA hybridization (RNA-scope), aiming to explore the potential subtypes of CR⁺ neurons.

Neither observed neuronal population showed a significant difference between the diagnostic groups. However, a distinct pattern was visible in layer II regarding CR⁺ neurons. One subgroup showed CR⁺ density in the range of the control values, while the other manifested lower values.

We successfully identified 4 subtypes of CR⁺ neurons based on their VIP (vasointestinal polypeptide) and CRH (corticotropin-releasing hormone) mRNA expression. Based on our preliminary results, CR⁺CRH⁺VIP⁺ subpopulation may be one of the most affected CR⁺ subtype in schizophrenia.

Our results regarding the potential molecular phenotypes existing in schizophrenia are in line with recent transcriptomic findings. It is crucial to explore the impaired populations in SCH and validate them by independent experiments with a multidisciplinary approach in order to find therapeutic targets. Correlation of the cellular, molecular patterns with clinical history has the potential to discover novel medical applications which may be a step towards personalized medicine

7. Irodalom

Abrahams, S., Goldstein, L.H., Kew, J.J.M., Brooks, D.J., Lloyd, C.M., Frith, C.D., Leigh, P.N., 1996. Frontal lobe dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis A PET study. *Brain* 119, 2105–2120. <https://doi.org/10.1093/brain/119.6.2105>

Andjelic, S., Gallopin, T., Cauli, B., Hill, E.L., Roux, L., Badr, S., Hu, E., Tamás, G., Lambolez, B., 2009. Glutamatergic Nonpyramidal Neurons From Neocortical Layer VI and Their Comparison With Pyramidal and Spiny Stellate Neurons. *J. Neurophysiol.* 101, 641–654. <https://doi.org/10.1152/jn.91094.2008>

Akbarian, S., Kim, J.J., Potkin, S.G., Hagman, J.O., Tafazzoli, A., Bunney, W.E., Jones, E.G., 1995. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 258–266. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950160008002>

American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical manual of mental disorders* (5th edition). Washington, DC.

Arteaga, G., Buritica, E., Escobar, M.I., Pimienta, H., n.d. Human prefrontal layer II interneurons in areas 46, 10 and 24. *Colomb. Médica* CM 46, 19–25.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>

Baddeley, A.D., Hitch, G., 1974. Working Memory, in: Bower, G.H. (Ed.), *Psychology of Learning and Motivation*. Academic Press, pp. 47–89. [https://doi.org/10.1016/S0079-7421\(08\)60452-1](https://doi.org/10.1016/S0079-7421(08)60452-1)

Barbas, H., 1993. Organization of cortical afferent input to orbitofrontal areas in the rhesus monkey. *Neuroscience* 56, 841–864. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90132-y](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90132-y)

Barinka, F., Druga, R., 2010. Calretinin Expression in the Mammalian Neocortex: A Review 59, 13.

Bates, J.F., Goldman-Rakic, P.S., 1993. Prefrontal connections of medial motor areas in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 336, 211–228. <https://doi.org/10.1002/cne.903360205>

Beasley, C.L., Reynolds, G.P., 1997. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophr. Res.* 24, 349–355. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(96\)00122-3](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(96)00122-3)

Beasley, C.L., Zhang, Z.J., Patten, I., Reynolds, G.P., 2002. Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biol. Psychiatry* 52, 708–715. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(02\)01360-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(02)01360-4)

Benes, F.M., Kwok, E.W., Vincent, S.L., Todtenkopf, M.S., 1998. A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol. Psychiatry* 44, 88–97. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00138-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00138-3)

Benes, F.M., McSparren, J., Bird, E.D., SanGiovanni, J.P., Vincent, S.L., 1991. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 996–1001. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1991.01810350036005>

Birnbaum, R., Weinberger, D.R., 2017. Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 727–740. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.125>

- Bowen, E.F.W., Burgess, J.L., Granger, R., Kleinman, J.E., Rhodes, C.H., 2019. DLPFC transcriptome defines two molecular subtypes of schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0472-z>
- Brisch, R., Bielau, H., Saniotis, A., Wolf, R., Bogerts, B., Krell, D., Steiner, J., Braun, K., Krzyżanowska, M., Krzyżanowski, M., Jankowski, Z., Kaliszan, M., Bernstein, H.-G., Gos, T., 2015. Calretinin and parvalbumin in schizophrenia and affective disorders: a mini-review, a perspective on the evolutionary role of calretinin in schizophrenia, and a preliminary post-mortem study of calretinin in the septal nuclei. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00393>
- Broca, 1861 Nouvelle observation d'aphémie produite par une lésion de la troisième circonvolution frontale. *Bull de la Société Anthropol.* 2, 235-238
- Brodmann, K., 1909. *Vergleichende Lokalisationlehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues.* Leipzig, Johann Ambrosius Barth
- Buldyrev, S.V., Cruz, L., Gomez-Isla, T., Gomez-Tortosa, E., Havlin, S., Le, R., Stanley, H.E., Urbanc, B., Hyman, B.T., 2000. Description of microcolumnar ensembles in association cortex and their disruption in Alzheimer and Lewy body dementias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5039–5043. <https://doi.org/10.1073/pnas.060009897>
- Cajal S. R. y. (1904). *Textura del Systema Nervioso del Hombre y los Vertebrados* (Madrid, Spain, Moya;), Vol. 2
- Caputi, A., Rozov, A., Blatow, M., Monyer, H., 2009. Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 19, 1345–1359. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn175>
- Cassidy, C.M., Balsam, P.D., Weinstein, J.J., Rosengard, R.J., Slifstein, M., Daw, N.D., Abi-Dargham, A., Horga, G., 2018. A Perceptual Inference Mechanism for Hallucinations Linked to Striatal Dopamine. *Curr. Biol.* CB 28, 503-514.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.059>
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M.C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., Rossier, J., 1997. Molecular and Physiological Diversity of Cortical Nonpyramidal Cells. *J. Neurosci.* 17, 3894–3906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-10-03894.1997>
- Cauli, B., Porter, J.T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., Audinat, E., 2000. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6144–6149. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6144>
- Cauli, B., Zhou, X., Tricoire, L., Toussay, X., Staiger, J.F., 2014. Revisiting enigmatic cortical calretinin-expressing interneurons. *Front. Neuroanat.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00052>
- Chao, L.L., Knight, R.T., 1998. Contribution of human prefrontal cortex to delay performance. *J. Cogn. Neurosci.* 10, 167–177. <https://doi.org/10.1162/089892998562636>
- Condé, F., Lund, J.S., Jacobowitz, D.M., Baimbridge, K.G., Lewis, D.A., 1994. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J. Comp. Neurol.* 341, 95–116. <https://doi.org/10.1002/cne.903410109>
- Cotter, D., Landau, S., Beasley, C., Stevenson, R., Chana, G., MacMillan, L., Everall, I., 2002. The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 51, 377–386. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01243-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01243-4)

- Cullen, T.J., Walker, M.A., Eastwood, S.L., Esiri, M.M., Harrison, P.J., Crow, T.J., 2006. Anomalies of asymmetry of pyramidal cell density and structure in dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 188, 26–31. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.104.008169>
- Daffner, K.R., Mesulam, M.M., Holcomb, P.J., Calvo, V., Acar, D., Chabrierie, A., Kikinis, R., Jolesz, F.A., Rentz, D.M., Scinto, L.F., 2000. Disruption of attention to novel events after frontal lobe injury in humans. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 18–24. <https://doi.org/10.1136/jnnp.68.1.18>
- Daviss, S.R., Lewis, D.A., 1995. Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. *Psychiatry Res.* 59, 81–96. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(95\)02720-3](https://doi.org/10.1016/0165-1781(95)02720-3)
- DeFelipe, J., 1993. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 3, 273–289. <https://doi.org/10.1093/cercor/3.4.273>
- del Río, M.R., DeFelipe, J., 1996. Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. *J. Comp. Neurol.* 369, 472–482. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960603\)369:3<472::AID-CNE11>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960603)369:3<472::AID-CNE11>3.0.CO;2-K)
- Domenech, P., Koechlin, E., 2015. Executive control and decision-making in the prefrontal cortex. *Curr. Opin. Behav. Sci., Cognitive control* 1, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2014.10.007>
- Džaja, D., Hladnik, A., Bičanić, I., Baković, M., Petanjek, Z., 2014. Neocortical calretinin neurons in primates: increase in proportion and microcircuitry structure. *Front. Neuroanat.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00103>
- Economo, C. von, 1925. *Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen*. Wien: Springer Verlag.
- Economo, C. von, 2009. *Cellular Structure of the Human Cerebral Cortex*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Falk, A., Heine, V.M., Harwood, A.J., Sullivan, P.F., Peitz, M., Brüstle, O., Shen, S., Sun, Y.-M., Glover, J.C., Posthuma, D., Djurovic, S., 2016. Modeling psychiatric disorders: from genomic findings to cellular phenotypes. *Mol. Psychiatry* 21, 1167–1179. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.89>
- Feinberg, I., 1982. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J. Psychiatr. Res.* 17, 319–334. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(82\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0022-3956(82)90038-3)
- Ferrier, D., 1876. *The functions of the brain*, The functions of the brain. G P Putnam's Sons, New York, NY, US. <https://doi.org/10.1037/12860-000>
- Finn, E.S., Huber, L., Jangraw, D.C., Molfese, P.J., Bandettini, P.A., 2019. Layer-dependent activity in human prefrontal cortex during working memory. *Nat. Neurosci.* 22, 1687–1695. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0487-z>
- Freund, T.F., Buzsáki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I)
- Freund, T.F., Martin, K. a. C., Smith, A.D., Somogyi, P., 1983. Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axoaxonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 221, 263–278. <https://doi.org/10.1002/cne.902210303>
- Fromer, M., Pocklington, A.J., Kavanagh, D.H., Williams, H.J., Dwyer, S., Gormley, P., Georgieva, L., Rees, E., Palta, P., Ruderfer, D.M., Carrera, N., Humphreys, I., Johnson, J.S., Roussos, P., Barker,

- D.D. és mtsai, 2014. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 506, 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature12929>
- Fung, S.J., Webster, M.J., Sivagnanasundaram, S., Duncan, C., Elashoff, M., Weickert, C.S., 2010. Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 167, 1479–1488. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09060784>
- Fuster, J.M., Bodner, M., Kroger, J.K., 2000. Cross-modal and cross-temporal association in neurons of frontal cortex. *Nature* 405, 347–351. <https://doi.org/10.1038/35012613>
- Gabbott, P.L., Bacon, S.J., 1997. Vasoactive intestinal polypeptide containing neurones in monkey medial prefrontal cortex (mPFC): colocalisation with calretinin. *Brain Res.* 744, 179–184. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01232-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01232-2)
- Gabbott, P.L., Bacon, S.J., 1996. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. *J. Comp. Neurol.* 364, 609–636. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960122\)364:4<609::AID-CNE2>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960122)364:4<609::AID-CNE2>3.0.CO;2-7)
- Gabbott, P.L., Jays, P.R., Bacon, S.J., 1997. Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). *J. Comp. Neurol.* 381, 389–410. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970519\)381:4<389::aid-cne1>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970519)381:4<389::aid-cne1>3.0.co;2-z)
- Gallopín, T., Geoffroy, H., Rossier, J., Lambollez, B., 2006. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 16, 1440–1452. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj081>
- Garey, L., 2010. When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J. Anat.* 217, 324–333. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01231.x>
- Gilbert, S.J., Bird, G., Brindley, R., Frith, C.D., Burgess, P.W., 2008. Atypical recruitment of medial prefrontal cortex in autism spectrum disorders: An fMRI study of two executive function tasks. *Neuropsychologia* 46, 2281–2291. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2008.03.025>
- Glantz, L.A., Lewis, D.A., 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 65–73. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.57.1.65>
- Goldman-Rakic, P.S., 1995. Cellular basis of working memory. *Neuron* 14, 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90304-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90304-6)
- Gonchar, Y., Burkhalter, A., 1997. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 7, 347–358. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.4.347>
- Haber, S.N., 2016. Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18, 7–21.
- Hashimoto, T., Volk, D.W., Eggen, S.M., Mirnics, K., Pierri, J.N., Sun, Z., Sampson, A.R., Lewis, D.A., 2003. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 6315–6326.
- Halperin, J.M., Schulz, K.P., 2006. Revisiting the role of the prefrontal cortex in the pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychol. Bull.* 132, 560–581. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.132.4.560>
- Heuer, E., Bachevalier, J., 2013. Working memory for temporal order is impaired after selective neonatal hippocampal lesions in adult rhesus macaques. *Behav. Brain Res.* 239, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.043>

- Hipólito-Reis, J., Pereira, P.A., Andrade, J.P., Cardoso, A., 2013. Prolonged protein deprivation differentially affects calretinin- and parvalbumin-containing interneurons in the hippocampal dentate gyrus of adult rats. *Neurosci. Lett.* 555, 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.036>
- Hladnik, A., Džaja, D., Darmopil, S., Jovanov-Milošević, N., Petanjek, Z., 2014. Spatio-temporal extension in site of origin for cortical calretinin neurons in primates. *Front. Neuroanat.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00050>
- Hodge, R.D., Bakken, T.E., Miller, J.A., Smith, K.A., Barkan, E.R., Graybiuck, L.T., Close, J.L., Long, B., Johansen, N., Penn, O., Yao, Z., Eggermont, J., Höllt, T., Levi, B.P. és mtsai, 2019. Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature* 573, 61–68. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1506-7> <https://celltypes.brain-map.org/maseq/human/cortex>
- Jacobsen, C. F., Wolfe, J. B., Jackson, T. A. 1935. An experimental analysis of the functions of the frontal association areas in Primates. *Journ. Nerv. Ment. Diseases*, 82, 1.
- Jarbo, K., Verstyne, T.D., 2015. Converging structural and functional connectivity of orbitofrontal, dorsolateral prefrontal, and posterior parietal cortex in the human striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 3865–3878. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2636-14.2015>
- Jászai, J., Farkas, L.M., Gallatz, K., Palkovits, M., 1998. Effects of glutamate-induced excitotoxicity on calretinin-expressing neuron populations in the area postrema of the rat. *Cell Tissue Res.* 293, 227–233. <https://doi.org/10.1007/s004410051114>
- Javitt, D.C., 2010. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 47, 4–16.
- Javitt, D.C., Jotkowitz, A., Sircar, R., Zukin, S.R., 1987. Non-competitive regulation of phencyclidine/sigma-receptors by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist D-(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid. *Neurosci. Lett.* 78, 193–198. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90632-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90632-x)
- Javitt, D.C., Zukin, S.R., 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 148, 1301–1308. <https://doi.org/10.1176/ajp.148.10.1301>
- Kaar, S.J., Angelescu, I., Marques, T.R., Howes, O.D., 2019. Pre-frontal parvalbumin interneurons in schizophrenia: a meta-analysis of post-mortem studies. *J. Neural Transm.* 126, 1637–1651. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02080-2>
- Kahnt, T., Heinzle, J., Park, S.Q., Haynes, J.-D., 2011. Decoding different roles for vmPFC and dlPFC in multi-attribute decision making. *NeuroImage, Multivariate Decoding and Brain Reading* 56, 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.05.058>
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 7, 476–486. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.6.476>
- Kesby, J.P., Eyles, D.W., McGrath, J.J., Scott, J.G., 2018. Dopamine, psychosis and schizophrenia: the widening gap between basic and clinical neuroscience. *Transl. Psychiatry* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0071-9>
- Khan, R., Zhang, Q., Darayan, S., Dhandapani, S., Katyal, S., Greene, C., Bajaj, C., Ress, D., 2011. Surface-based analysis methods for high-resolution functional magnetic resonance imaging. *Graph. Models* 73, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.gmod.2010.11.002>
- Kitzinger, H., Arnold, D.G., 1949. A preliminary study of the effects of glutamic acid on catatonic schizophrenics. *Rorschach Res. Exch. J. Proj. Tech.* 13, 210–218. <https://doi.org/10.1080/10683402.1949.10381459>

- Koenigs, M., Grafman, J., 2009. The functional neuroanatomy of depression: Distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 201, 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.004>
- Konopaske, G.T., Lange, N., Coyle, J.T., Benes, F.M., 2014. Prefrontal cortical dendritic spine pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *JAMA Psychiatry* 71, 1323–1331. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.1582>
- Koskinas, C. von E., G.N., n.d. *Atlas of Cytoarchitectonics of the Adult Human Cerebral Cortex* | Karger Book.
- Krienen, F.M., Goldman, M., Zhang, Q., Rosario, R. del, Florio, M., Machold, R., Saunders, A., Levandowski, K., Zaniewski, H., Schuman, B., Wu, C., Lutservitz, A., Mullally, C.D., Reed, N., Bien, E. és mtsai, 2019. Innovations in Primate Interneuron Repertoire. *bioRxiv* 709501. <https://doi.org/10.1101/709501>
- Kubota, Y., Hattori, R., Yui, Y., 1994. Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res.* 649, 159–173. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91060-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91060-x)
- Kubota, Y., Shigematsu, N., Karube, F., Sekigawa, A., Kato, S., Yamaguchi, N., Hirai, Y., Morishima, M., Kawaguchi, Y., 2011. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 21, 1803–1817. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq252>
- Law, A.J., Harrison, P.J., 2003. The distribution and morphology of prefrontal cortex pyramidal neurons identified using anti-neurofilament antibodies SMI32, N200 and FNP7. Normative data and a comparison in subjects with schizophrenia, bipolar disorder or major depression. *J. Psychiatr. Res.* 37, 487–499. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(03\)00075-x](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(03)00075-x)
- Lee, J., Park, K., Lee, S., Whang, K., Kang, M., Park, C., Huh, Y., 2002. Differential changes of calcium binding proteins in the rat striatum after kainic acid-induced seizure. *Neurosci. Lett.* 333, 87–90. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00987-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00987-4)
- Lewis, D.A., Cruz, D.A., Melchitzky, D.S., Pierri, J.N., 2001. Lamina-specific deficits in parvalbumin-immunoreactive varicosities in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia: evidence for fewer projections from the thalamus. *Am. J. Psychiatry* 158, 1411–1422. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.9.1411>
- Lewis, D.A., Hashimoto, T., Volk, D.W., 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 312–324. <https://doi.org/10.1038/nrn1648>
- Lichtenstein, P., Björk, C., Hultman, C.M., Scolnick, E., Sklar, P., Sullivan, P.F., 2006. Recurrence risks for schizophrenia in a Swedish national cohort. *Psychol. Med.* 36, 1417–1425. <https://doi.org/10.1017/S0033291706008385>
- Lukas, W., Jones, K.A., 1994. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* 61, 307–316. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90233-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90233-X)
- Marín, O., 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 107–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3155>
- Marín-Padilla, M. 1990. Three-dimensional structural organization of layer 1 in the human cerebral cortex: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 299(1):89-105. doi: 10.1002/cne.902990107.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, C., 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>

- Melchitzky, D.S., Eggan, S.M., Lewis, D.A., 2005. Synaptic targets of calretinin-containing axon terminals in macaque monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* 130, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.046>
- Meskenaite, V., 1997. Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*. *J. Comp. Neurol.* 379, 113–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970303\)379:1<113::AID-CNE8>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970303)379:1<113::AID-CNE8>3.0.CO;2-7)
- Meyer, G., González-Hernández, T.H., Ferres-Torres, R., 1989. The spiny stellate neurons in layer IV of the human auditory cortex. A Golgi study. *Neuroscience* 33, 489–498. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90401-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90401-6)
- Miguel-Hidalgo, J.J., Dubey, P., Shao, Q., Stockmeier, C., Rajkowska, G., 2005. Unchanged packing density but altered size of neurofilament immunoreactive neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia and major depression. *Schizophr. Res.* 76, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2005.02.015>
- Miller, E.K., Cohen, J.D., 2001. An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Möckel, V., Fischer, G., 1994. Vulnerability to excitotoxic stimuli of cultured rat hippocampal neurons containing the calcium-binding proteins calretinin and calbindin D28K. *Brain Res.* 648, 109–120. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91911-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91911-9)
- Moghaddam, B., Javitt, D., 2012. From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and its Implication for Treatment. *Neuropsychopharmacology* 37, 4–15. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.181>
- Mountcastle, V.B., 1957. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.* 20, 408–434. <https://doi.org/10.1152/jn.1957.20.4.408>
- Nicholas, C.R., Chen, J., Tang, Y., Southwell, D.G., Chalmers, N., Vogt, D., Arnold, C.M., Chen, Y.-J.J., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., Sasai, Y., Alvarez-Buylla, A., Rubenstein, J.L.R., Kriegstein, A.R., 2013. Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development. *Cell Stem Cell* 12, 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.005>
- Oh, D.H., Son, H., Hwang, S., Kim, S.H., 2012. Neuropathological abnormalities of astrocytes, GABAergic neurons, and pyramidal neurons in the dorsolateral prefrontal cortices of patients with major depressive disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 22, 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.09.001>
- Oláh, S., Komlósi, G., Szabadics, J., Varga, C., Tóth, É., Barzó, P., Tamás, G., 2007. Output of neurogliaform cells to various neuron types in the human and rat cerebral cortex. *Front. Neural Circuits* 1. <https://doi.org/10.3389/neuro.04.004.2007>
- Onwordi, E.C., Halff, E.F., Whitehurst, T., Mansur, A., Cotel, M.-C., Wells, L., Creaney, H., Bonsall, D., Rogdaki, M., Shatalina, E., Reis Marques, T., Rabiner, E.A., Gunn, R.N., Natesan, S., Vernon, A.C., Howes, O.D., 2020. Synaptic density marker SV2A is reduced in schizophrenia patients and unaffected by antipsychotics in rats. *Nat. Commun.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14122-0>
- Opris, I., Casanova, M.F., 2014. Prefrontal cortical minicolumn: from executive control to disrupted cognitive processing. *Brain* 137, 1863–1875. <https://doi.org/10.1093/brain/awt359>

- Owen, M.J., O'Donovan, M.C., Thapar, A., Craddock, N., 2011. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 198, 173–175. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.110.084384>
- Pei, J.-C., Hung, W.-L., Lin, B.-X., Shih, M.-H., Lu, L.-Y., Luo, D.-Z., Tai, H.-C., Studer, V., Min, M.-Y., Lai, W.-S., 2019. Therapeutic potential and underlying mechanism of sarcosine (N-methylglycine) in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor hypofunction models of schizophrenia. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 33, 1288–1302. <https://doi.org/10.1177/0269881119856558>
- Perälä, J., Suvisaari, J., Saarni, S.I., Kuoppasalmi, K., Isometsä, E., Pirkola, S., Partonen, T., Tuulio-Henriksson, A., Hintikka, J., Kieseppä, T., Härkänen, T., Koskinen, S., Lönnqvist, J., 2007. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 19–28. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.1.19>
- Perelman, P., Johnson, W.E., Roos, C., Seuánez, H.N., Horvath, J.E., Moreira, M.A.M., Kessing, B., Pontius, J., Roelke, M., Rumpfer, Y., Schneider, M.P.C., Silva, A., O'Brien, S.J., Pecon-Slatery, J., 2011. A Molecular Phylogeny of Living Primates. *PLOS Genet.* 7, e1001342. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001342>
- Perrenoud, Q., Rossier, J., Geoffroy, H., Vitalis, T., Gallopin, T., 2013. Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 23, 423–441. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs032>
- Peters and Jones 1981. Peters A, Jones EG. Classification of cortical neurons. In: *Cerebral Cortex: Cellular Components of the Cerebral Cortex*, edited by Peters A, Jones EG. New York: Plenum, 1984, vol. 1, p. 107–121.
- Pierrri, J.N., Chaudry, A.S., Woo, T.U., Lewis, D.A., 1999. Alterations in chandelier neuron axon terminals in the prefrontal cortex of schizophrenic subjects. *Am. J. Psychiatry* 156, 1709–1719. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.11.1709>
- Pochon, J.-B., Levy, R., Poline, J.-B., Crozier, S., Lehericy, S., Pillon, B., Deweer, B., Le Bihan, D., Dubois, B., 2001. The Role of Dorsolateral Prefrontal Cortex in the Preparation of Forthcoming Actions: an fMRI Study. *Cereb. Cortex* 11, 260–266. <https://doi.org/10.1093/cercor/11.3.260>
- Poorthuis, R.B., Muhammad, K., Wang, M., Verhoog, M.B., Junek, S., Wrana, A., Mansvelder, H.D., Letzkus, J.J., 2018. Rapid Neuromodulation of Layer 1 Interneurons in Human Neocortex. *Cell Rep.* 23, 951–958. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.111>
- Rajkowska, G., Selemon, L.D., Goldman-Rakic, P.S., 1998. Neuronal and Glial Somal Size in the Prefrontal Cortex: A Postmortem Morphometric Study of Schizophrenia and Huntington Disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 215–224. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.3.215>
- Rampino, A., Marakhovskaia, A., Soares-Silva, T., Torretta, S., Veneziani, F., Beaulieu, J.M., 2019. Antipsychotic Drug Responsiveness and Dopamine Receptor Signaling: Old Players and New Prospects. *Front. Psychiatry* 9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00702>
- Rapoport, J., Chavez, A., Greenstein, D., Addington, A., Gogtay, N., 2009. Autism-Spectrum Disorders and Childhood Onset Schizophrenia: Clinical and Biological Contributions to a Relationship Revisited. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 48, 10–18. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e31818b1c63>
- Réthelyi, J., Szentágothai, J. 2014. *Funkcionális anatómia*. Budapest, Medicina Tankönyvkiadó Zrt.
- Reynolds, G.P., Beasley, C.L., Zhang, Z.J., 2002. Understanding the neurotransmitter pathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *J. Neural Transm.* Vienna Austria 1996 109, 881–889. <https://doi.org/10.1007/s007020200072>

- Reynolds, G.P., Beasley, C.L., 2001. GABAergic neuronal subtypes in the human frontal cortex-- Development and deficits in schizophrenia. *J Chem Neuroanat.* 2001 Jul;22(1-2):95-100. doi: 10.1016/s0891-0618(01)00113-2.
- Ries, S.K., Karzmark, C.R., Navarrete, E., Knight, R.T., Dronkers, N.F., 2015. Specifying the role of the left prefrontal cortex in word selection. *Brain Lang.* 149, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2015.07.007>
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Psychosis Endophenotypes International Consortium, 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421–427. <https://doi.org/10.1038/nature13595>
- Rössler, J., Rössler, W., Seifritz, E., Unterrassner, L., Wyss, T., Haker, H., Wotruba, D., 2020. Dopamine-Induced Dysconnectivity Between Salience Network and Auditory Cortex in Subjects With Psychotic-like Experiences: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Schizophr. Bull.* 46, 732–740. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbz110>
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., McGrath, J., 2005. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2, e141. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020141>
- Santoro, M.L., Ota, V.K., Stilhano, R.S., Silva, P.N., Santos, C.M., Diana, M.C., Gadelha, A., Bressan, R.A., Melaragno, M.I., Han, S.W., Abílio, V.C., Belangero, S.I., 2014. Effect of antipsychotic drugs on gene expression in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Schizophr. Res.* 157, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.05.015>
- Selemon, L.D., Rajkowska, G., Goldman-Rakic, P.S., 1995. Abnormally High Neuronal Density in the Schizophrenic Cortex: A Morphometric Analysis of Prefrontal Area 9 and Occipital Area 17. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 805–818. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950220015005>
- Somogyi, P., Freund, T.F., Hodgson, A.J., Somogyi, J., Beroukas, D., Chubb, I.W., 1985. Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus visual cortex of the cat. *Brain Res.* 332, 143–149. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90397-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90397-X)
- Stachowiak, E.K., Benson, C.A., Narla, S.T., Dimitri, A., Chuye, L.E.B., Dhiman, S., Harikrishnan, K., Elahi, S., Freedman, D., Brennand, K.J., Sarder, P., Stachowiak, M.K., 2017. Cerebral organoids reveal early cortical maldevelopment in schizophrenia—computational anatomy and genomics, role of FGFR1. *Transl. Psychiatry* 7, 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41398-017-0054-x>
- Sullivan, P.F., Daly, M.J., O'Donovan, M., 2012. Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. *Nat. Rev. Genet.* 13, 537–551. <https://doi.org/10.1038/nrg3240>
- Szabadics, J., Varga, C., Molnár, G., Oláh, S., Barzó, P., Tamás, G., 2006. Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311, 233–235. <https://doi.org/10.1126/science.1121325>
- Szczepanski, S.M., Knight, R.T., 2014. Insights into Human Behavior from Lesions to the Prefrontal Cortex. *Neuron* 83, 1002–1018. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.011>
- Szegedi, V., Paizs, M., Csakvari, E., Molnar, G., Barzo, P., Tamas, G., Lamsa, K., 2016. Plasticity in Single Axon Glutamatergic Connection to GABAergic Interneurons Regulates Complex Events in the Human Neocortex. *PLoS Biol.* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000237>
- Tai, Y., Janas, J.A., Wang, C.-L., Van Aelst, L., 2014. Regulation of Chandelier Cell Cartridge and Bouton Development via DOCK7-Mediated ErbB4 Activation. *Cell Rep.* 6, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.034>

- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Thune, J.J., Uylings, H.B., Pakkenberg, B., 2001. No deficit in total number of neurons in the prefrontal cortex in schizophrenics. *J. Psychiatr. Res.* 35, 15–21. [https://doi.org/10.1016/s0022-3956\(00\)00043-1](https://doi.org/10.1016/s0022-3956(00)00043-1)
- Tomioka, R., Rockland, K.S., 2007. Long-distance corticocortical GABAergic neurons in the adult monkey white and gray matter. *J. Comp. Neurol.* 505, 526–538. <https://doi.org/10.1002/cne.21504>
- Tooney, P.A., Chahl, L.A., 2004. Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.10.004>
- Triarhou, L., 2013. The Cytoarchitectonic Map of Constantin von Economo and Georg N. Koskinas. pp. 33–53. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37824-9_2
- Tsuchida, A., Fellows, L.K., 2009. Lesion evidence that two distinct regions within prefrontal cortex are critical for n-back performance in humans. *J. Cogn. Neurosci.* 21, 2263–2275. <https://doi.org/10.1162/jocn.2008.21172>
- Velmeshev, D., Schirmer, L., Jung, D., Haeussler, M., Perez, Y., Mayer, S., Bhaduri, A., Goyal, N., Rowitch, D.H., Kriegstein, A.R., 2019. Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science* 364, 685–689. <https://doi.org/10.1126/science.aav8130>
- Velthorst, E., Froudust-Walsh, S., Stahl, E., Ruderfer, D., Ivanov, I., Buxbaum, J., Banaschewski, T., Bokde, A.L.W., Dipl-Psych, U.B., Büchel, C., Quinlan, E.B., Desrivières, S., Flor, H., Frouin, V., Garavan, H és mtsai. 2018. Genetic risk for schizophrenia and autism, social impairment and developmental pathways to psychosis. *Transl. Psychiatry* 8. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0229-0>
- Wallis, J.D., 2012. Cross-species studies of orbitofrontal cortex and value-based decision-making. *Nat. Neurosci.* 15, 13–19. <https://doi.org/10.1038/nn.2956>
- Wang, Y., Zhang, P., Wyskiel, D.R., 2016. Chandelier Cells in Functional and Dysfunctional Neural Circuits. *Front. Neural Circuits* 10. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00033>
- Weickert, C.S., Fung, S.J., Catts, V.S., Schofield, P.R., Allen, K.M., Moore, L.T., Newell, K.A., Pellen, D., Huang, X.-F., Catts, S.V., Weickert, T.W., 2013. Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 18, 1185–1192. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.137>
- Weinberger DR, 1986. The pathogenesis of schizophrenia: a neurodevelopmental theory. In *The Neurology of Schizophrenia* (eds RA Nasrallah & DR Weinberger): 387–405. Elsevier.
- Willsey, A.J., Sanders, S.J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A.T., Muhle, R.A., Reilly, S.K., Lin, L., Fertuzinhos, S., Miller, J.A., Murtha, M.T., Bichsel, C., Niu, W., Cotney, J., Ercan-Sencicek és mtsai. 2013. Coexpression Networks Implicate Human Midfetal Deep Cortical Projection Neurons in the Pathogenesis of Autism. *Cell* 155, 997–1007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.020>
- Wong, D.F., Wagner, H.N., Tune, L.E., Dannals, R.F., Pearlson, G.D., Links, J.M., Tamminga, C.A., Broussolle, E.P., Ravert, H.T., Wilson, A.A., Toung, J.K., Malat, J., Williams, J.A., O’Tuama, L.A., Snyder és mtsai. 1986. Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science* 234, 1558–1563. <https://doi.org/10.1126/science.2878495>

Woo, T.U., Miller, J.L., Lewis, D.A., 1997. Schizophrenia and the parvalbumin-containing class of cortical local circuit neurons. *Am. J. Psychiatry* 154, 1013–1015.
<https://doi.org/10.1176/ajp.154.7.1013>

Yan, J., Cui, Y., Li, Q., Tian, L., Liu, B., Jiang, T., Zhang, D., Yan, H., 2019. Cortical thinning and flattening in schizophrenia and their unaffected parents. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 15, 935–946.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S195134>

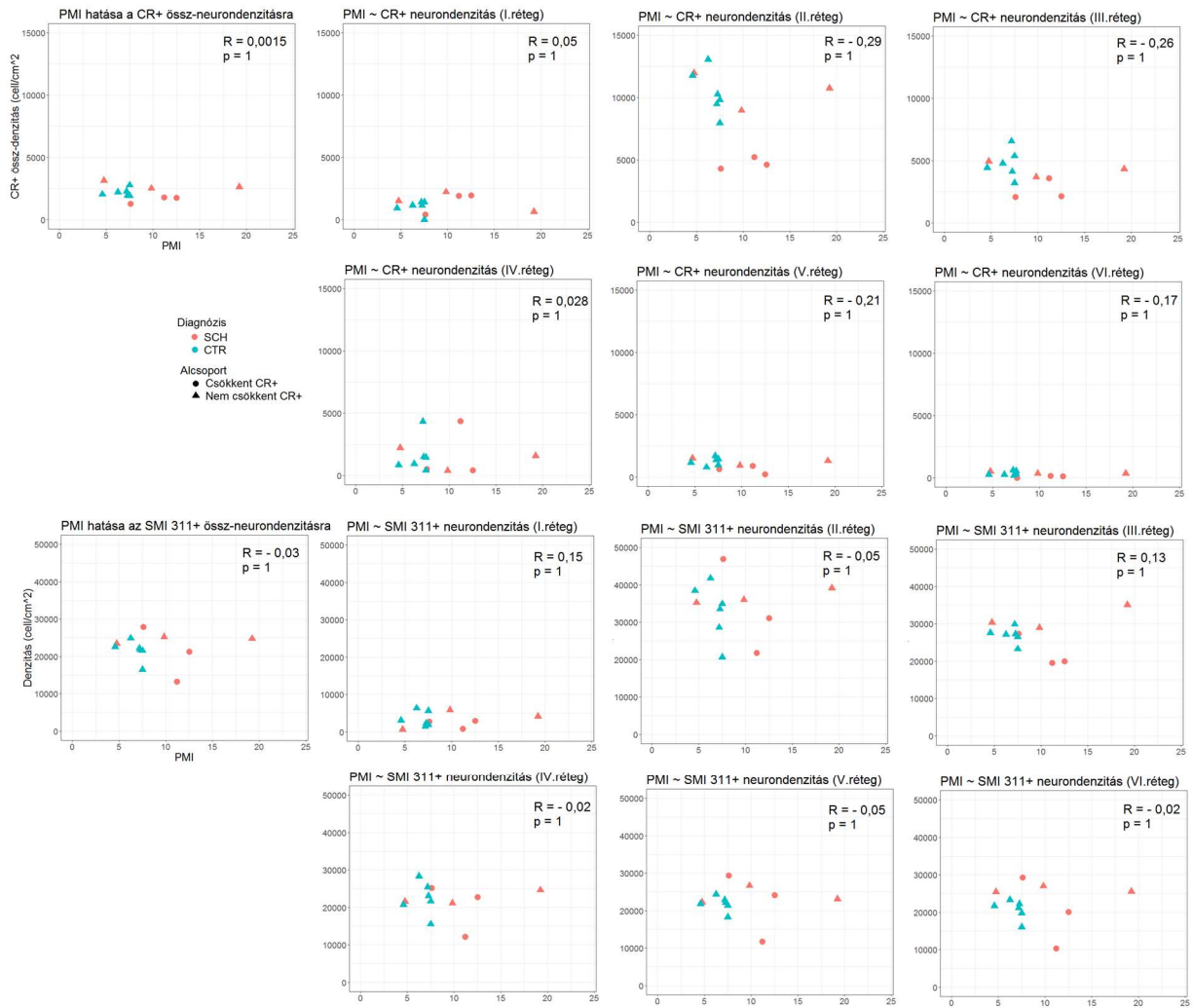
Zaitsev, A.V., Gonzalez-Burgos, G., Povysheva, N.V., Kröner, S., Lewis, D.A., Krimer, L.S., 2005. Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 15, 1178–1186.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhh218>

8. Köszönetnyilvánítás

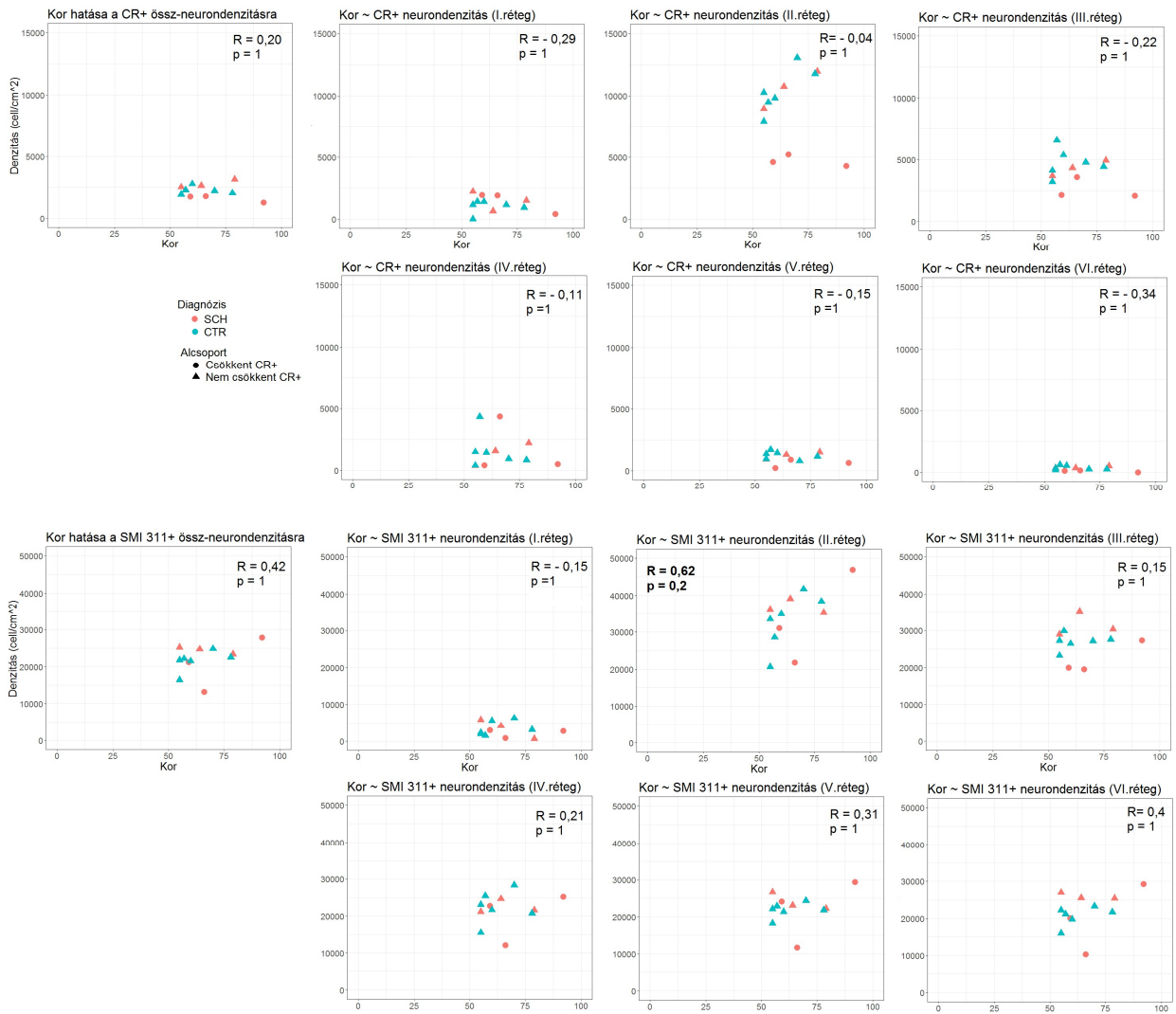
Köszönöm témavezetőmnek folyamatos rendelkezésre állását, és a sok segítséget, amivel szakmai fejlődésemhez hozzájárult. Köszönöm laborasszisztensünk, Páczai Erzsébet türelmét, tanácsait és sok-sok munkáját. Külön köszönet illeti zágrábi kollaborátorainkat, akik a hibridizációs próba elvégzéséhez szakértelmüket és laboratóriumi felszerelésüket biztosították: Zdravko Petanjeket, Dora Sedmakot, Nikola Habeket, és a technikusokat, Božica Popovićot és Maja Horvatot, akik a hibridizációs próba elvégzésében közreműködtek. Köszönöm az Állatorvostudományi Egyetem munkatársainak a tanácsadást, különösen Dr Lang Zsoltnak a sok statisztikai konzultációt, és belső konzulensemnek, Dr Hornung Erzsébetnek a rendelkezésre állását, konstruktív hozzászólásait és ötleteit. Köszönöm a csoporttársaimnak is a folyamatos visszajelzést, tanácsot és támogatást.

Függelék

1. Post mortem idő és neuronenzitázis közti kapcsolatot ábrázoló scatterplotok, a Pearson-féle korrelációs együtthatós értékekkel (R) és a korrelációs tesztek Bonferroni-korrigált p-értékeivel.



2. Kor és neuronenzitás közti kapcsolatot ábrázoló scatterplotok, a Pearson-féle korrelációs együtthatós értékek (R) és a korrelációs tesztek Bonferroni-korrigált p-értékeivel.

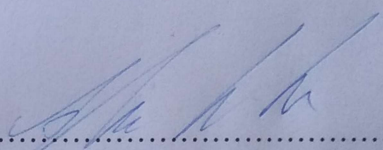


Témavezetői ellenjegyzés

Témavezetői ellenjegyzés

AlulírottDr Adorján István..... igazolom, hogy
.....Tyler Teadora..... (hallgató neve)
.....*Egyes kortikális neuronpopulációk érintettsége skizofréniában*.....
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védeésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020.....04.24.....


.....
.....DR. ADORJÁN ISTVÁN.....
.....

(témavezető neve és aláírása)

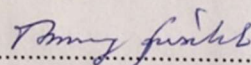
Semmelweis Egyetem
Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Tanszék
(tanszék)

Belső konzulensi nyilatkozat

Belső konzulensi ellenjegyzés

Alulírott *Dr. Hornung Erzsébet* igazolom, hogy **Tyler Teadó** „*Egyes kortikális neuronpopulációk érintettsége skizofréniában*” című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020. április. *21.*



.....
Dr. Hornung Erzsébet egy. tanár
belső konzulens

Állatorvostudományi Egyetem
Biológiai Intézet/Ökológiai Tanszék