creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

자살 사망자의 뇌조직을 이용한 자살의 생체 표지자 발굴

Identification of Biomarkers of Suicide Using Postmortem Brain Tissue

2022년 8월

서울대학교 대학원

의학과 정신과학

김 민 지

자살 사망자의 뇌조직을 이용한 자살의 생체 표지자의 발굴

지도 교수 안 용 민

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2022년 4월

서울대학교 대학원
의학과 정신과학
김 민 지(성명)

김민지의 의학박사 학위논문을 인준함
2022년 7월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

서론: 자살은 전 세계적으로 주요한 사망 원인이며 심각한 공중 보건 문제 중 하나이다. 자살은 다양한 요소들에 영향을 받아 일어나지만, 자살을 예방하고 치료하기 위해서는 자살의 생물학적인 기전을 이해하는 것이 매우 중요하다. 자살에 대한 생물학적 기전을 연구함에 있어 고위험 자살행동 환자를 대상으로 하는 경우가 많은데, 이들의 특성은 자살 사망자의 특성과 다를 수 있어 자살 사망자를 대상으로 하는 원인 장기인 뇌조직의 연구가 필수적이다. 현재까지 한국의 자살사망자의 사후 뇌조직을 이용한 연구는 부재하며, 본 연구에서는 자살 사망자의 사후 뇌조직의 단백체 분석을 통하여 그 생물학적 기반을 조사하고자 하였다.

방법: 예비 연구(자살 사망자의 뇌 3례, 돌연사 3례)를 통하여 사후 뇌조직 샘플의 단백체 분석 프로토콜을 수립하였다. 확정된 연구 프로토콜을 대규모 샘플인 36명의 사후 뇌조직 (23명의 자살 사망자, 13명의 돌연사)에 적용하였다. 뇌조직의 질을 확인 후, Liquid chromatography 분석법과 함께 tandem mass tag 기반 정량화 기법을 사용하여 전두엽 피질(Broadmann 영역 9, 10)에서 채취한 사후 뇌조직의 단백질체 프로파일링을 수행하였다. Gene ontology(GO) 분석, Ingenuity Pathway Analsysis(IPA), Gene Set Enrichement Analsysis(GSEA), Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)의 생물정보학적 도구들을 사용하여 자살과 관련된 생물학적 경로와 기능 단위들을 추출하였다. 자살 사망자 내에서 진단명, 약물 사용력, 사망당시 알코올 사용 여부 등의 임상 정보를 바탕으로 하위 그룹들을 나누었고, 각 그룹들 사이에서 공통적 또는 차등적으로 발현되는 단백질을 확인하고자

그룹별 분석을 진행하였다.

결과: 총 36개의 사후 뇌조직의 질을 평가하였고, 모두 적정 수준 내에 포함됨을 확인하였다. 단백체 분석 결과 동정된 9,801개의 단백질 중 295개(244 up-regulated, 81 down-regulated)가 자살사망자와 돌연사 사이에서 유의한 발현량 차이를 보였다. 다양한 생명정보학적 기법을 통하여 관련된 생물학적 경로를 추출하였을 때, 자살사망자에서 체내 카나비노이드 경로, GABA경로 및 세포사멸 경로가 돌연사에 비해 유의하게 변화하였음을 확인할 수 있었다. 신경계 발달과 기능과 관련된 네트워크 내에서 CAPNS1, CSNK2B, PTP4A2와 같은 단백질들이 자살사망자에서 차등발현됨을 확인하였다. 자살사망자 내에서 임상정보를 바탕으로 하위 그룹 분석을 수행하였고, 정신질환의 유무와 관련하여 유의한 차이를 보이는 단백질로는 GSTT1을 확인하였고, 알코올 사용장애와 연관되어서는 S100A10를 확인하였다.

결론: 본 연구는 한국에서 최초로 자살사망자의 뇌를 이용하여 단백체를 분석한 연구이다. 현재까지의 자살사망자의 뇌를 기반으로한 단백체 연구들 중에서 가장 많은 수의 단백질을 동정하였으며, 기존 문헌들과 비교하였을 때 새롭고 타당성 있는 자살사망 관련 생물학적 경로들(체내 카나비노이드 경로, GABA 경로, 세포사멸사 경로)과 가능성 있는 바이오마커를 제시하였다. 본 연구는 향후 더욱 구체적인 자살사망관련 메커니즘의 확인의 기반 연구가 될 것이다.

*본 내용의 일부는

Kim, M.J., Do, M., Han, D. et al. Proteomic profiling of postmortem prefrontal cortex tissue of suicide completers. *Transl Psychiatry* 12,

142 (2022). https://doi.org/10.1038/s41398-022-01896-z
에 출판 완료된 내용이다.

주요어 : 자살, 자살사망자, 사후 뇌조직, 카나비노이드, GABA, 세포사멸사
학　번 : 2018-32550

목 차

초록 i

표 목차 vii

그림 목차 viii

약어 목록 x

제 1 장 서론 1

제 2장 연구대상 및 방법 10

제 3 장 결과 18

제 4 장 고찰 24

제 5 장 결론 36

참고문헌 61

Abstract 70

표 목차

[표 1] Suicide completers and sudden death samples used in pilot study 37
[표 2] Clinical characteristics of suicide completers and sudden death group. 38
[표 3] Detailed clinical characteristics of suicide completers 39
[표 4] Proteins related to clinical characteristics among suicide completers..... 40

그림 목차

[그림1] pH difference between suicide completers and sudden death group 41
[그림 2] Number of proteins quantified in brain tissue samples after suicide and sudden death: a pilot study 42
[그림 3] Dynamic range for quantified protein: a pilot study 43
[그림 4] Principle Component Analysis (PCA) results for quantified proteins : a pilot study 44
[그림 5] Research workflow for proteomic profiling using postmortem brain tissue 45
[그림 6] Detailed experimental workflow 46
[그림 7] Dynamic range of pooled sample in four experimental sets. 47
[그림 8] Quantitative profiling of postmortem brain tissue samples 48
[그림 9] Unsupervised hierarchical clustering of 574 proteins with significant expression differences in suicide and sudden death: a pilot study 49
[그림 10] Volcano Plot for 574 Proteins with significant expression differences between suicide and Sudden Death: a pilot study 50
[그림 11] Differentially expressed proteins 51
[그림 12] Volcano plot for differentially expressed proteins. 52
[그림 13] Gene set enrichment analysis (GSEA) 53
[그림 14] WGCNA analysis: clustering 54

[그림 15] WGCNA analysis: eigengenes.....55
[그림 16] Network analysis of blue module.....56
[그림 17] Network analysis of turquoise module 57
[그림 18] Comparative studies 58
[그림 19] DEPs expressed according to cell types(Endothelial cell, astrocyte, oligodendrocytes, neuron, microglia) 59
[그림 20]Venn diagrams for differentially expressed proteins between subgroups 60

약어 목록

ABRACL: ABRA C-Terminal Like

ACN: acetonitrile

AMPA: α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CAPNS1: Calpain Small Subunit 1

CDC42: Cell Division Cycle 42

CDK: cyclin-dependent kinase

COL4A1: Collagen Type IV Alpha 1 Chain

CREB: cAMP response element-binding protein

CSNK2B: Casein kinase II subunit beta

DARPP32: Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, 32 kDa

DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery

DEP: Differentially Expressed Protein

DLPFC: dorsolateral prefronatl cortex

DNA: Deoxyribo nucleic acid

DYNLT3: Dynein Light Chain Tctex-Type 3

ERF: ETS2 Repressor Factor

FC: Fold Change

GABA: gamma aminobutyric acid

GO: Gene ontology

GSEA: Gene Set Enrichement Analsysis

GWAS: Genome Wide Association Study

GRIN2B: Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B

GRIK3: Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 3

GRM2: Glutamate Metabotropic Receptor 2

GSTT1: Glutathione S-Transferase Theta 1

IPA: Ingenuity Pathway Analsysis

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LC: liquid chromatography

MM: module membership

MRGPRF: MAS Related GPR Family Member F

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NTRK2: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 2

PCA: Principal component analysis

PFC: prefrontal cortex

PMI: postmortme interval

PPP3R1: Protein Phosphatase 3 Regulatory Subunit B, Alpha

PS: Protein significance

PTP4A2: Protein Tyrosine Phosphatase 4A2

RNA: Ribonucleic acid

RPS4Y1: Ribosomal Protein S4 Y-Linked 1

S100A10: S100 Calcium Binding Protein A10

SCG5: Secretogranin V

SNP: single nucleotide polymorphism

TBX20: T-Box Transcription Factor 20

TMT: Tandem Mass Tag

TOM: Topological Overlap Matrix

TrkB: Tropomyosin receptor kinase B

TUBA3A: Tubulin alpha-3 chain

UBE2D3: Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 D3

WGCNA: Weighted Gene Co-expression Network Analysis

제 1 장 서 론

자살은 한국뿐만 아니라 전 세계적인 주요 사망 원인 중 하나이다. 세계보건기구(WHO)에 따르면 매년 80만 명이 넘는 사람들이 자살로 사망한다[1]. 한국의 2019년 자살 사망자 수는 13,799명으로, 인구 10만명당 자살률은 26.9명으로 추산된다[2]. 자살은 개개인의 비극일 뿐만 아니라 가족, 친구 및 지역 사회를 포함한 많은 이들에게 간접적으로 영향을 미치기 때문에 중요한 공중 보건 문제이다[3].

자살 연구에는 여러 용어들이 혼재되어 있는데, 자살행동(suicidal behavior)은 정신과적으로 정의된 질병이라고 보기는 어려우나, 자살(suicide) 및 자살 시도(suicide attempt), 자살 사고(suicide ideation)의 스펙트럼으로 구성된다. 자살사고는 '자신의 삶을 끝내는 것에 대한 생각'으로 정의되며, 능동적 자살 사고와 수동적 자살사고로 나눈다. 자살 시도는 사망을 하지 않은 상태를 뜻하며, 자살 그 자체는 자살로 인한 죽음으로 정의한다. 자살 행동에 대한 문헌이 증가하고 있지만, 자살 스펙트럼 전반에 걸쳐 고려될 수 있는 다양한 표현형으로 인해 그 해석과 통합이 복잡하다[4].

자살행동의 위험은 매우 다양한 생물학적, 임상적, 심리적, 사회적, 문화적, 환경적 요인에 영향을 받는다[5, 6]. 자살행동의 위험을 설명하기 위하여 다양한 모델들이 제시되어 왔고, 대부분의 모델에서 자살행동은 관련된 소인들(말단 인자(distal factor) 또는 체질적 부분(diathesis))와 촉진 인자들 (근위 인자(proximal factor) 또는 유발요인, 스트레스)의 상호작용을 통해서 발생하게 된다고 제시하고 있다[7-9].다양한 요인들이 관련될 수 있지만 자살

위험과의 상대적 연관성은 개인마다 크게 다르며 불안하거나 충동적인 성격 특성, 사회적 지원 및 안정적인 인간관계와 같은 다양한 요인에 의해 매개될 수 있다[10, 11]. 자살행동의 병태생리학적 이질성과 다양한 요인들의 상대적 중요성 또한 연령과 성별, 인종에 따라 달라지는 특성을 갖는다[12].

다양한 자살행동의 위험 요인들 중 생물학적 요인들에 대한 연구는 현재까지 꾸준히 지속되고 있는데, 그 근거로는 높은 유전성(heritability)이 있다. 자살 행동은 30년 넘게 가족들에게 집단적으로 발생하는 것으로 알려져 있으며, 자살 및 자살 시도가 정신과적 질환과 독립적으로 가족 내에서 전달된다는 증거들이 최근 10년 동안 증가하고 있다. 국가 등록 기반 연구와 쌍둥이 및 입양 연구에서 자살은 30-50% 의 유전 가능성을 시사하며[10, 11, 13], 동반 정신 질환의 유전 가능성이 통제된 더 정확한 추정치는 17-36%라고 보고된 바 있다[14]. 또한 자살을 시도한 사람의 자녀는 일반 인구보다 자살을 시도할 위험이 5배 더 높다고 알려져 있으며, 자살로 부모를 잃은 사람은 다른 사람으로 인해 갑자기 부모를 잃은 사람들보다 2배 더 높은 자살 위험을 보였다[15]. 자살 행동의 가족 클러스터링을 보여주는 이러한 데이터는 자살 행동의 유전적 전달의 개념을 더욱 뒷받침하고 있는 것으로 보인다.

생물학적으로 자살행동은 뇌의 다양한 기능적 경로에 영향을 미치며, 뇌 전체의 광범위한 신경생물학적 변화와 관련이 있다고 알려져 있다. 첫째로, 세로토닌 경로는 지금까지 우울증에서 가장 잘 설명된 경로이며, 이 경로의 몇 가지 변화가 자살 행동과도 관련이 있다고 알려져 있다[16-18]. 자살로 사망한 개인의 사후 뇌 조직을 사용한 연구에서 세로토닌 대사산물인 5-하이드록시인돌아세트산의 수준이 감소하고[16] 솔기핵의 세로토닌성 뉴런에서 보상적으로 증가해 있는 것이 확인된 바 있다[19, 20]. 자살의

세로토닌과의 연관성을 탐구하는 연구에서 가장 어려운 점은 우울증과 자살행동 사이에 높은 연관관계가 존재한다는 것이다. 일부 영상학적 연구에서는 자살 행동이 없는 우울증 환자와 비교하였을 때 자살사고가 있는 사람들의 중뇌에서 세로토닌 전달체와 세로토닌 수용체 1A의 발현에 변화가 있음을 보인 바 있다[21, 22]. 세로토닌 수용체 전사체의 mRNA 편집 현상과 같은 수용체에 대한 추가적인 연구는 자살 행동에서 세로토닌의 역할에 대한 이해를 더할 수 있으리라고 생각된다.

둘째로, 자살의 생물학적 요소에는 코티솔이 중요하게 작용하는 것으로 보인다. 정상적인 상황에서 코티솔 방출은 스트레스에 의해 유발된다. 코티솔 변화는 시상하부와 해마 등의 뇌 부분들의 글루코코르티코이드 수용체에 코티솔이 결합되면 코티솔 방출이 억제되는 음성피드백에 의해서 조절된다[7]. 변화된 코티솔 반응성은 자살 행동의 위험을 증가시킬 수 있다고 보고된 바 있으나 다양한 연구들에서 그 방향성에 대해서는 모순된 결과를 보이고 있고, 이는 코티솔이 연령, 자살 행동의 가족력 및 초기 외상(early life adversity)등과 같은 다양한 요인에 의해 조절되기 때문인 것으로 보인다[23-25]. 실제로 초기외상과 관련된 유전자의 후성 유전적 조절은 HPA 축의 변경과 연관성이 깊다고 알려져 있다[26, 27]. 글루코코르티코이드 수용체 신호전달을 하향 조절하는 단백질을 암호화하는 FKBP5의 특정 서열 변이는 초기외상 환자의 우울 증상 및 자살 행동 증가와 관련이 있으며, 이는 아마도 코티솔 분비의 증가와 불안 특성의 발달로 인한 것으로 추정된다[28, 29].

셋째, 신경영양성 경로에서 또한 자살과의 연관성이 보고되고 있다. 대조군과 비교하여 자살로 사망한 개인의 뇌에서 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 및 NTRK2 (BDNF 수용체 티로신 키나제 B(TrkB)를 인코딩함)와

같은 신경 영양 유전자의 발현이 감소된 것이 확인되었다[30, 31]. 여러 연구에서 자살을 시도한 사람들의 혈청과 자살로 사망한 사람들의 뇌에서 BDNF 발현의 변화가 보고되었으나 그 근본적인 이유는 명확하지 않다[32]. 이러한 BDNF 발현 양상의 변화는 부분적으로는 프로모터의 메틸화를 통한 BDNF 발현의 후성 유전적 조절에 기인하는 것으로 보인다. 프로모터 또는 엑손 4의 메틸기들의 변화가 자살로 사망한 사람들의 뇌와 말초 혈액에서 보고되었다[33, 34]. 자살에서 신경영양성 경로의 변경에 대한 추가 증거로는 자살로 사망한 개인의 뇌에서 TrkB-T1(BDNF 수용체의 성상세포 특이적 변이체)이 miR-185에 의해서 후성유전학적으로 조절되고 있다는 것이다[35, 36].

넷째, 자살 행동에 대한 생물학적인 연구로 글루타메이트성 신호들에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 자살행동과 우울증이 있는 환자에게서는 글루타메이트성 뉴런들의 밀도가 감소하고 뇌의 교세포가 감소하며 해마의 부피가 감소하였다[37-39]. 우울증 환자(대부분 자살로 사망)의 뇌의 청반(locus cerules)에서는 글루타메이트 수송체 발현은 감소한 반면, N-메틸-D-아스파테이트 수용체 발현은 증가되어 있어 글루타메이트 경로가 제대로 조절되지 않고 있음이 보고되었다[40, 41]. GRIN2B, GRIK3 및 GRM2는 다른 원인으로 사망하는 주요우울장애 환자와 달리 자살로 사망한 주요우울장애 환자에서 특이적으로 상향조절되는 것으로 보이는 글루타메이트성 유전자들로 보고된 바 있다[42]. 글루타메이트성 경로는 NMDA 수용체 길항제인 케타민의 강력한 항우울 효과 및 항자살 효과에 관여할 가능성이 있기 때문에 최근 몇 년 동안 특히 관심의 대상이 되고 있다[43]. 케타민의 효과는 성상교세포에 의한 BDNF 분비 억제[44], 해마에서 인슐린 유사 성장 인자 2의 상향 조절[45],

AMPA 및 NMDA 수용체 발현 수준 조절을 포함한 여러 메커니즘을 통해 나타난다고 알려져 있다[46].

마지막으로, 자살과 염증반응과의 연관성에 대한 연구들이 있다. 자살 행동을 가진 사람들에게서 종양괴사인자, IL-6, IL-8 및 IL-1β과 같은 염증성 사이토카인이 증가되어 있음을 확인하는 연구들이 존재한다[47]. 자살을 시도했거나 자살로 사망한 사람에게서 증가된 혈장 IL-6 수준은 충동성 및 폭력적인 자살 시도와 연관되어 있으며 높은 수준의 염증은 성인의 자살 생각과 우울증을 구별하는 도구일 수 있다고 보고된 바 있다[48]. 여러 연구에 따르면 우울증의 전신 염증이 장벽의 비정상적인 투과성과 관련이 있을 수 있으며, 이는 면역 체계에 대한 박테리아 분자 모티프가 노출될 수 있음을 의미한다[49]. 자살 행동과 관련된 다른 분자로는 IL-2 및 혈관 내피 성장 인자가 있으며, 이는 자살 행동이 있는 개인에서 감소한다[47, 50]. 특히 흥미로운 것은 자살 시도의 위험을 증가시킬 수 있는 선충인 *Toxoplasma gondii*에 대한 연구인데, *T. gondii* 감염은 트립토판 가용성 감소, 세로토닌 생합성 감소 및 키누렌산 증가로 이어지며 뇌의 면역 반응을 유발하는 것으로 생각된다[51, 52]. 그 결과 *T. gondii* 감염은 여성에서의 공격성과 남성에서의 충동성과 같은 자살 행동과 관련된 특정 행동 특성을 증폭시킬 수 있다[53, 54].

그러나 앞서 기술한 바와 같이 연구되어온 다양한 생물학적 변화가 자살 및 자살 행동에 특이적인 것은 아닐 가능성은 항상 존재하며, 우울증을 비롯한 기타 정신과 질환과 공유될 수 있다. 또한 표현형 간의 복잡한 관계를 고려할 때 생물학적인 변화와 자실의 인과관계를 증명하기는 매우 어려운 일이다. 그렇기 때문에 지난 20년 동안의 꾸준한 연구에도 불구하고 여러 연구에서 단일 유전자 또는 유전자 그룹이 자살 행동의 원인으로 작용한다는 보고된 바 없다. 자살과

연관된 유전자를 탐구하기 위해 현재까지 소수의 GWAS 연구만들이 자살을 주요 표현형으로 포함하여 수행되었다. 자살 사망은 매우 드문 사건이므로 게놈 전체 연구(GWAS)는 일반적으로 치명적이지 않은 자살 행동을 대상으로 조사하게 된다. 한 연구에서는 총 32개의 단일 염기 다형성 (SNP)을 확인했으며 그 중 여러 SNP가 TBX20 유전자좌와 연관되었음을 확인하였다[55, 56]. TBX20 유전자의 산물은 중추 신경계와 관련이 있다고 알려져 있지만 그 구체적인 역할은 확인된 바 없다. GWAS에서 확인된 유전자와 자살 표현형 사이의 연관성을 확인하는 연구들은 대부분 일관된 결과를 얻지 못했다. 그 이유는 아마도 유전 변이는 자살 행동 표현형의 작은 부분에만 기여하며, GWAS에서 사용되는 상대적으로 큰 샘플에도 불구하고 중요한 유전자좌를 탐지하고 이전 결과를 복제하는 적절한 파워가 부족하였기 때문이라고 생각된다 [57].

자살에 대한 생물학적 기전을 확인하는 데 있어 가장 큰 장애물은 대부분의 기존 연구가 살아있는 자살 고위험 환자(즉, 자살 사고자, 자살 시도자 또는 기분 장애가 있는 환자)를 대상으로 수행되었다는 것이며, 자살 고위험 환자들의 특성은 자살 완료자의 특성과 다를 수 있다는 것이다. 자살시도자와 자살 사망자는 우울 증상에 대해서는 비슷한 양상을 보였으나, 자살 사망자는 자살시도자에 비해서 나이가 많은 남성이 경우가 많았고, 알코올이나 약물을 사용하는 경우가 많았고, 공존 신체 질환을 가지고 있는 경우가 많았으며, 직장을 잃거나 경제적인 문제에 부딪치는 경우가 더 많았다[58, 59]. 두 현상의 생물학적 기반이 다를 수 있다는 가설은 존재하고 있으나, 자살 시도에 비해 자살 사망은 매우 희소한 사건일 뿐만 아니라, 자살 완료자의 뇌에 대한 접근성뿐만 아니라 사후 정신병리를 파악해야 한다는 단점으로 인해 연구하기

매우 어렵다. 뿐만 아니라 사망 자체가 조직의 생물학적 변화를 야기하기 때문에 조직 신선도를 제어하는 것이 하나의 장애물이 될 수 있다. 또한 정신 질환 및 향정신성 약물과 같은 교란 요인으로 인해 사후 연구에서 결과를 해석하기가 어렵다. 고인에게서 수집된 정보는 종종 불완전하여 의미 있는 분석을 방해하는 낮은 통계적 검정력으로 이어지기 쉽다는 특성을 가진다[60]. Ignazio et al.이 수행한 가장 최신의 자살사망자의 사후 뇌조직의 메타분석연구에서는 총 6개의 적격한 사후 뇌 연구 데이터 세트를 연구에 포함하였으며, 각 데이터 세트들의 뇌의 수는 6~43개였다[61]. 그만큼 자살 사망자의 뇌는 샘플 획득이 어렵고, 발견에 늦어 손상되고 부패된 경우가 많아 연구에 사용할 수 있는 가용 샘플을 확보하는 것이 주된 문제이다.

자살 사망자의 뇌를 이용한 사후 연구는 자살의 기저에 있는 생물학적 메커니즘에 대한 보다 직접적인 통찰력을 제공하는 것을 목표로 하고 있지만, 과거의 연구들은 후보 유전자 접근법(candidate gene approach) 이 우세하여 주요 경로의 중요하다고 알려진 단백질만 자살에 대한 바이오마커로서의 후보로써 연구되었다. 앞서 말한 자살과 관련된 BDNF나 수용체 티로신 키나제들이 그러한 예들이다[30]. 그러나 후보 유전자 접근법은 자살과 같은 복잡한 현상에서 범위와 임상 가치가 제한적일 수 있으므로 유전체, 전사체, 단백체 등에 대한 전체 연구가 선호된다[62, 63]. 유전체는 고정되어 있기 때문에 자살과 같은 일시적 충동적 현상을 반영하는 것에 한계가 있어 전통적으로 자살사망자의 뇌를 이용한 전사체 연구들이 대부분이다[61, 64]. 그러나 유전자 발현물들의 반감기가 다르고 전사 후 다양한 수정 과정을 고려할 때 단백질체로의 접근 방법은 유전적 기능 발현을 정량화하고 질병과 관련된 동적 경로 변화를 측정하는 데 더 적합하며, 따라서 자살과 같은 표현형의

연구에 이상적일 것으로 보인다[65, 66]. 하지만 단백질체 연구들은 그 비용과 실험적 어려움을 고려하여 많이 연구되고 있지 않은데, 2022년 2월 13일 기준 Pubmed에서 "suicide", "postmortem", "brain" 및 "proteomics"를 검색하면 5개의 샘플이 포함된 Cabello-Arreola et.al(2020)이라는 단 하나의 연구만 찾을 수 있다[65]. 현재까지 한국인이라는 단일 민족에서 자살사망자의 사후 뇌조직을 이용한 연구는 전무하다.

단백체 프로파일링은 특정 질환에 대한 중요한 단백질이 무엇인지에 대한 정보를 줄 수 있을 뿐만 아니라, 생물학적 경로 분석을 가능하게 함으로써 프로파일링된 단백질이 어떻게 작용하는지, 인접 단백질과 어떠한 방식으로 상호작용하는지를 보여주며 질병 기전에 대한 정량적 정보를 제공한다는 장점이 있다. 적절한 생물정보학 도구를 사용하면 발굴된 단백질에서 기능 및 생물학적 정보를 추출하고 기본 분자 메커니즘에 대한 생물학적 통찰력을 얻을 수 있게 된다. 단백체 프로파일링은 주어진 질병과 관련된 수천 개의 단백질을 동시에 스크리닝하고 정량할 수 있기 때문에 작은 샘플에서 수백 개의 차등 발현 단백질(Differentially Expressed Protein, DEP)을 얻을 수 있게 한다[67, 68].

본 연구에서는 예비연구를 통하여 사후 뇌조직 저장 방식의 확립과 연구 프로토콜 확립을 진행하였고, 대규모 시료를 이용하여 단백체 분석을 수행하여서 통계적인 유의하며 신뢰성이 있는 자살의 생물학적 경로를 발굴하고자 하였다. 다양한 생물정보학적 분석을 통하여, 자살 사망과 연관된 생물학적 경로를 확인하였다. 뿐만 아니라 자살 사망자의 정신과적 진단이나 정신과적 약물 이용, 사망시 알코올 농도 등의 임상 정보로 하위군을 나누어서 추가적인 분석을 진행함으로써 발굴된 단백질 마커들이 자살 사망자의 어떠한

특징들과 연관되어 있는지 확인하였다. 상기 과정을 통하여 자살에 대한 신뢰도 높은 생물학적 바이오마커를 발굴하였다.

제 2장 연구대상 및 방법

제 1 절 연구 대상

자살사망자의 뇌는 서울대학교 법의학교실의 부검 대상자 중에서 수집하였다. 부검 중 법의학 전문가가 자살로 사망하였다고 판단한 경우, 자살사망자의 뇌로 정의하였다. 마찬가지로, 대조군은 법의학 전문가가 돌연사라고 판단단 경우를 대상으로 하였고, 대부분의 경우 사망 원인이 대부분 심장 문제인 경우가 많았다. 사후 간격은 추정 사망 시간과 실제 부검한 시간을 기반으로 계산하였다. 2015.04 ~2021.03까지 수집된 뇌를 대상으로 실험을 수행하였다.

예비 연구에서는 자살사망자의 뇌 시료로의 실험 가능성을 타진하기 위하여 자살자 및 돌연사망자의 사후뇌조직 시료 각 3례씩을 선정하였다. 돌연사망자의 경우 중년의 남성이 많았기 때문에 되도록 성별, 나이를 매칭하여 3례를 선정하였다.

본 연구에서는 예비 연구에서 사용하였던 샘플들을 포함, 23명의 자살 완료자와 13명의 돌연사 대조군으로 총 36개의 뇌 샘플을 가지고 실험하였다. 부검과정 중 배외측 전전두엽 피질(DLPFC, Brodmann 영역 9, 10)에서 채취한 뇌조직 샘플을 −80° C에서 보관하였다. DLPFC는 자살 완료자와 대조군 사이의 입증된 형태학적 차이(예를 들어, 감소된 뇌 부피[69], 뉴런의 밀도[75] 및 신경전달 물질의 차이[70])와 자살 행동이 있는 사람들의 기능 문제들을 고려하여 선택하였다[71].

과거 또는 현재 정신과적 진단 및 치료에 대한 임상 정보는 가족, 가까운 친구

및 경찰의 신고가 포함된 기록들을 바탕으로 추정하였다. 이러한 추정들을 확인하기 부검 당시 채취한 말초혈액을에서 확인된 약물, 알코올 농도 등의 독성학적 선별검사 결과를 참고하였다. 모든 정보는 일차적으로 부검에 참여한 법의학 전문가와 정신과 의사에 의해 평가되었으며, 진단은 두명의 독립적인 경험이 풍부한 정신과 의사에 의해 검토 및 확인되었다.

본 연구 프로토콜은 서울대학교병원 기관심사위원회(IRB No. 2004-216-1119)의 승인을 받았다.

제 2 절 연구 방법

1. pH 측정

pH는 사후 조직의 품질 측정에서 가장 널리 사용되고 있다[60]. 균질액을 얼음 위에서 잠시 식힌 다음 3가지 표준(pH 4, 7 및 10)으로 4° C에서 보정된 pH 측정기(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)로 pH를 측정하였다. 모든 pH 측정은 이중으로 수행되었다.

2. 단백질체 분석을 위한 조직 준비

총 36개의 사후 뇌 조직 샘플을 절제하고 이전에 확립된 샘플 준비 프로토콜을 일부 수정하여 사용하였다[68, 72]. 조직 샘플을 멸균된 인산완충식염수로 각각 10분씩 6회 세척하였다. 세척된 조직을 200μL 용해 완충액(4% SDS, 0.1M TEAB pH 8.5의 2mM TCEP)에서 30초 동안(Sonics & Materials, Newtown, CT, USA) 균질화하고 초음파 처리하였다. 샘플을 100° C에서 20분 동안 인큐베이션한 후 원심분리하여 상층액을 잔해 및 기타 고체 내용물로부터 분리하고 펠렛을 버렸다.

상층액을 0.22μm pore costar filter(Corning Inc., New York, NY, USA)로 옮기고 원심 분리하였다. 단백질 농도는 비신코닌산 환원제 상용성 분석 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정했습니다. 풀링된 단백질 샘플은 모든 샘플에서 34μg 분취량을 혼합하여 준비하였다.

단백질 분해는 아세톤 침전과 필터를 이용한 시료 준비 절차를 결합하여 수행하였다[68, 73, 74]. 분해 단계 전에 풀링된 단백질 시료와 각 조직 시료 300μg을 차가운 아세톤(Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:5(샘플:아세톤, v/v) 비율. 혼합물을 철저히 볼텍싱한 후 -20℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 침전물을 4℃에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 아세톤을 부드럽게 제거하였다. 500 μL의 차가운 아세톤과 원심분리로 추가 헹굼 단계 후, 단백질 펠릿을 2시간 동안 공기 건조시켰다. 아세톤 침전 샘플(1개의 풀링된 조직 샘플 및 36개의 개별 조직 샘플)을 30μL 변성 완충액(4% SDS, 0.1M DTT, 0.1M TEAB, pH 8.5)과 혼합했습니다. 부드러운 볼텍싱 후, 혼합물을 단백질 변성화를 위해 95° C에서 30분 동안 가열하였다. 변성된 단백질을 300μL 0.22μm 기공 여과된 UA 완충액(8M 요소, 0.1M TEAB, pH 8.5)과 혼합한 다음 30kDa 원심분리 필터(Millipore, Billerica, MA, USA)로 옮겨 3회 원심분리(14,000g, 15분, 20° C)하여 SDS를 제거했습니다. 세척된 샘플은 환원된 시스테인을 알킬화하기 위해 실온에서 30분 동안 UA 완충액에서 200 μL의 50 mM 요오도아세트아미드에서 배양하였다. UA 완충액을 40mM TEAB로 교환한 후, 샘플을 37° C에서 18시간 동안 1:100(효소: 기질, wt/wt)의 비율로 0.1μg/μL 트립신/Lys-C로 처리하였다. 펩티드의

양을 추정하기 위해, 295 nm 40의 여기 파장을 사용하여 350 nm에서 트립토판 형광 분석에 의해 조직 소화를 측정하였다.

3. Tandem Mass Tag Labeling

TMT(Tandem Mass Tag) 채널의 수가 제한되어 있기 때문에 4개의 TMT 실험 세트에 36개의 샘플을 나누어 담았다. 모든 샘플들을 무작위로 뽑아서 각 실험 세트에는 9개의 개별 샘플과 하나의 풀링 샘플을 담았다. 라벨링 단계 전에 40mM TEAB 완충액을 각 30μg 펩티드 샘플에 첨가하여 부피를 균일화하였다. 그 후, 동일한 양의 오브알부민을 샘플에 추가했습니다. TMT 시약(0.8mg)은 110μL의 무수 ACN에 용해되었으며, 이 중 25μL는 4개의 실험 세트에서 동일한 채널에 추가되었다. 그런 다음, 38 μL의 ACN을 첨가하여 최종 농도 30%를 만들었고, 그 혼합물을 23℃에서 75분 동안 인큐베이션하였다. 히드록실아민으로 23℃에서 15분 동안 0.3%(v/v)의 최종 농도로 quenching하였다. 한 세트의 TMT 표지 샘플을 모아서 고속 진공 원심분리기에서 동결건조하였다.

4. 샘플 탈염 및 High-pH Reversed-Phase 펩티드 분획

TMT로 표지된 샘플을 0.1% 트리플루오로아세트산에 재용해하고 제조업체의 지침에 따라 HLB OASIS 컬럼을 사용하여 탈염하였다. 300 Extended-C18 컬럼(4.6 mm ID × 25 cm 길이, 5 μm C18 입자)이 장착된 Agilent 1260 bioinert HPLC(Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 고 pH 역상 펩티드 분획을 수행하였다. 펩티드 샘플을 0.4mL/분의 유속으로 15mM 수산화암모늄 중 5%에서 40% ACN으로 60분 linear

gradient로 분리하였다. 샘플을 96개로 분획화하였고, 다양한 소수성을 갖는 24개 분획으로 연결하여 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석(LC-MS/MS) 실행 시간을 최적화하였다. 각 분획을 진공 원심분리기에서 동결건조시키고 -80℃에서 보관하였다.

5. RP-nano- LC-ESI-MS/MS 분석

펩티드 샘플은 Easy-nano LC 1000(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)과 결합된 EASY-Spray ion source(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)가 장착된 Q-Exactive 질량 분석기를 사용하여 분석하였다. 펩타이드는 트랩 컬럼(Thermo Fisher Scientific, 75μm ID × 2cm 길이, 3μm Acclaim PepMap100 C18 비드, 100Å)과 분석 컬럼(Easy-Spray PepMap RSLC, 75 μm ID × 50 cm 길이, 3 μm ReproSil-Pur-AQ C18 비드, 100 Å)으로 구성된 컬럼에서 분리되었다. 샘플 주입 전에, 건조된 펩티드를 용매 A(2% ACN 및 0.1% 포름산)에 재용해시켰다. 펩티드 샘플은 용매 A(2% ACN 및 0.1% v/v 포름산) 및 용매 B(100% 아세토니트릴 및 0.1% v/v 포름산)를 혼합하여 210분 동안 실행된 ACN gradient(6-90%)를 통해 분리하였다. 분석 컬럼에서 용출된 펩타이드는 양이온 모드에서 2.0kV의 스프레이 전압에서 이온화되었다. 질량 스펙트럼은 350-1,700m/z의 질량 범위와 함께 m/z 200에서 70,000 분해능의 상위 15개 방법을 사용하였다. 자동 이득 제어(AGC) 목표 값은 3 × 10^6이었고 MS/MS에 대한 격리 창은 1.2m/z였다. 15개의 가장 풍부한 이온은 m/z 200에서 35,000의 분해능에서 33의 정규화된 충돌 에너지로 더 높은 에너지 충돌 해리에 의해

단편화하였다. MS/MS에 대한 AGC 목표 값은 5 × 10^5이었다다. 동적 배제는 반복되는 시퀀싱을 방지하기 위해 40초로 설정하였다.

6. Computational MS Data분석

원시 MS 파일은 Proteome Discoverer 버전 2.2(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 처리하였다. 탠덤 질량 스펙트럼 검색은 UniProt Homo sapiens 데이터베이스에 대해 SEQUEST-HT 알고리즘을 사용하여 수행되었다 (http://www.uniprot.org). 데이터베이스 검색에 사용된 매개변수는 다음과 같다: 트립신을 사용한 전체 효소 분해(KR/- 이후) 최대 2개의 누락된 절단; 20ppm(단일동위원소 질량)의 전구체 이온 질량 허용오차; 0.02 Da(단일동위원소 질량)의 단편 이온 질량 허용오차; TMT 표지에 대한 라이신 잔기 및 펩티드 N-말단에 대한 229.163 Da의 정적 변형 및 카바미도메틸화에 대한 시스테인 잔기의 57.02 Da의 정적 변형; 및 단백질 N-말단 아세틸화의 경우 42.01 Da의 동적 변형 및 메티오닌 산화의 경우 15.99 Da의 동적 변형이다. 확립된 검색 전략 에 따라 검색 결과는 펩타이드와 단백질을 식별하기 위해 <1%의 FDR(False Discovery Rate)로 필터링하였다. Proteome Discoverer의 "Reporter Ions Quantifier" 노드를 사용하여 리포터 이온 상대 강도를 계산하여 단백질을 정량화하였다. 임계값은 70%로 설정하였다. 생성된 모든 단백질체 데이터는 식별자 PXD029845로 PRIDE 파트너 저장소를 통해 ProteomeXchange 컨소시엄 (http://proteomecentral.proteomexchange.org)에 기탁하였다[75, 76].

7. 통계 분석

자살 완료자와 돌연사의 그룹별 차이를 확인하기 위하여 연속 변수에 대한 경우에는 Mann-Whitney U 검정을 사용하였고, 범주형 변수에 대한 Pearson의 카이-제곱 또는 Fisher의 정확 검정을 사용하였다. Proteomic 데이터의 통계 분석은 Perseus[77]를 사용하여 정규화된 단백질 풍부도를 기반으로 수행하였다. 전체 식별된 단백질은 모든 샘플에서 정량화된 8,035개의 단백질을 기반으로, 통계적으로 유의하게 변경된 단백질을 식별하기 위해 스튜던트 t-검정(P <0.05, Fold Change[FC] >1.2)을 적용하였다. 정규화된 단백질 풍부도는 z-정규화에 이어 계층적 클러스터링을 거쳤다.

확인된 DEP가 자살 자체 또는 기타 관련 임상 요인에 의한 것인지 확인하기 위해 자살사망자를 대상으로 하위 분석을 수행하였다. 자살 사망자는 정신과적 장애의 병력, 향정신성 약물 치료의 병력, 알코올 섭취에 따라 그룹으로 나누었다. p <0.05, FC >1.2인 DEP인 단백질을을 자살 시도자의 하위 그룹에서 확인하였다.

8. 생물정보학 분석

GO(Protein Gene Ontology)는 DAVID 생물정보학 도구(버전 6.8)를 사용하여 확인하였다[78]. GO 분류는 Fisher의 정확 검정에 의해 평가되어 p-값 세트를 얻은 다음 0.05의 컷오프 값에서 필터하였다. 기능 분석에는 Ingenuity Pathway Analysis(IPA)가 사용되었다(Ingenuity Systems, http://www.ingenuity.com/). Fisher의 정확한 검정(P <0.05)을 통해 특정 단백질 세트가 특정 경로와 관련되어 있을 확률을 추정하였다. 각

모듈에 포함된 단백질들을 IPA를 이용하여 네트워크 분석을 진행하였다. GSEA 소프트웨어(GSEA 버전 4.1.0)를 사용하였다.

c5.go.bp.v7.4.symbols.gmt 유전자 세트가 참조 유전자 세트로 선택되었다. WGCNA는 샘플 전체에 걸쳐 유전자 간의 상관 관계 패턴을 이해하는 시스템 생물학 방법으로, 공동 발현된 단백질 및 자살 및 돌연사(R ver. 1.69)와 관련된 모듈을 식별할 수 있다[79]. 그런 다음 고유 유전자를 사용하여 모듈을 요약하고 이러한 모듈과 임상 매개 변수와 같은 샘플 특성 간의 연관성을 조사하였다.

제 3장 연구 결과

1. 참여 대상 및 뇌조직 샘플

예비 연구에서 선정된 뇌 시료에 대한 정보는 [표 1]에 표기하였다. 48세~57세 사이의 남성으로 구성되었고, 자살 사망자 세명의 자살 방법은 각각 추락, 충돌, 익수였다.

본 연구에서는 예비연구를 진행한 6례를 포함하고 있는 23명의 자살 사망자와 13명의 돌연사를 포함하여 총 36개의 사후 뇌 샘플이 사용되었다. 인구 통계 및 임상 정보는 [표 2]에 정리하였다. 자살 사망자의 median 연령은 48세였고, 돌연사의 median 연령은 52명이었다. 자살 사망자와 와 돌연사 사이에는 연령의 평균에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p=0.580). 그러나 자살사망자의 성비는 거의 1:1에 가까웠으나, 돌연사에 의한 사망은 모두 남성이었다. 자살 사망자 중 16명(69.6%)은 익사, 2명(8.7%)이 추락사, 1명(4.3%)가 충돌사, 4명(17.4%)가 목을 매달아 사망하였다. 자살 사망자중 12명(47.8%)은 정신과적 장애가 있었고, 그 중 7명(30.4%)은 조현병, 4명(17.4%)은 주요우울장애를 갖고 있었다. 독성학적 결과로 13명(56.5%)이 아무 향정신성 약물을 복용하고 있지 않았고, 6명은 항정신병약물을, 2명은 항우울제를 복용하고 있는 것으로 나타났다. 자살완료자 중 6명(26.1%)이 자살 당시 술을 마셨다. 자살자의 평균 혈중알코올농도는 0.092(SD=0.023)로 돌연사자와 차이가 없었다. 사후 간격과 측정된 pH에서는 그룹 간에 유의한 차이가 없었다[그림 1]. 각 자살사망자들의 자세한 사망 방법과 약물 복용에 관련된 임상 정보는 [표 3]에 표기하였다.

2. 사후 뇌 조직의 정량적 단백질체 분석

예비 연구에서 자살자 3례 및 돌연사망자 3례, 총 6례의 시료를 고분해능 질량분석기로 분석한 결과 약 8,817개의 단백질이 동정 및 정량되었다[그림 2]. 각 개별 시료에서 정량된 단백질의 개수는 상이하였지만, 평균적으로 8,200여개의 단백질이 개별 시료에서 정량된 것을 확인하였다. 전체 정량된 단백질들의 강도에 대한 Dynamic range를 살펴보았을 때, 조직 시료를 이용한 기존 In-depth profiling 연구의 수준과 비슷함을 확인하였다. 정량된 전체 단백질이 7 orders of magnitude 내에 있었으며, 정량된 단백질의 95%는 4 orders of magnitude 내에 존재하였다 [그림 3]. 자살자 및 돌연사망자의 사후뇌조직 시료에서 정량된 단백체를 이용한 Principle component analysis (PCA)결과, 자살자 시료는 자살자 시료끼리, 돌연사망자 시료는 돌연사망자 시료끼리 클러스터링됨을 확인하였다[그림 4].

본 연구에서는 36개의 사후 뇌 조직 샘플에 대해 정량적 단백체 분석을 수행하였다[그림 5]. 샘플 수가 TMT 채널의 수를 초과했기 때문에 36개의 샘플을 4개의 TMT 실험 세트에 배포하였다. 모든 샘플이 무작위로 분포된 후, 각 실험 세트에는 9개의 개별 샘플과 하나의 풀링 샘플을 포함하도록 구성하였다 [그림 6A]. 총 9,801개의 단백질이 확인되었고, 그 중 8,035개의 단백질 그룹이 36개 샘플 모두에서 성공적으로 식별되었다[그림 6B, 그림 6C]. 정량된 전체 단백질이 6 orders of magnitude 내에 있는 것을 확인하였다[그림 7]. 상자그림을 사용하여 모든 TMT 채널의 log2 변환 강도를 비교하였을 때, 중앙값을 log2로 변환한 강도는 40개 TMT 채널에서 거의 동일했으며, 이는 정량적 분석에 다른 샘플에 대한 편향이 없음을 나타낸다[그림 8A]. 각 TMT 세트에 따른 편향을 평가하기 위해 8,035개의 정량 단백질에 대해 주성분

분석을 수행하였다[그림 8B]. 두 가지 주요 구성 요소가 데이터 내 분산의 각각 11.1% 및 26.9%를 설명하였다. TMT 채널은 TMT 세트에 따라 클러스터되지 않고 무작위로 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 풀링된 샘플의 재현성을 평가하기 위해 4개의 풀링된 샘플 간의 강도 값의 피어슨 상관 계수를 계산하였고[그림 8C], 풀링된 샘플 간의 Pearson 상관 계수(> 0.990)로 정량 분석의 높은 재현성을 확인하였다.

3. 자살 완료자와 돌연사 사이에 차등적으로 발현되는 단백질

예비 연구를 통하여 자살자 및 돌연사망자 사후뇌조직 시료에서 정량된 단백질 중, 6례의 시료 모두에서 정량값을 가지는 7,381개의 단백질에 대해 Student’s t-test를 수행하였다. P-value 0.05 이하의 유의한 차이를 보이는 단백질은 574개였으며, 이 중 126개는 자살자에서 Up-regulation되는 단백질이었으며, 448개는 자살자에서 Down-regulation되는 단백질이었다[그림 9]. 이를 volcano plot으로 [그림 10]에 표현하였다. 실험 프로토콜을 확립하고 이를 본 연구에 적용하였다.

본 연구에 같은 방법을 적용하였을 때, 9,801개의 총 단백질 중 8,035개를 개별 뇌 조직 샘플에서 정량화할 수 있었고, 이들을 통계 분석에 사용하였다. DEP를 식별하기 위해 자살 사망자와 돌연사 그룹간에 Student’s t-검정($P < 0.05$)을 수행하였다. 분석 결과 총 295개의 DEP가 확인되었다. 그 중 돌연사와 비교하여 자살 사망자에서 244개의 단백질이 상향 조절되고 있음을 확인하였고, 51개가 하향 조절되고 있음을 확인하였다[그림 11A]. 자살 사망자와 돌연사 사이의 단백질 발현 FC 차이를 volcano plot으로 시각화하였다[그림 12].

244개의 상향 조절된 DEP들로 Gene ontology(GO) 분석을 수행하였다

[그림 11B]. 세포 내 신호 조절, 세포간 소통, 단백질 국소화 및 신경계 발달이 가장 중요한 생물학적 과정으로 나타났다. 세포 구성 요소중에서는 막 결합 및 세포 외 소포, 뉴런 및 시냅스와 관련된 단백질이 가장 많이 확인되었다. 분자 기능으로는 효소 결합, GTPase 및 포스파타제 활성이 가장 유의하게 풍부하였다. KEGG 분석에서도 도파민성, 글루타민성, GABA성, 콜린성, 세로토닌성, 엔도카나비노이드성 신경 전달 물질 시냅스가 확인되었다.

51개의 하향 조절된 DEP의 GO 분석 또한 유사한 경로를 확인하게 해주었다[그림 11B]. 확인된 세포 구성요소로는 세포 생합성 및 조립, 세포골격 조직, 단백질 복합체 조립 등의 생물학적 과정을 포함하고 있었다. 세포 구성 요소로는 막 결합 소포, 세포 외 소포, 뉴런 부분, 미세 소관 세포 골격 및 세포수지상돌기의 구성요소들이 가장 풍부하게 나타났다. 세포골격 단백질 결합과 항산화 활성이 가장 풍부하게 나타난 분자 기능이었다. KEGG 분석에서 gap junction 이 확인되었다.

4. Ingenuity Pathway Analysis(IPA) 와 Gene Set Enrichment Analysis(GSEA) 분석

IPA분석 결과 엔도카나비노이드 발달 신경 경로, 오피오이드 신호 전달 경로 및 엔도카나비노이드 시냅스 경로를 포함한 다양한 경로들이 자살 사망에 관여하고 있음을 확인하였다[그림 11C]. GABA 수용체 신호 전달 경로, 도파민 수용체 신호 전달 및 도파민-DARPP32 피드백 경로를 포함한 신경 전달 물질 시스템 또한 확인되었다. 엑손 가이드 신호, 시냅스 장기 강화 및 시냅스 생성 경로들 또한 신경 전달 물질 경로와 함께 확인되었다.

GSEA 분석에서 대조군과 비교하여 자살 사망자에서 차등적으로 발현된

유전자 세트, 농축 점수 및 명목 p-값은 [그림 13]에 표기하였다. 시냅스 소포 세포외배출 조절과 신경전달물질 수송은 두 가지 가장 중요한 생물학적 과정으로 확인되었다. 유사하게, 신경 전달 물질 흡수, 카테콜아민 또는 도파민에 대한 반응, 신경 세포 사멸, 투사 및 재생과 관련된 과정들이 발굴된 DEP에서 확인되었다. 대조적으로, 세포 사명 신호 전달 경로의 양적 조절 및 단백질 국소화의 유지와 관련된 경로는 하향 조절되는 것으로 확인되었다.

5. Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) 분석

모든 샘플을 이용한 계층적 클러스터링 덴드로그램은 [그림 14A]에 표기하였다. 우리는 공동 발현 네트워크(R^2 = 0.7)를 구성하기 위해 소프트 임계값으로 β = 12를 사용하였다[그림 14B, 그림 14C]. 네트워크 인접 행렬을 계산하기 위해 Topological Overlap Matrix(TOM)이 계산되었고, TOM 거리(dissTOM = 1 - TOM)를 기반으로 계층적 클러스터링을 수행하였다. 최적의 클러스터 세트는 동적 나무 절단으로 얻었고, 밀접하게 상관된 클러스터는 자동 클러스터 병합 기능을 사용하여 병합하였다[그림 15A]. 그 후, WGCNA 분석을 사용하여 15개의 공동 발현 모듈을 식별하였다[그림 15B].

데이터 세트에는 두 개의 매우 큰 모듈(파란색 및 청록색)과 여러 개의 작은 모듈을 확인할 수 있었고, 내부의 유전자의 발현 수준이 강한 상관 관계가 있음을 확인하였다[그림 15B]. 파란색 및 청록색 모듈은 각각 자살 및 돌연사 그룹에서 가장 큰 Pearson 상관 계수를 보였다. 이후 IPA 네트워크 분석을 통해 파란색과 청록색 모듈에서의 돌연사 및 자살사망과 연관된 네트워크를 확인하였다. 자살 그룹과 가장 큰 상관관계가 있는 파란색 모듈의 154개

단백질을 사용하는 상위 네트워크는 신경계 발달 및 기능으로 나타났다. 네트워크의 각 단백질들은 단백질 중요성(protein significance, PS) 및 모듈 구성원(module membership,MM) 간에 좋은 상관관계가 있었다[그림 16]. 신경계 발달 및 기능 네트워크에 포함된 단백질은 표준 경로, 신경 전달 물질 신호 전달 및 뉴런 발달과 관련이 있었다. 자살에 대한 유의성이 가장 높은 단백질은 CAPNS1, CDC42, PTP4A2, CD46 및 CSNK2B였으며 CREB1, ERF 및 NF-KB와 연결되어 있음을 확인하였다.

돌연사 그룹과 가장 큰 상관관계를 가진 청록색 모듈에서 393개의 단백질을 사용한 상위 네트워크는 유기체 손상 및 이상이었다. 네트워크의 각 단백질은 높은 PS 및 MM 값을 보여주었다[그림 17]. 유기체 손상 및 이상 네트워크에 포함된 단백질은 다양한 기관의 기능 장애 및 세포 사멸과 관련된 경로 및 기능과 연관되었다.

6. 임상적 요인에 따른 하위 그룹 분석

하위 그룹 분석에서 임상적 특징(예: 정신 질환, 향정신성 약물 사용 및 알코올 섭취)과 관련된 특정 단백질을 자살사망자 군 내에서 확인하였다[표 4]. 자살과 돌연사를 비교하여 얻은 DEP 목록과 관련하여 몇 가지 공통적으로 나타나는 단백질이 존재했다. 예를 들어, GSTT1은 정신 장애를 가진 자살 사망자에서 확인되었고, ABRACL 및 UBE2D3은 조현병을 가진 자살 사망자에서 확인되었다. 항정신병제를 복용한 사람들 사이에서 COL4A1과 CD82가 확인되었다. 그리고 RPS4Y1, S100A10, MRGPRF는 사망 당시 알코올을 섭취한 사람들 사이에서 확인되었다.

제 4장 고찰

본 연구에서는 사후 뇌 조직을 사용하여 자살 사망 그리고 돌연사와 관련된 단백질 프로파일을 확인하였다. 다양한 생물 정보학적 도구를 사용하여 endocannabinoid 경로, GABAergic 경로, 세포 변성, 세포자멸사 및 관련 세포골격 구조적 변화를 포함한 다양한 자살 사망과 관련된 새로운 경로들을 발견하였다.

1. 자살사망과 관련되어 발굴된 생물학적인 경로의 의미

본 연구에서 발굴된 다양한 경로 중에서 endocannabinoid 시스템은 정동 장애의 조절 역할로 인해 점점 더 많은 관심을 받고 있는 경로 중 하나이다. 이전 연구에 따르면 우울증이 있으며 자살 충동을 느끼는 사람의 DLPFC에서 1형 카나비노이드 수용체(cannabinoid receptor type 1, CB1) 및 CB1 매개 G-단백질 활성화가 더 높은 것으로 나타났다[80]. 메커니즘적으로 CB1 및 카나비노이드 수용체 유형 2 수용체(cannabinoid receptor type 2, CB2)는 GABA 및 글루타메이트와 같은 신경 전달 물질의 시냅스 전 방출을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이는 여러 신경전달 경로들이 상호작용하고 있는 것을 반영한다[80, 81]. 본 연구에서는 다양한 생물정보학 분석을 사용하여 체내 카나비노이드 시스템과 관련된 경로를 식별할 수 있었다. 카나비디올은 염증, 스트레스 및 기타 불균형에 반응하고 BDNF-TrkB 신호 전달 경로를 통해 내측 전전두엽 피질의 시냅스 가소성을 빠르게 매개하는 뇌 유래 신경 자극 인자(BDNF)와 상호작용한다는 사실 또한 엔도카나비노이드 시스템이 신경

발달 및 시냅스 생성과 관련이 있다는 결과를 지지한다[82]. 본 연구에서 밝혀진 여러가지 생물학적 변화들이 자살 관련된 적응의 메커니즘인지 병리학적 과정인지는 정확히 알기는 어려우나, 자살에 대한 유력한 바이오마커 후보로써 체내 카나비노이드 시스템을 고려할 수 있음을 반증한다.

기존 연구들에서 자살 시도자에서 유전체, 그리고 전사체 연구에서 GABA성 변경이 보고된 바 있지만[83-85] 아직까지 그에 대한 단백질체학적인 증거는 거의 없다. 자살 희생자와 대조군의 전두엽 피질에서 GABA A mRNA 발현을 비교한 한 연구에서는 자살 희생자에서 $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ 및 δ mRNA의 발현 감소를 발견된 바 있고[86], 이는 후성유전학적 메틸화 패턴과 관련이 있을 수 있다고 알려져 있다[87]. 아직까지 사람의 자살 연구의 단백질체 연구는 존재하지 않지만 마우스 모델의 단백체 분석에 따르면 Proteomic 분석에 따르면 전전두엽 피질의 PKA 및 GABA 수용체 경로가 canonical pathway로 확인된 바 있다[85]. 사람의 자살관련 단백질체학 결과에서의 GABA pathway는 동물 연구 결과와 결부되어 자살의 중요한 생물학적 바이오마커로의 가능성으로 조명받고 있다.

뿐만 아니라, 본 연구에서 보고된 생물학적 경로에는 세포 변성, 세포자멸사 및 관련 세포골격 구조적 변화가 포함되었고, GO 분석에서 세포 구성 요소의 생합성 및 조립과 관련된 DEP가 하향 조절된 경향을 보였다. 유사하게도, 자살사망자 그룹에서 세포 사멸 신호 경로의 양성 조절의 하향 조절과 뉴런 사멸의 양성 조절이 상향조절 되고 있다는 IPA 분석에서도 재현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 WGCNA 분석 결과에서는 자살사망자에서 가장 유의하게 변화하는 단백질로는 기존에 신경 보호 역할을 하는 것으로 제안된 CAPNS1(Calpain Small Subunit 1)[88], 주요 우울 장애 및 정신 분열증과

같은 정신 장애의 바이오마커로 밝혀진 CSNK2B 및 PTP4A2가 포함되었다[89]. 이들은 세포 사멸 및 신경 염증에서 핵심적인 역할을 하는 NF-κB 경로와도 관련이 깊은 것으로 확인되었다 [90-93]. 이러한 경로들의 차이를 고려하였을 때, 자살사망자에서는 뉴런의 사멸 및 그로 인한 염증 반응이 이루어졌을 가능을 시사하며, 이것은 대조군과 비교하여 Brodmann 영역 9 에서 감소된 신경 세포 밀도와 자살 시도자의 감소된 미세아교세포 밀도를 발견한 이전 연구와 일치하는 결론이다[94]. 어떠한 세포 유형이 세포 사멸에 참여하여 자살 사망자의 뇌를 구조적 및 공간적으로 바뀌게 만드는지를 확인하기 위해서는 좀더 정밀한 후속 연구가 계획되어야 할 것으로 보인다.

2. 기존 연구들과의 비교분석

본 연구 결과의 신뢰성을 확보하기 위해 다른 생물정보학적 연구들과의 비교분석을 실시하였다. 단백체학 접근법을 사용한 가장 최근의 사후 뇌 조직 연구에서는 Nano-Flow Liquid Chromatography-Electrospray Tandem MS를 통한 proteomics 방법을 사용하여 자살 및 비자살 그룹의 5개 샘플에서 5644개의 단백질을 확인하였다[65]. 정량적으로 비교해 보았을 때, 본 연구에서는 8035개의 단백질을 확인하였고, 비교분석을 해본 결과, 두 데이터 세트에서는 4337개의 단백질들이 중복되어 있었다. 중복되는 단백질들을 양적으로 비교하기 위하여 [그림 18A]에 표현하였다. 단백체학 실험에서는 수없이 많은 조건들이 가변적임을 고려할 때, 다른 연구에서 유사한 자살 관련 단백질이 확인된 것은 실험의 타당성을 보여주고 있으며, 나아가서 본 연구에서는 더 많은 단백질이 확인되었기 때문에 기존 연구에 비해 더욱 가치있다고 볼 수 있다.

추가적인 비교 분석을 위하여 자살사망자의 뇌를 대상으로 한 과거의 두 연구에서 발견된 기능적 경로를 비교해 보았다[65, 95]. 신경 전달 및 시냅스 신호 전달/재형성과 관련된 많은 경로가 겹치는 것을 확인할 수 있었다 [그림 18B]. 다양한 경로 중에서 endocannabinoid 신호 전달 경로와 GABA 수용체 신호 전달 경로가 가장 유의하게 겹치는 것을 확인할 수 있었다.

이번 연구에서 발굴된 다양한 바이오마커들을 cell type별로 어디에서 발현되는지를 2018년 Andrew T. McKenzie 등에 의해서 보고된 기존 연구의 뇌 세포 유형별 유전자 발현 및 공동 발현 네트워크 데이터베이스와 비교해 보았다[96]. 본 연구에서 확인한 295개의 DEP들 각각이 어느 cell type에서 발현되고 있는지 확인하기 위하여 enrichment score를 [그림 19A]에 표기하였다. DEP의 다수는 neuron에 위치하고 있는 경우가 많음을 확인할 수 있었다.

[그림 19E]에서 뉴런 specific하게 나타나는 마커들의 세부 목록을 확인할 수 있다. 여러 단백질 중 가장 fold change가 크게 나타난 것은 SCG5, PPP3R1, TUBA3A, DYNLT3 이었다. SCG5의 경우, neuron에 위치하고 있다는 것 자체가 매우 흥미로웠는데, 이 단백질은 신경내분비 기능에 중요한 샤페론 단백질을 암호화하고 있다. SCG5의 경우에는 후성유전체적인 관점에서 매우 큰 관심을 받고 있다. SCG5 유전자는 다음 세대로 전달되는데, 산모의 힘든 아동기 경험과 신생아 SCG5 DNA 메틸화 사이의 연관성이 있음이 증명된 바 있다[97, 98]. 아동기 경험이 자살시도와 유의한 상관관계가 있으며, 세대를 거쳐서 대물림 될 수 있다는 것은 기존 연구에서 재현되고 있다 [99, 100]. SCG5는 뉴런 안에서 후성유전체적 변화로 발현의 차이가 나게 되며 자살 관련 pathway의 주요 마커로 작용할 가능성이 있다. 세포 하나의 개별 전사체를

분석할 수 있는 기술이 발전하면서 세포 유형별 유전자 발현되는 정도의 차이를 확인하는 것이 매우 중요해졌다[101, 102]. 이전 연구들에서 bulk RNA 시퀀싱을 사용하여 정상 뇌에서 각 세포별 유전자를 식별하고 확인하기 위한 생물 정보학적 기법들이 제시되어 왔다[96, 103]. 세포 타입별로 가장 유의한 차이를 보였던 마커를 선정하여 항체 염색을 수행함으로써, 이들의 생물학적인 역할을 구체화하고, 자살 사망자에서 왜곡된 해부학적인 변화를 탐지해내는 것이 가능할 것으로 보인다.

3. 자살사망 위험 요인과의 연관성

본 연구의 주요 관심사는 확인된 DEP가 복잡한 현상인 자살 사망과만 연관성이 있는지, 아니면 자살의 다른 위험 인자나 치료 결과와 관련이 있는지 여부이다. 이를 확인하기 위하여 자살 사망자 내에서 여러 가지 임상 정보들을 바탕으로 하위 그룹을 나누어 분석을 진행하였다.

첫째, 정신 장애가 있는 것이 본 연구의 결과에 영향을 미쳤는지 여부를 입증하기 위해 대조군 vs.정신 장애가 없는 자살사망군, 그리고 대조군 vs. 정신장애가 있는 자살사망군 두 가지를 비교하였다[그림20A, 그림 20B]. 두개의 각 그룹 비교에서 확인된 DEP들은 정신 장애 유무와 관계없이 자살사망 대 대조군에서 발견된 DEP들과 비교해 보았을때 대부분 중복되는 것을 확인할 수 있었고, 이는 본 연구에서 발된 단백질들이 정신장애와 독립적으로 자살 그 자체와 관련되어 있음을 간접적으로 보여주고 있다. 둘째, 자살 사망자 내에서 구별되는 임상 특성 군을 비교함으로써, 자살 사망자와 대조군을 비교하였을때 확인한 DEP가 자살 자체에 대한 것일 뿐만 아니라 자살의 주요 위험 인자(이를테면, 정신과적 장애)에도 주요 조절 경로에 관여할 수 있음을 추가로

확인할 수 있었다. [표 4] 에서 보이듯이, GSTT1 및 S100A10은 자살 완료 및 자살 위험 요인 모두와 관련이 있을 가능성 있는 후보 단백질로써, 둘 모두를 가지고 있는 사람들을 선별하는데 작용할 수 있다.

GSTT1은 산화 스트레스에 대처하는 역할을 하며, 정신과적 장애를 가진 자살 완료자 사이에서 바이오마커로 확인된 바 있다. GSTT1의 유전자 다형성은 기존에 정신분열증, 양극성 장애 및 기타 기분 장애의 주요 바이오마커로 알려져 있다[104-106]. 이는 자살과 다양한 정신과 질환들의 생물학적인 배경이 중복될 수 있음을 시사한다. 흥미롭게도, 산화 산물의 축적은 자살 및 정신 장애 모두가 세포 사멸 경로와 관련되어 있으며[107] GSTT1이 자살 및 정신 장애 모두에서 세포 사멸과 관련된 생물학적 경로에서 중요한 역할을 수행하며, 뉴런 변성과 같은 거시적인 변화를 유도할 수 있음을 시사한다.

S100A10은 세로토닌 1B 및 글루타메이트 수용체 기능을 조절하는 단백질이며 많은 이전 연구에서 자살과 관련이 있다고 알려져 있다[108, 109]. 마우스 모델에서 알코올 중독은 S100A10의 전사체 변화를 유도하기도 했다[110]. 다시 말해 S100A10은 알콜 사용 장애와 자살사망의 공통적인 바이오마커로 사용될 가능성이 있다. 임상적으로 알코올 사용 장애가 있는 사람들의 자살 시도는 높은 충동성 및 폭력성과 같은 특성들을 보이기 때문에 확인하는 것이 필요하다[111]. 생물학적 선별 도구, 또는 치료제 개발에함에 있어 자살에 공통적으로 관여하는 생물학적 경로와 알코올 사용 장애와 같은 질환과의 임상적 중첩을 고려한 자살 위험 인자를 표적으로 삼는 것이 효과적일 것이다. 그런 의미에서 GSTT1 또는 S100A10은 향후 임상 연구에서의 유망한 표적이 될 수 있을 것이다. 다만 말초 혈액과는 일치하지 않을 수 있기 때문에 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

4. 연구의 제한점

4.1. 작은 표본 크기

작은 표본 크기는 통계적 검정력, 특히 하위 그룹 분석에 영향을 미쳤을 가능성이 높다. 자살사망자의 뇌를 수집하는 것은 굉장히 어려운 일이다. 가용할 수 있는 뇌의 개수가 많아진다면, 더 많은 주제들을 가지고 나이 연령이 매치된 뇌를 선별하여 연구를 진행하는 것이 가능할 것으로 보인다. 매치를 세분화하여 할 수 있게 된다면 연구의 검정력을 증가시키고 더 작은 표본 크기를 허용할 수 있게 될 것이다. 최근의 사후 뇌조직 연구들은 일반적으로 진단 그룹당 15명의 이상의 큰 샘플을 사용하는 경우들이 많다.

최근 세계 곳곳에서 잘 정립된 뇌 은행들이 생기기 시작하면서 더 많은 개수의 고품질의 샘플을 더 쉽게 사용할 수 있을 것으로 조망된다. 뇌 은행들의 목적은 인간의 중추신경계의 기능과 질병에 대한 연구를 촉진하기 위해 생전 정보를 수집하고, 사후 인간의 뇌를 수집하는 것이다. 사후 뇌조직 연구를 통하여 알츠하이머 병과 파킨슨 병을 포함한 많은 질병의 병태생리를 밝혀 낼 수 있었다. 그러나 비교적 나이가 많은 시기에 발생하여 예상되는 코스를 거쳐서 진행되는 신경퇴행성 질환과는 달리, 자살의 경우는 젊은 나이에 아무도 예상하지 못한 상황에서 급격하게 발생하는 사건이다. 뿐만 아니라 자살의 과정에서 뇌의 다양한 손상을 유발하기 때문에 (예를 들어, 목맴의 경우에는 hypoxic damage가 나타날 것이며, 추락이나 충돌사의 경우에는 뇌에 물리적인 손상이 생길 수 있다) 자살관련 사후 뇌조직을 연구하는 것은 더욱 어려울 수밖에 없다. 해외의 자살 관련 사후 뇌를 수집하고 있는 뇌은행으로는 Douglas – Bell Canada Brain Bank 가 존재하며, 자살의 경우에는 퀘백 주의 Coroner’s office(검시관)과의 협력 하에 뇌를 수집하고 있는 것으로 소개하고

있다 (https://douglas.research.mcgill.ca/douglas-bell-canada-brain-bank). 뇌의 샘플 크기를 증가하게 하기 위해서는 기증자 프로그램, 의료법적 부검, 네트워크 뱅킹을 포함한 새로운 전략은 물론 윤리 및 홍보에 대한 새로운 방안의 마련이 필요하다.

4.2. 표준화된 진단 과정의 부재, 교란 요인

이번 연구에서는 임상 정보 확인을 위한 진단 과정에 표준화된 진단 평가 방식을 적용하지 않았기 때문에 진단의 신뢰도에 대한 우려가 제기될 수 있다. 특히 서양의 연구들과 비교해 보았을 때 현저하게 진단율이 떨어지는 것에 대해서 문제를 제기할 수 있는데, 일례로 미국에서는 자살 사망자의의 10%만 정신과적 진단을 가지고 있지 않다[112]. 그러나 중국, 일본, 한국 등 동아시아 지역에서는 서양과 비교하여 자살자의 34.5~61.8%에서 정신과적 진단이 없는 것으로 알려져 있다[113-115]. 본 연구에서는 자살 사망자 중 53.5%가 정신과적인 진단을 받지 않았고, 이는 연구 진단 과정의 절차적인 문제로 진단이 되지 않은 케이스들이 포함되었을 가능성도 있지만, 동양의 다른 나라들과 비교해 보았을 때 합리적인 수준으로 보인다. 물론 정신장애가 대조군에서 배제되지 않았을 가능성이 남아 있으며, 양극성 장애를 가진 일부 환자는 우울 삽화의 공통된 정신병리로 인해 주요 우울 장애를 갖는 것으로 잘못 분류되는 문제들은 남아있을 수 있다.

자살의 경우 과거 자살시도력이 가장 중요한 예측 변수로 작용하나[4], 과거 자살 시도력에 대해서는 가족들이 잘 알지 못하는 경우가 많다. 자살에는 환자의 impulsivity가 작용하는 경우가 많은데[116], 사망 이후에는 자살에 impulsivity가 크게 작용하였는지, 아니면 정신과적인 증상이 작용하였는지

판단하는 것이 쉽지 않다. 또한. 실제 자살의 intention이 어느 정도 있었는가에 대해서도 보호자들에게서 얻기 힘든 정보이다. 살아있는 연구대상자에게는 Barrat Impulsive Scale (BIS)[117]와 같은 도구를 적용하여 평가할 수 있지만 사망자에게서의 연구는 어렵다. 본 연구에서는 가족, 친구, 경찰 정보 등의 제한된 자료와 약독물학적 자료에 의존하여 환자의 상태를 판단하였다는 것이 한계점으로 작용할 수 있겠다. 자살시도와 자살사망을 연결지어 그 위험을 분석하기 위해서는 과거력에 대한 정보를 자세히 얻을 수 있는 방법론적인 수정이 필요할 것으로 보인다.

현재까지 사망 이후 고인에 대한 정보를 얻는 방법으로는 심리적 부검 방법이 있다. 서양에서는 일찍이 자살로 판명된 사례에서 사망자의 특징을 총체적으로 규명함으로써 자살의 위험요인을 파악하기 위한 체크리스트를 개발해 왔다[118]. 의도(intent)와 자의성(self-inflicted)를 고려한 자살 판정에 대한 조작적 범주(Operational Criteria for the Determination) 22문항이 있으며[119], 경험적으로 추가로 확인하는 것이 필요하다고 여겨지는 33개의 문항들을 추가한 총 55개의 문항들 중에서 자살과 가장 밀접하게 관련된 것으로 추려진 16개 문항으로 구성한 자살형태 사망 판정을 위한 경험적 범주(Empirical Criteria for the Determination of Suicide Manner of Death)가 있다[120]. 우리나라에도 중앙심리부검센터에서 전국 단위로 심리부검을 시행하고 있다. 객관적인 심리부검면담도구를 개발하고자 한국형 심리부검 체크리스트(Korea-Psychological Autopsy Checklist : K-PAC)을 제작하여 현재 K-PAC 3.0버전까지 개정하였으며, 전국 단위 심리부검 면담체계를 구축하고 심리부검 전문요원을 양성함으로써 심리부검의 활성화 및 확대 시행에 기여하고 있다. 또한, 전산화된 자료 수집 및 관리 체계(K-PAC

eCRF)를 새롭게 구축하여 자료 관리 및 면담자 간의 평정의 오류를 줄이기 위해 노력하고 있다[121]. 뿐만 아니라 중앙심리부검센터에서는 대상 및 집단의 특성에 맞춘 자살예방대책을 마련하기 위하여 집단 특성을 반영한 표적화된 심리 부검면담 프로토콜을 개발하는 등 지속해서 심리부검면담의 고도화 작업을 진행하고 있다. 추후 자살사망자를 연구할 때에는 이와 같은 프로토콜을 적용하여서 조사할 수 있다면 더욱 양질의 정보를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

향정신성 약물에 대해서도 toxicologic data에 의해서만 평가하였는데, 이에 대해서도 고찰해볼 필요성이 있다. 정신과 질환을 앓고 있는 사람들은 대부분 향정신성 약물을 투여하게 되는데, 이들은 대개 다양한 신경 전달 물질 수용체와 수송체들에 광범위하게 영향을 미친다고 알려져 있으며, 약물 치료 후 유전자 발현의 유의한 변화를 일으킨다[122-124]. 현재 약물을 복용하고 있는지에 대해서는 확인이 가능하지만, 환자가 사망하기 전 일정 기간 동안 약물을 "오프" 한 경우에는 확인이 어렵다. 그러나 몇 주 또는 몇 달 동안 항정신병 약물을 중단하는 것이 이러한 약물에 의해 유발된 신경가소성 변화가 사라지는지는 판단하기 어려우며, 약을 중단하더라도 변화가 지속될 수 있다. 이러한 한계를 극복하기 위하여, 약물에 대한 전체 평생 노출 정도를 chloropromaizne equivalent로 바꾸어 두뇌의 형태 변화와의 상관 관계 분석을 하려는 시도들이 있어 왔다[125]. 그러나 약물에 대한 평생의 노출에 대한 데이터는 대부분의 경우 얻을 수 없으며, 중증 정신 질환 환자들의 낮은 순응도를 고려할 때 정확한 확인은 거의 불가능하다[126]. 향정신성 약물의 효과를 평가하기 위해서 동물 모델들을 사용하는데, 설치류나 영장류를 이용하여 기간에 따른 뇌의 변화를 확인하는 과거 연구들이 존재하지만[127, 128], 인간에 대한 연구는 현실적으로 불가능하다.

또한, 연구에서 예상하지 못한 다양한 교란 요인들이 영향을 미쳤을 수 있다. 경찰과 사망자의 가족으로부터 입수할 수 있는 모든 임상 정보를 얻으려고 노력하였으나, 직접 정신과적인 면담을 진행하지 않았기 때문에 대상자의 상태에 대해서는 여전히 파악하기 어렵다. 단백질 발현의 차이가 주어진 정보(예: 정신 질환, 약물 또는 알코올 섭취)에 의해 영향을 받는지 여부를 결정하기 위해 여러 하위 그룹 분석을 수행했지만, 발견되지 않은 동반 질환과 같은 기타 예측할 수 없는 교란 요인이 결과에 영향을 미쳤을 수 있다(예를 들어, 폭식 장애, 물질 사용 장애, 알코올, 니코틴 및 불법 약물과 같은 물질의 만성적 사용 등). 여러 수집되지 않은 정보들이 우리가 발견한 생물학적 경로 – 이를테면 엔도카나비노이드 경로– 에 영향을 미칠 수 있다는 점을 고려할 때, 그것들은 교란인자로 작용했을 수 있다. 마지막으로 본 연구에서 발굴한 여러 생물학적인 경로들과 자살시도의 관계가 인과관계가 있다고 단정짓기는 어렵다.

4.3. 샘플 수집 과정에서의 편향

첫째로, 현재 샘플 수집 과정에서 나타나는 성비 문제가 있다. 이미 이전의 역학연구에서 나타난 바와 같이 돌연사에 대한 남성이 우세하여 대조군 샘플을 수집하는 데 한계가 있었다[129, 130]. DEP가 샘플 간의 불균형한 성별 차이가 아니라 자살사망 자체에 의한 것인지 확인하기 위하여, 통계적으로 유의한 바이오마커를 선택하기 위해 남성 자살사망자와 남성 돌연사에서 발굴된 DEP를 비교하였다. 남성만을 비교하였을 때 282개의 DEP를 확인하였다[그림 20C]. 결과는 남녀 모두 포함된 자살 사망자와 돌연사를 비교하였을 때 얻은 DEP의 결과와 매우 유사하였다. 251개 단백질(77%)이 [그림 20C]에 표시된 것처럼 겹치는 것이 확인되었다. 상향 조절된 단백질과 하향 조절된 단백질들도 대부분

겹치는 것을 확인할 수 있었다 [그림 20D, 그림 20E]. 이와 같은 결론을 토대로 보았을 때, 자살과 돌연사 사이의 단백질 발현의 차이가 성별에 기인한 것이 아니라 자살 자체에 기인한다는 결론을 내릴 수 있었다. 대조군과 자살사망을 비교하는 DEP에 성별이 최소한의 영향을 미쳤다는 추론을 기반으로 생물정보학 분석에서는, 남녀를 포함한 자살 사망자와 돌연사 사이에서 확인된 295개의 DEP를 사용하였다. 자살의 성별 차이에 대한 추가적인 연구는 여성 대조군을 추가적으로 모아서 진행하는 것이 필요하겠다.

둘째 한계점은 부검에서 수집한 접근 가능한 사후 뇌만을 사용할 수 있다는 것 자체가 주는 편향의 문제이다. 우리 표본에서 대부분의 자살은 익사로 인한 것이었다. 그러나 한국 자살의 50% 이상은 목맴이었다[131]. 대부분의 자살 사망자의 경우 익사하였기 때문에 비교적 낮은 수온이 부패 과정을 늦추어 사후 뇌를 사용한 다른 이전 연구보다 사후 간격(postmortem interval)이 더 길게 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 조직의 질을 확인하기 pH를 측정하였다. 다양한 자살 방법들이 존재하기 때문에, 사후 간격을 객관적으로 측정하기 위해서는 향후 연구에서 대사 프로파일링과 같은 실험적 방법을 채택하여 각 자살 방법별 다양한 방식을 시도하는 것이 좋겠다[132].

5장 결 론

이번 연구는 한국인의 사후 뇌에 단백질체학 접근법을 최초로 적용한 연구이다. 총 36개의 비교적 많은 갯수의 사후 뇌 샘플이 수집되었고, 고분해능 mass spectroscopy를 사용하여 TMT 기반 정량화를 진행하여 9,802개의 단백질을 동시에 식별하고 정량화했다. 이는 지금까지 문헌에서 보고된 가장 많은 수의 단백질이다. 또한 기존의 여러 생물정보학 도구를 사용하여 자살 사망과 관련된 잠재적인 생물학적 경로로 체내 카나비노이드 경로, GABA 경로, 및 세포 변성, 세포 사멸사 및 관련 세초 골격 구조적 변화들을 확인할 수 있었고, 관련된 단백질들(CAPNS1, CSNK2B, PTP4A2)을 포괄적으로 밝힐 수 있었다. 뿐만 아니라 여러 하위 그룹 분석을 통해 자살의 가장 중요한 위험 요소 중 하나인 정신질환의 유무와 관련하여 유의한 차이를 보이는 단백질로는 GSTT1이 있었으며, 알코올 사용장애와 연관되어서는 S100A10을 유의미한 바이오마커로서 제시하였다. 이 연구에서 밝혀진 경로는 자살의 생물학적 근거를 설명할 수 있는 강력한 후보로 추가적인 연구 방향을 제시하는데 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

[표 1] Suicide completers and sudden death samples used in pilot study

Suicide		
Sex	Age	Type of suicide
Male	50	Fall down
Male	55	Crashing
Male	57	Drowning
Sudden death		
Sex	Age	
Male	48	
Male	51	
Male	52	

[표 2] Clinical characteristics of suicide completers and sudden death group.

Characteristic	Suicide (*N*=23)	Sudden death (*N*=13)	*P*
Age, median	48	52	
Sex, No. (%)			0.001
Male	11 (47.8)	13 (100)	
Female	12 (52.2)	0 (0)	
Type of suicide, No. (%)			
Drowning	16 (69.6)	–	–
Fall down	2 (8.7)	–	–
Crashing	1 (4.3)	–	–
Hanging	4 (17.4)	–	–
Psychiatric disorder, No. (%)			0.112
Schizophrenia	7 (30.4)	2 (15.4)	
Major depressive disorder	4 (17.4)	0 (0)	
None	12 (52.2)	11 (84.6)	
Psychotropic Medications, No. (%)			0.264
Antipsychotics	6 (26.1)	1 (7.7)	
Antidepressants	2 (8.7)	0 (0)	
Analgesics	1 (4.3)	0 (0)	
Hypnotics	1 (4.3)	0 (0)	
None	13 (56.5)	12 (92.3)	
Alcohol intake at death, No. (%)			0.439
Yes	6 (26.1)	5 (38.5)	
No	17 (73.9)	8 (61.5)	
Alcohol concentration at death (mg/dl), mean(SD)	0.092 (0.023)	0.085 (0.049)	0.931 §
Postmortem interval, mean(SD)	52.0 (22.9)	45.8 (19.4)	0.711 §
pH, mean (SD)	6.88 (0.19)	6.75 (0.38)	0.239 §

SD, standard deviation; § Mann Whitney U test

[표 3] Detailed clinical characteristics of suicide completers

No.	sex	age	type of suicide	alcohol (mg/dl)	psychiatric disorder	medication	PMI
1	M	37	drowning	–	schizophrenia		67
2	F	29	hanging	–	–		48
3	M	44	drowning	–	schizophrenia(7YA)	risperidone, chlorpromazine	72
4	F	34	drowning	0.097	–		86
5	F	45	drowning	–	schizophrenia	levetiracetam, benztropine, haloperidol	24
6	M	32	fall down	0.124	–		–
7	F	46	drowning	–	depressive disorder(7YA)		67
8	M	35	hanging	–	–		–
9	F	48	drowning	–	–		48
10	M	50	fall down	–	schizophrenia(20YA)	risperidone	44
11	F	34	drowning	–	–		21
12	M	57	drowning	0.056	schizophrenia	risperidone, haloperidol, diazepam, benztropine	35
13	M	66	drowning	0.1	–	tramadol	19
14	F	55	drowning	–	depressive disorder(10YA)	fluoxetine, trazodone, alprazolam, clonazepam	67
15	M	55	crashing	–	schizophrenia	risperidone	48
16	F	34	drowning	–	–		–
17	F	62	drowning	–	–		24
18	M	70	drowning	0.073	–		–
19	M	58	hanging	0.1	–		24
20	F	32	Hanging	–	–	zolpidem	90
21	F	64	drowning	–	depressive disorder(2YA)		48
22	M	67	drowning	–	schizophrenia	risperidone, trazodone, benztropine	90
23	F	68	drowning	–	depressive disorder	bupropion, diazepam, diphenhydramine, quetiapine	66

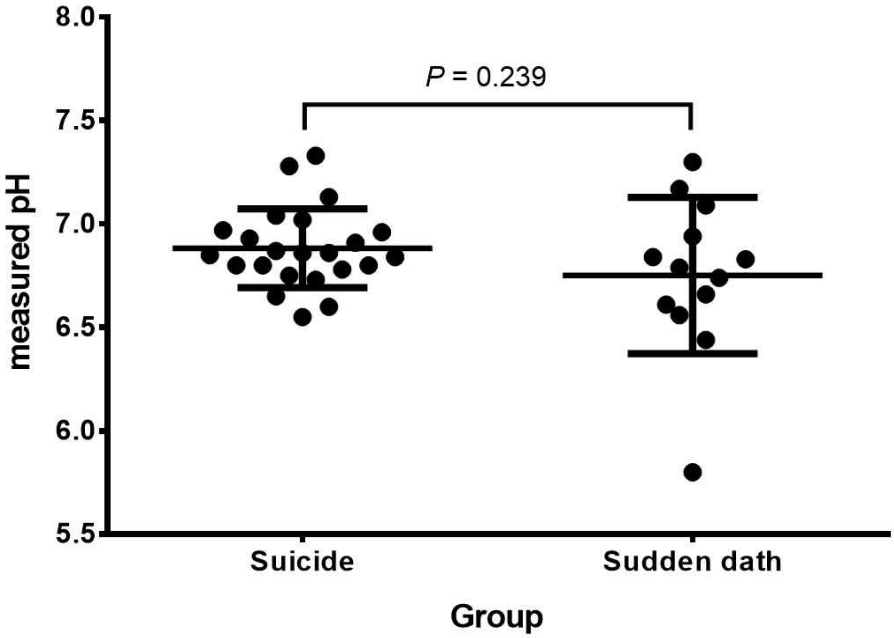
PMI, postmortem interval

[표 4] Proteins related to clinical characteristics among suicide completers.

	Psychiatric disorders			Medications		Alcohol intake
Comparative groups	Psychiatric disorder vs. No disorder (11 : 12)	Schizophrenia vs. No disorder (7 : 12)	MDD vs. No disorder (4 : 12)	Psychotropics vs. No medication (10 : 13)	Antipsychotics vs. No medication (6 : 13)	Alcohol intake vs. No-alcohol (6 : 17)
Number of DEPs *(P < 0.05 & FC> 1.2)*	4	13	8	5	12	34
Gene names	NIPSNAP3B **GSTT1*** TSPAN8 NQO1	EPB41L1 NIPSNAP3B CHI3L1 STBD1 EMILIN2 SLC14A1 MORF4L2 NELFE TSPAN8 CDKN2AIP NQO1 **ABRACL*** **UBE2D3***	FGG NIPSNAP3B ACBD3 DCHS1 GSTT2 LRP2 ABCC10 CHRNA4	BCAS1 NIPSNAP3B NQO1 GPNMB APOA2	CEP170B EPB41L1 EPB41L1 BCAS1 CFAP36 **COL4A1*** **CD82*** STBD1 MORF4L2 NELFE TTR GPNMB	GFAP CACNA1E SLC1A3 COL6A1 ANK3 RASA4 COL6A3 **RPS4Y1*** SLC7A11 CD44 MICALL2 FAM92A1 **S100A10*** TSPAN15 **MRGPRF*** MAN2A1 IGHG1 IGHG1 SERPINA1 IGHA1 IGKV3-11 IGHM HPX IGLC2 IGLL5 IGHM IGKV3-20 AHSG IGKV2D-28 IGKV1D-33 IGKV2-30 IGLV3-21 SYT6 CD5L

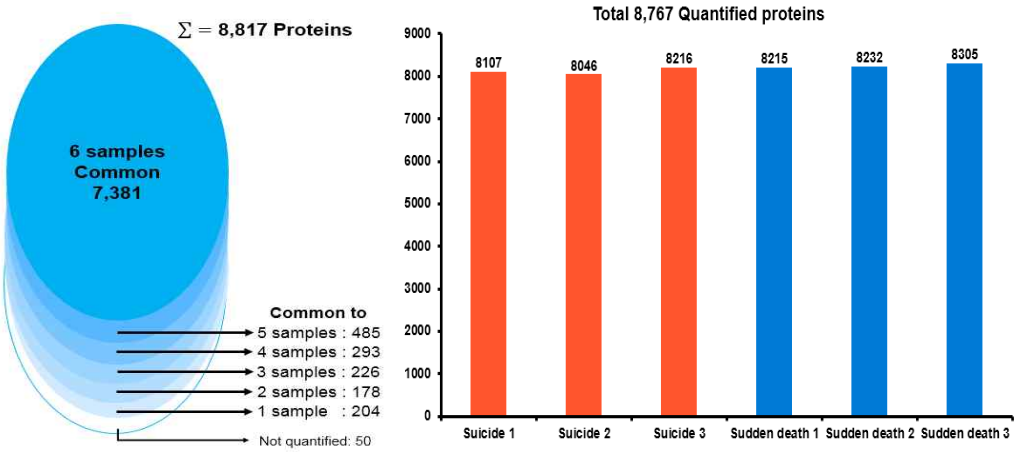
DEP, differentially expressed protein; MDD, major depressive disorder
* Proteins common to suicide vs. normal analyses

[그림 1] pH difference between suicide completers and sudden death group



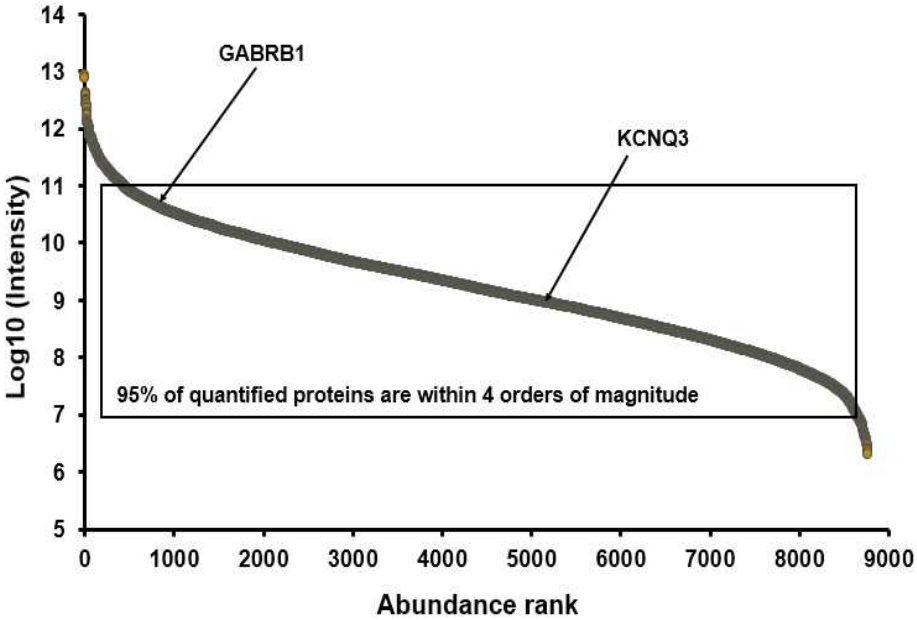
pH difference between suicide completers and sudden death group. The differcene between suicide and sudden death group was not significant(p=0.239).

[그림2] Number of proteins quantified in brain tissue samples after suicide and sudden death: a pilot study



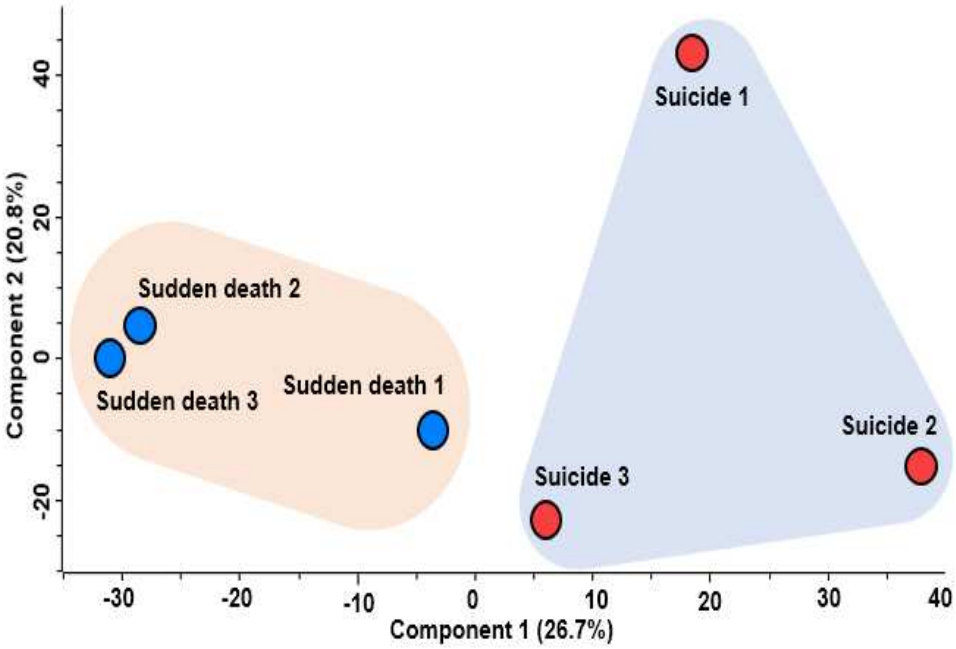
About 8,817 proteins were identified and quantified as a result of high-resolution mass spectrometry analysis of samples from 6 cases, On average, about 8,200 proteins were quantified in each sample.

[그림 3] Dynamic range for quantified protein: a pilot study



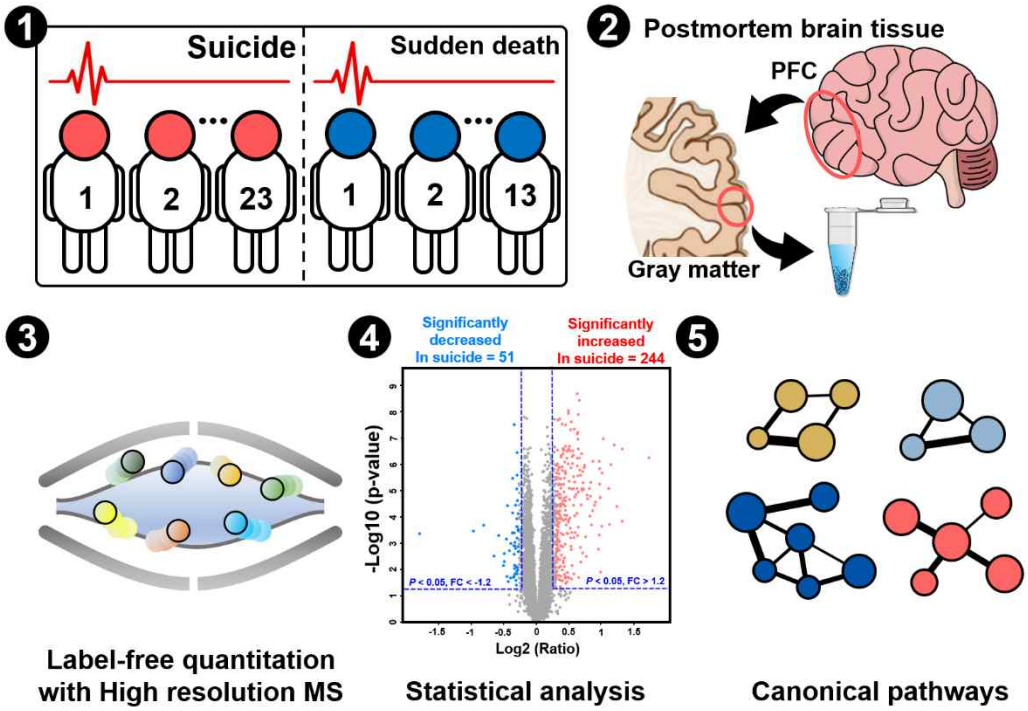
Dynamic range of pooled sample in three experimental sets. The quantified total protein was within 4 orders of magnitude.

[그림 4] Principle Component Analysis (PCA) results for quantified proteins : a pilot study

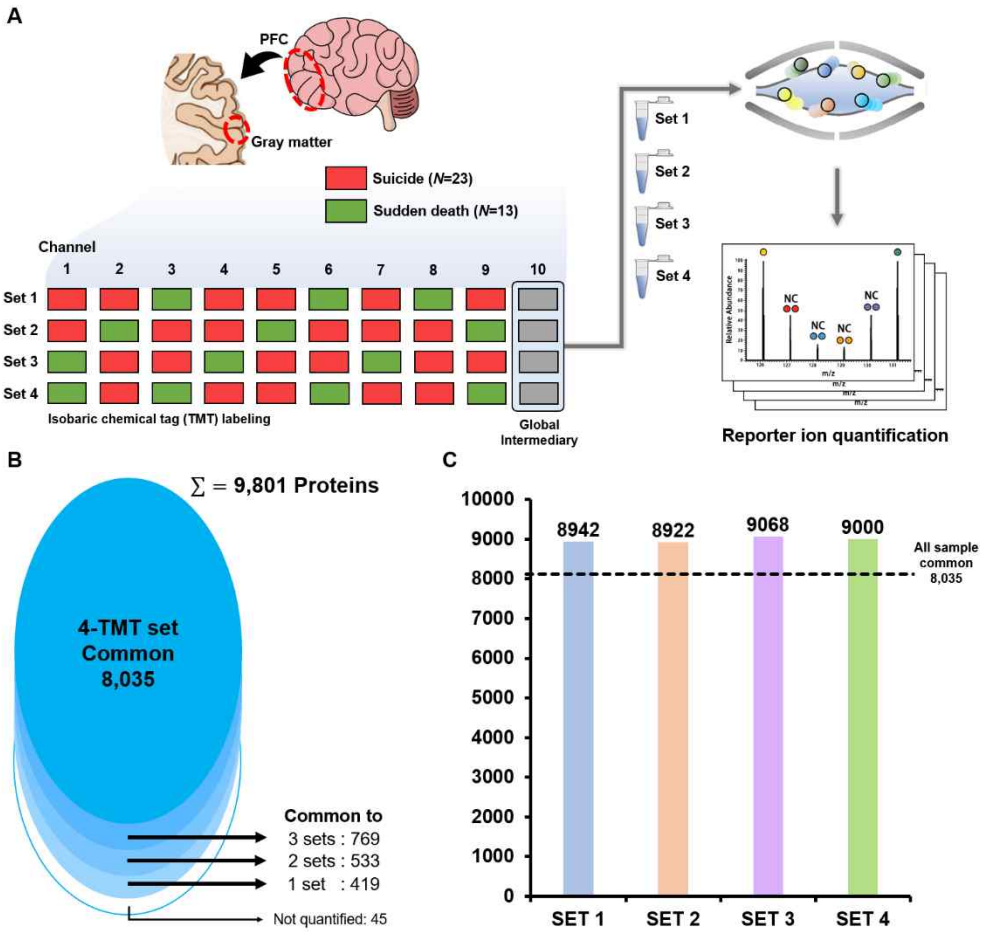


As a result of Principle component analysis (PCA), it was confirmed that suicide samples and sudden death samples were clustered within each group.

[그림 5] Research workflow for proteomic profiling using postmortem brain tissue

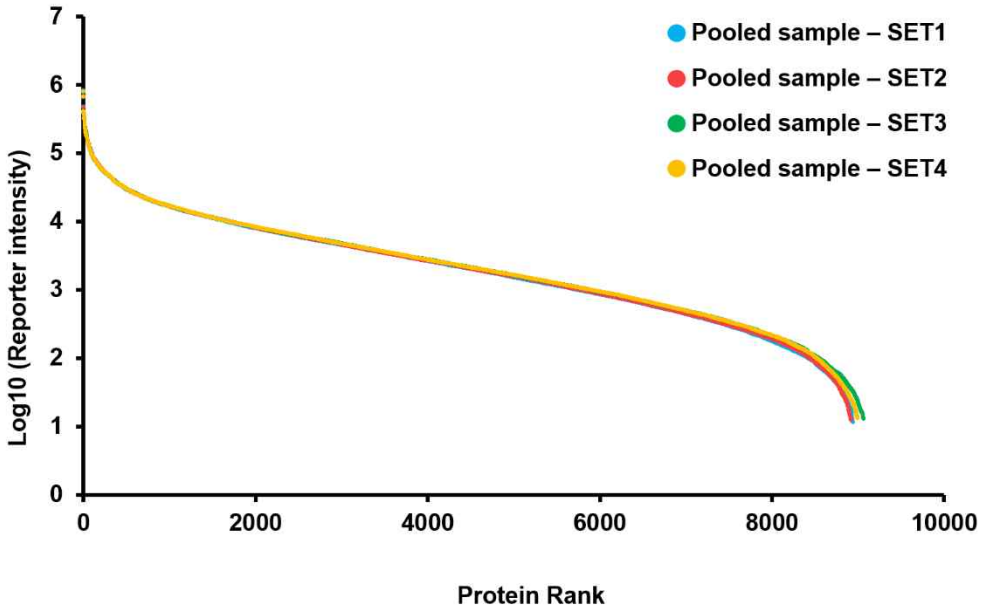


[그림 6] Detailed experimental workflow.



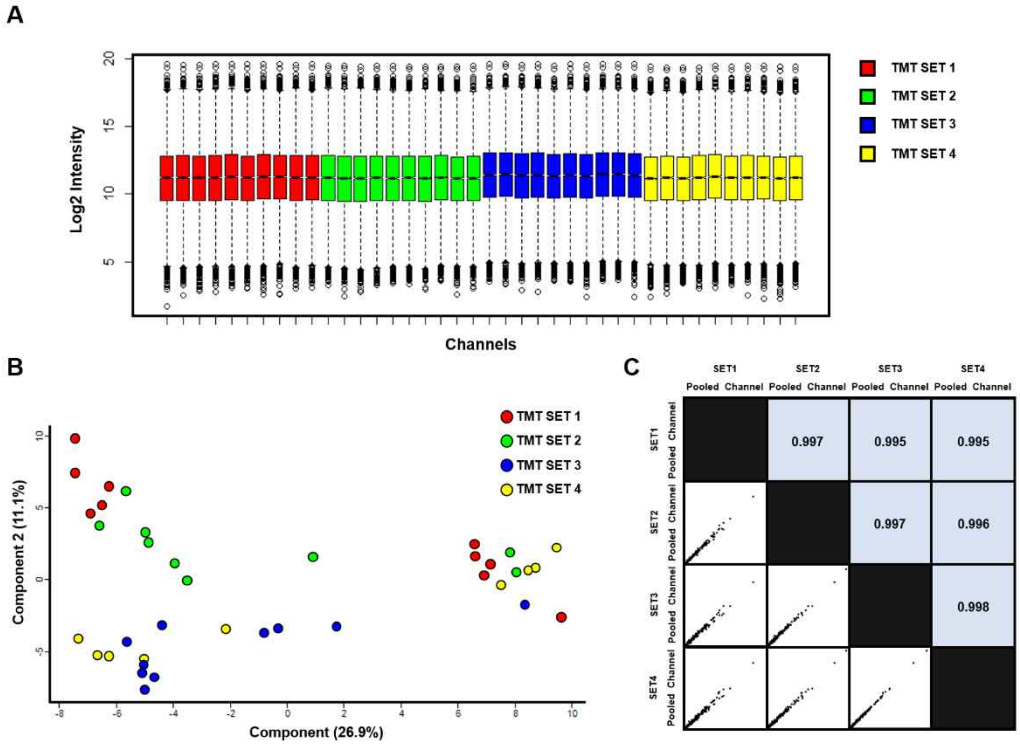
A. Distribution the 36 samples to four TMT experimental sets. Each experimental set comprised 9 samples and one common pooled sample B. A total of 8,035 proteins were quantified in all four experimental sets. C. About 9000 proteins were identified similarly in all four experimental sets.

[그림 7] Dynamic range of pooled sample in four experimental sets.



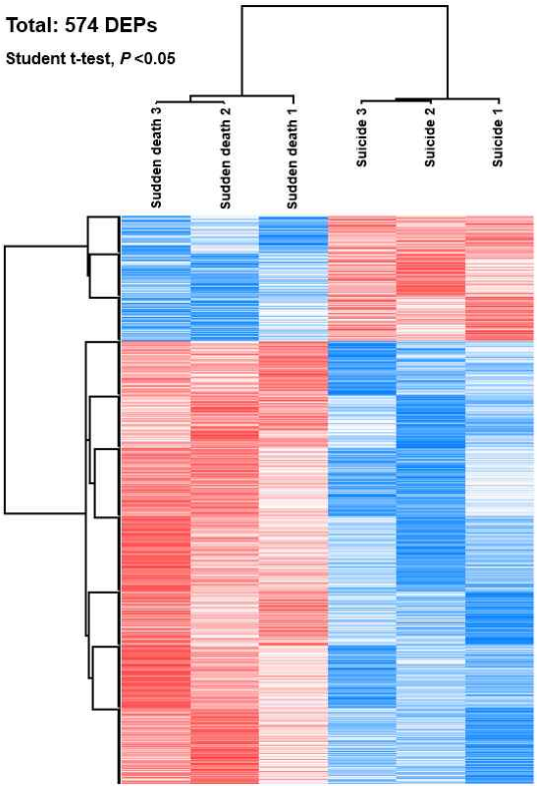
Dynamic range of pooled sample in four experimental sets. The quantified total protein was within 6 orders of magnitude.

[그림 8] Quantitative profiling of postmortem brain tissue samples.



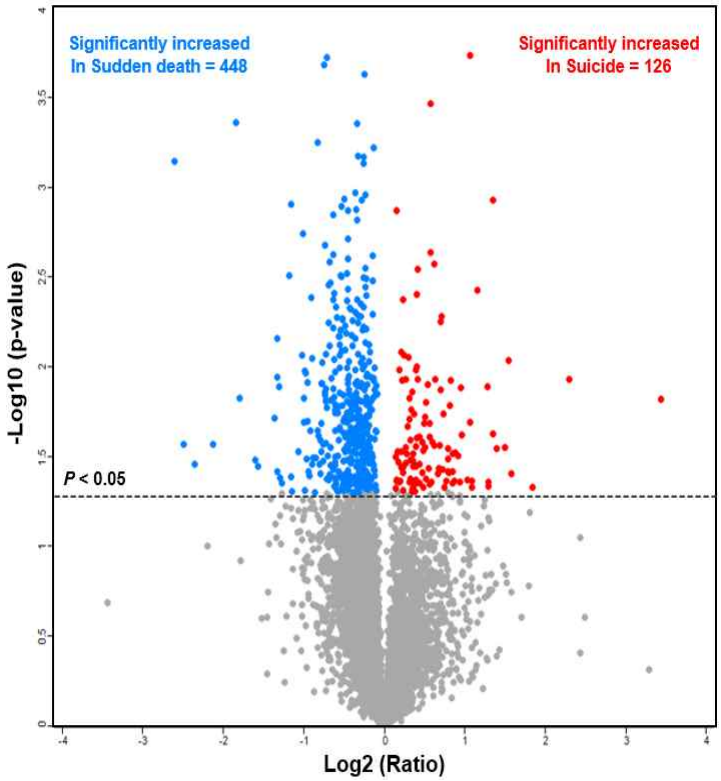
A. Box plot of the log2-transformed intensity for each sample. B. Principal component analysis of intensity value for four experimental sets. C. Pearson correlation coefficients of intensity values between four pooled samples.

[그림 9] Unsupervised hierarchical clustering of 574 proteins with significant expression differences in suicide and sudden death: a pilot study



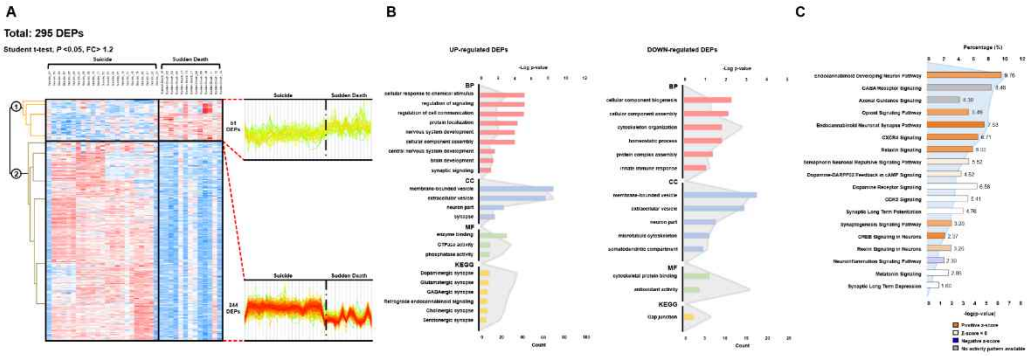
As a result of unsupervised hierarchical clustering of 574 DEPS, it was confirmed that suicide samples and sudden death samples were clustered within each group.

[그림 10] Volcano Plot for 574 Proteins with significant expression differences between suicide and Sudden Death: a pilot study



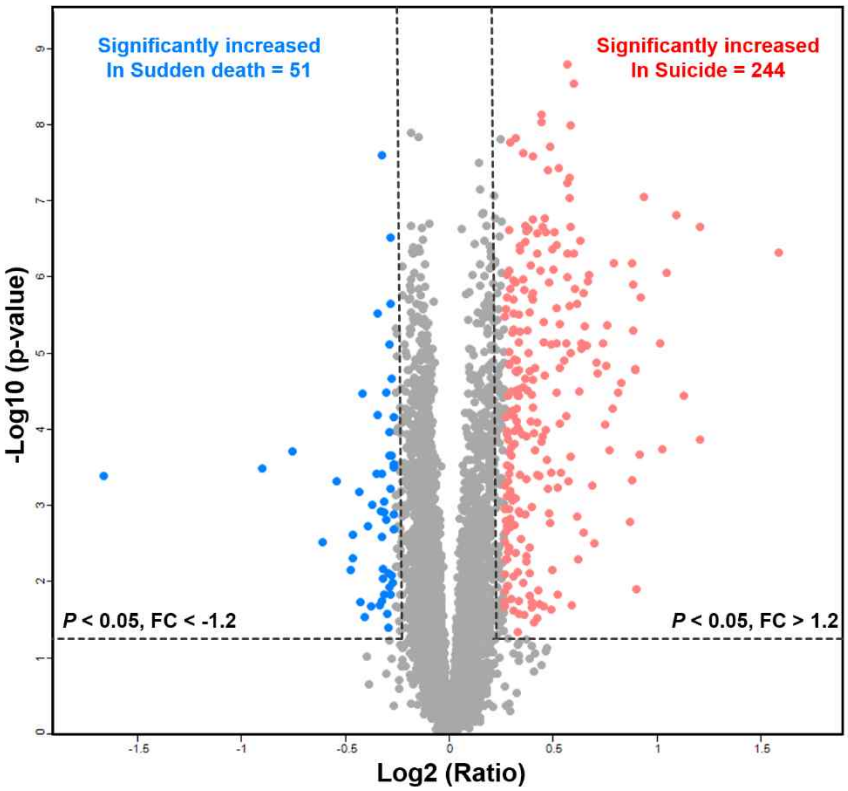
Volcano Plot for 574 DEPs found in the pilot study. There were 448 down-regulated proteins and 126 up-regulated proteins among suicide completers when compared to sudden death.

[그림 11] Differentially expressed proteins.



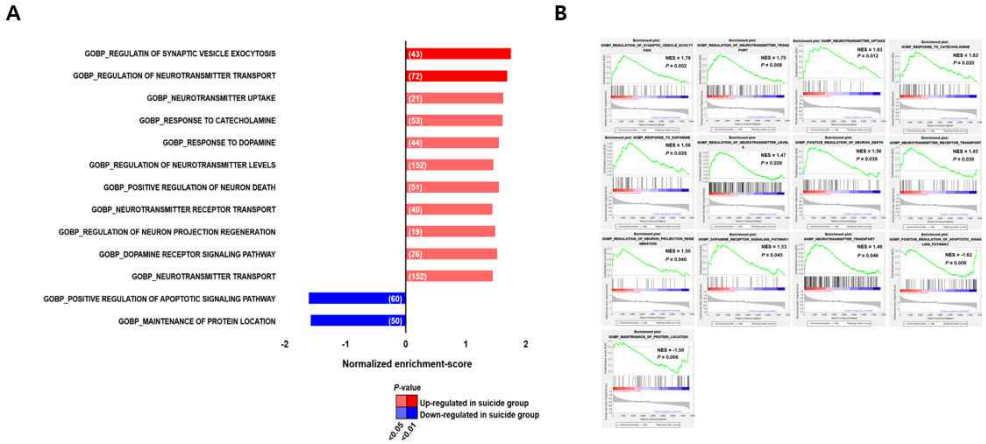
A. Hierarchical heat map clusters of significant proteins by student’s t-test B. GO analysis using 244 up regulated DEPs and 51 down regulated DEPs . Each colored bar graph indicates the enriched terms in biological process (BP), cellular component (CC), molecular function (MF), and KEGG pathway. The number of participating proteins is shown on the lower axis, and -log p-value for the upper axis(gray line graph) for GO terms. C. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) results for functional analysis. The percentage of participating proteins is shown on the upper axis, and -log p-value for the lower axis(blue line graph) for canonical pathways. The z-score of each canonical pathway is represented by the colors of the bars.

[그림 12] Volcano plot for differentially expressed proteins.



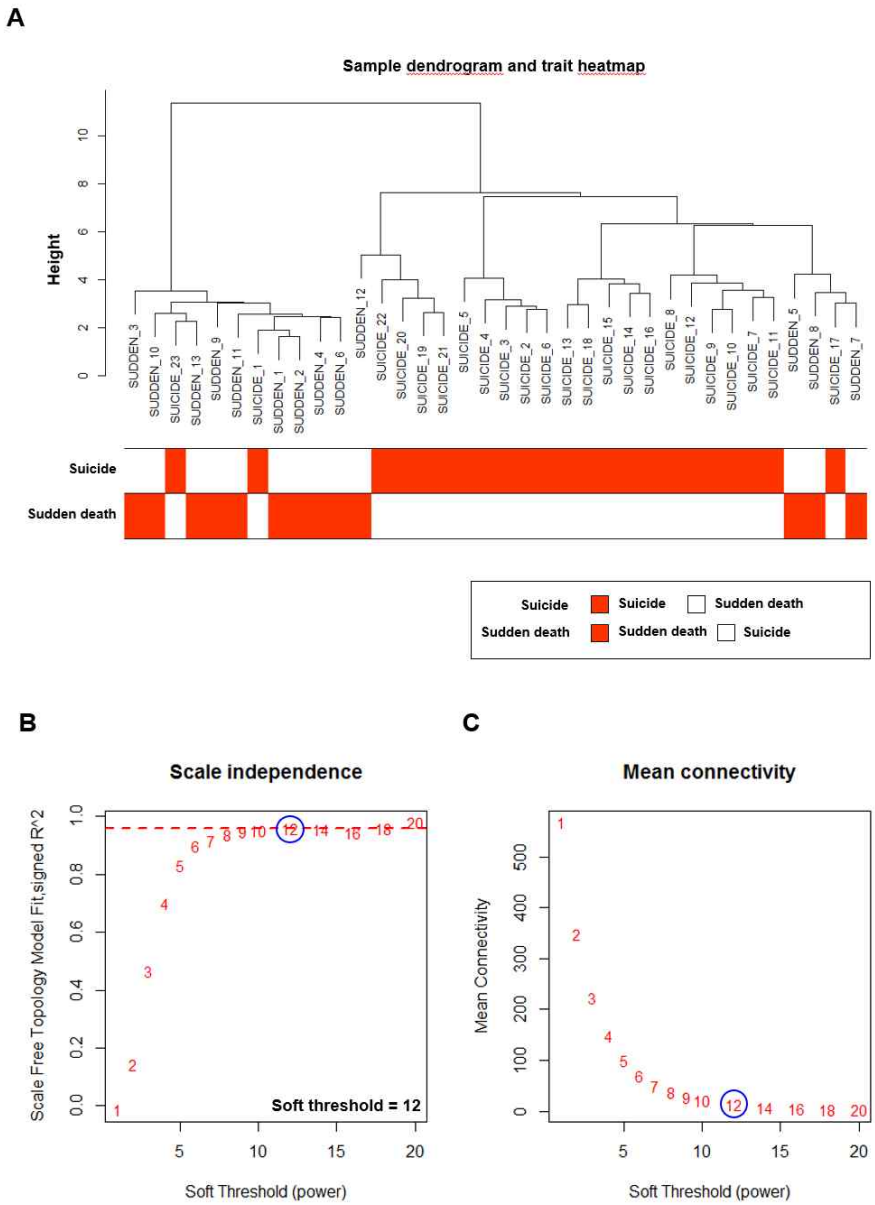
Student' s t-test($p<0.05$) was conducted for comparison between suicide completers and sudden death.

[그림 13] Gene set enrichment analysis (GSEA)



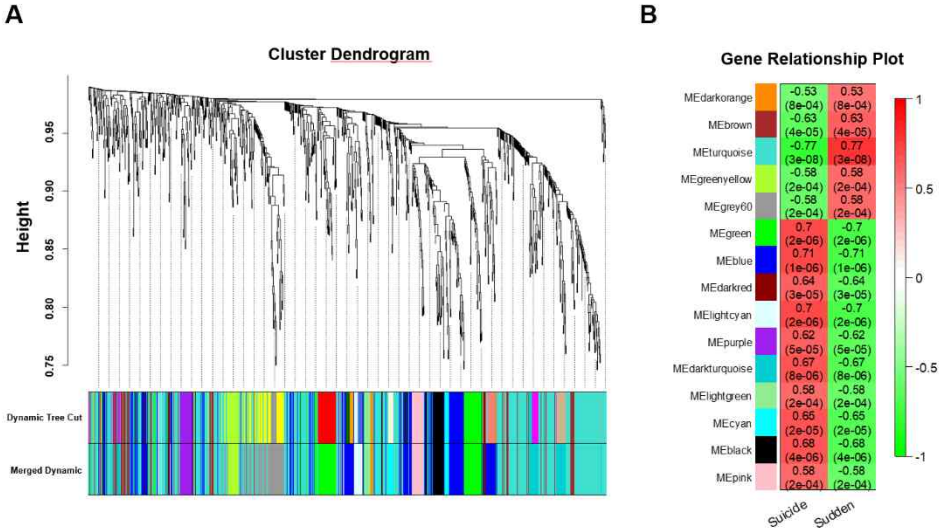
A. GSEA linking differentially expressed genes to with the canonical pathway or biological process. Normalized enrichment scores (NES) of process are depicted. B. GSEA Enrichment score curves are shown in green, which is the running sum of the weighted enrichment score obtained from GSEA software, while the normalized enrichment score (NES) and the corresponding P-value are reported within each graph.

[그림 14]　　WGCNA analysis: clustering



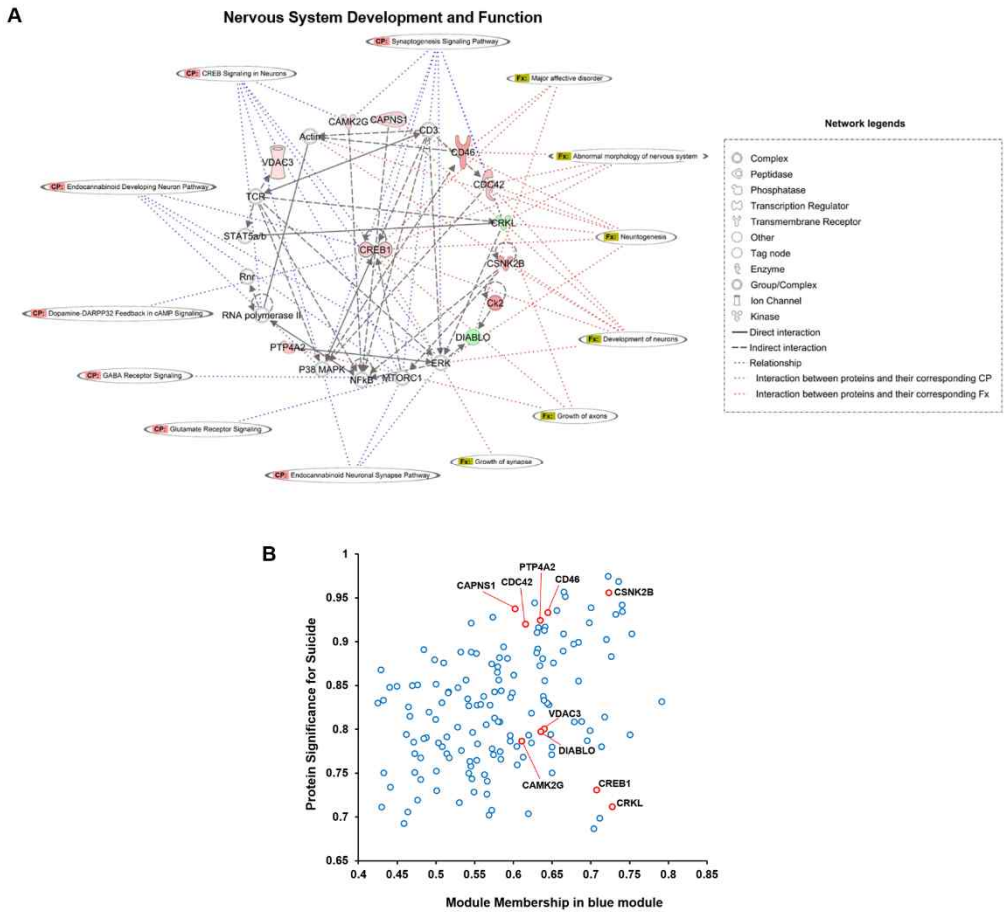
A. Hierarchical clustering dendrogram of all samples B. Scale independence C. Mean connectivity.

[그림 15] WGCNA analysis: eigengenes



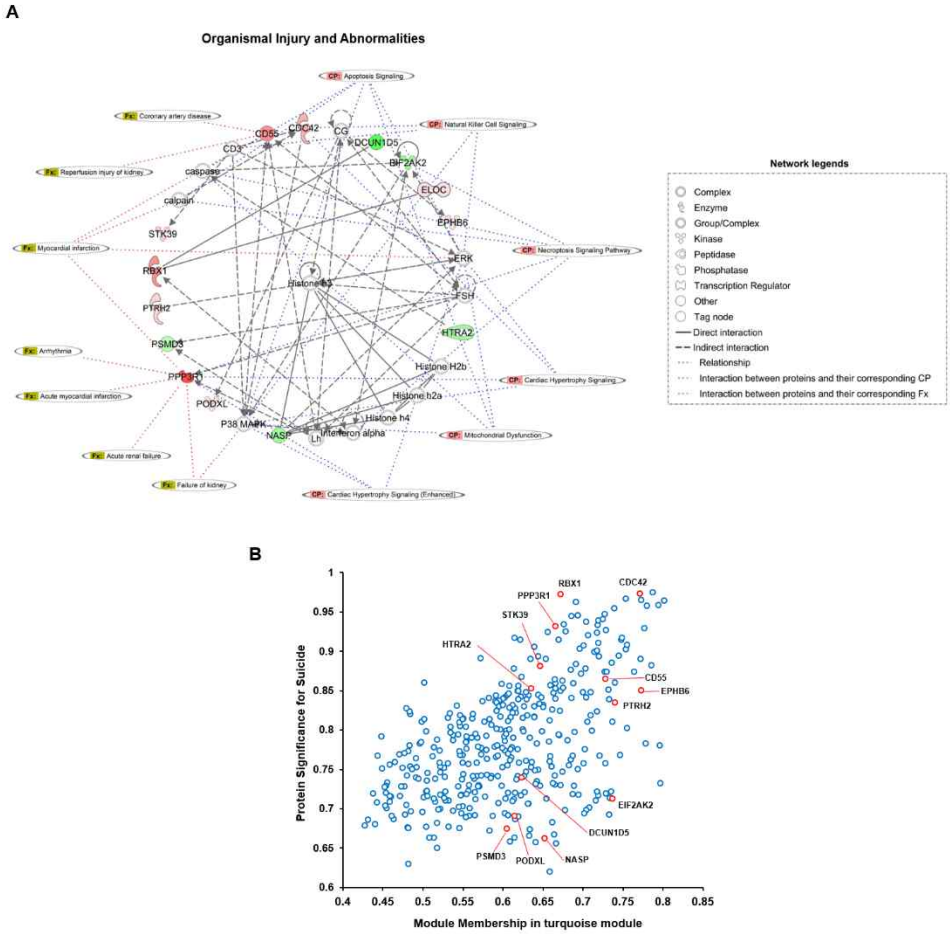
A. Optimal cluster sets obtained by dynamic tree cutting and automatic cluster merging. B. Heatmaps showing correlation of module eigengenes. Pearson correlation coefficient of each module are given and colored.

[그림 16] Network analysis of blue module



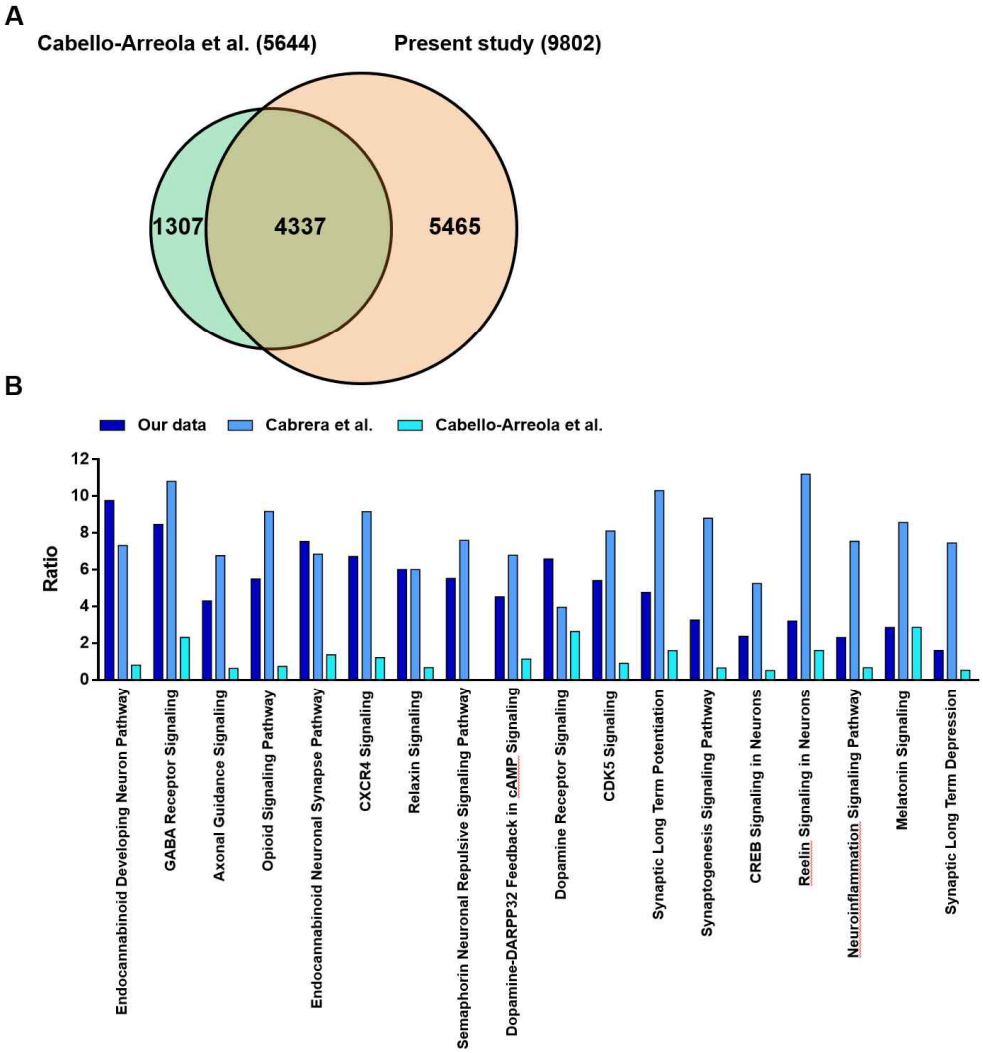
A. The top network of nervous system development and function was identified, using 154 proteins in the blue module which has the largest correlation with the suicide group. B. A scatterplot of protein significance for suicide versus module membership in the blue module

[그림 17] Network analysis of turquoise module



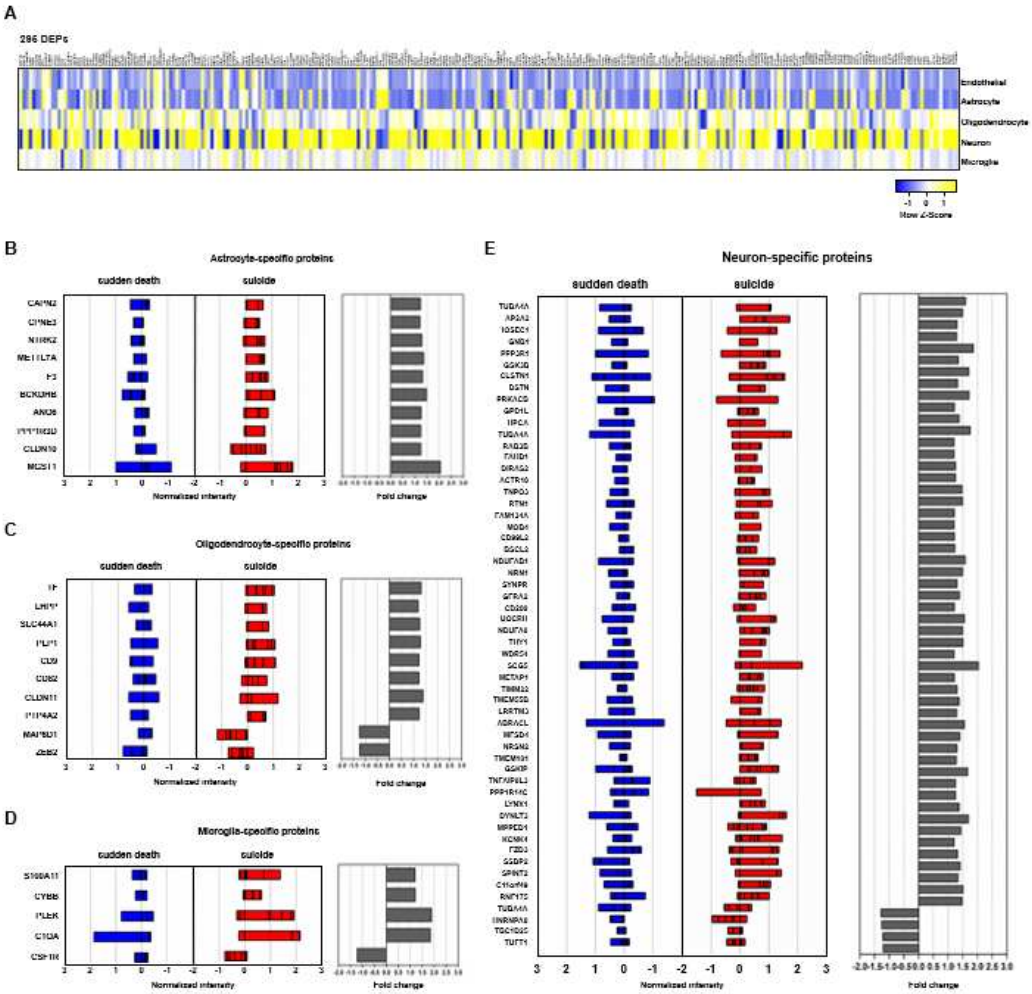
A. The top network using 393 proteins in the turquoise module that has the largest correlation with the sudden death group. Organismal injury and abnormalities pathway was identified B. A scatterplot of protein significance for suicide versus module membership in the turquoise module

[그림 18] Comparative studies.



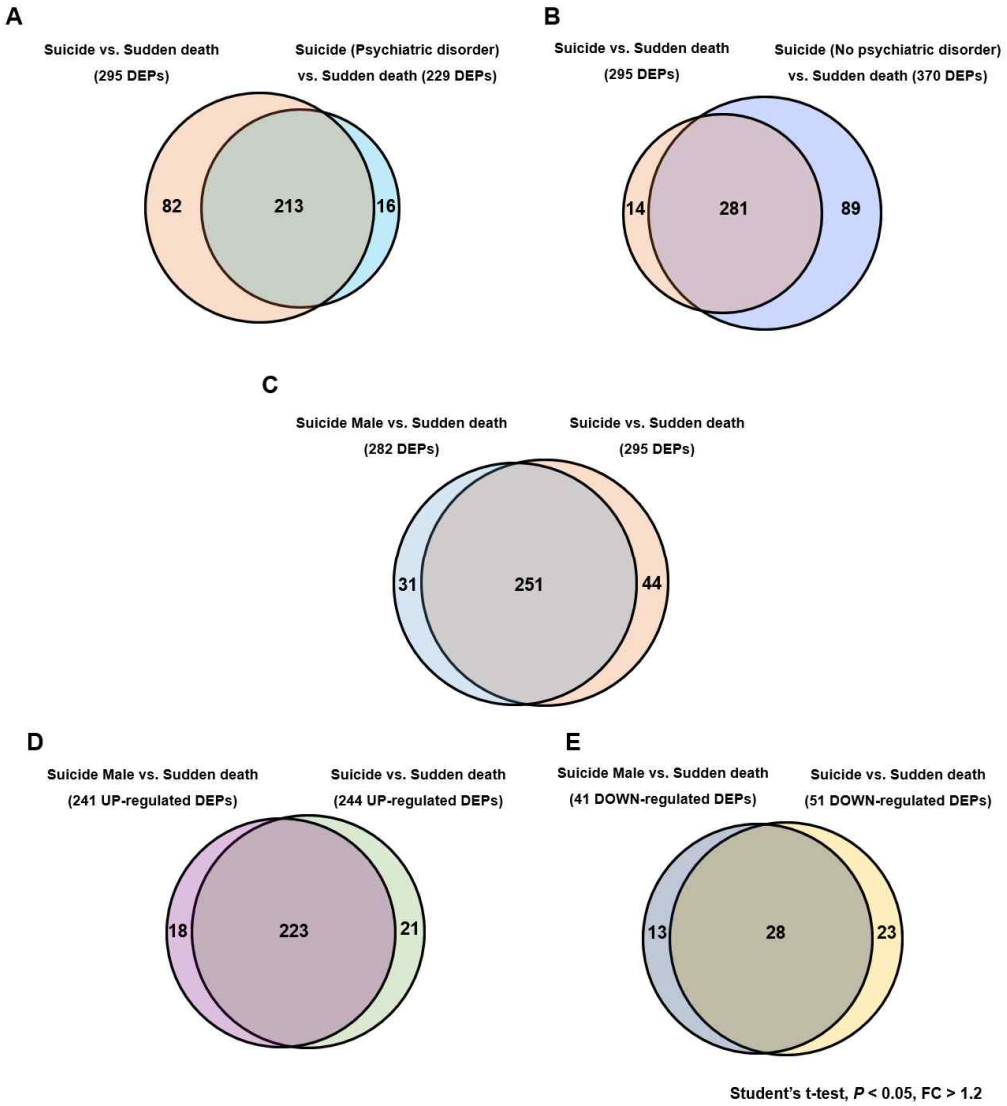
A. Venn diagram to compare the protein profiles discovered in the previous study. B. Common IPA canonical pathways found in three studies. The ratio presented is defined as the number of the differentially expressed proteins or differentially expressed genes found in three studies over the total number of proteins involved in each of the pathway.

[그림 19] DEPs expressed according to cell types(Endothelial cell, astrocyte, oligodendrocytes, neuron, microglia)



A. In order to confirm in which cell type each of the 295 DEPs identified in this study was expressed, the enrichment score was calculated. B. DEPs highly enriched in astrocytes. C. DEPs highly enriched in oligodendrocytes. D. DEPs highly enriched in microglia. E. DEPs highly enriched in neurons.

[그림 20]Venn diagrams for differentially expressed proteins between subgroups



Venn diagrams for differentially expressed proteins between subgroups. (A)between suicide (psychiatric disorders) vs. sudden death. (B) between suicide (no psychiatric disorders) vs. sudden death. (C)between suicide(all) vs. sudden death and suicide (male) vs sudden death group using all DEPs. (D) using up-regulated DEPs (E), and down-regulated DEPs.

참고 문헌

1. Organization, W.H. *Suicide worldwide in 2019, Global Health Estimates*. 2019.
2. 통계청. *한국 자살현황*. 2019.
3. Cerel, J., et al., *How many people are exposed to suicide? Not six.* Suicide and Life-Threatening Behavior, 2019. **49**(2): p. 529-534.
4. Turecki, G., et al., *Suicide and suicide risk.* Nature reviews Disease primers, 2019. **5**(1): p. 1-22.
5. O'Connor, R.C. and O.J. Kirtley, *The integrated motivational-volitional model of suicidal behaviour.* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2018. **373**(1754): p. 20170268.
6. Van Orden, K.A., et al., *The interpersonal theory of suicide.* Psychological review, 2010. **117**(2): p. 575.
7. Turecki, G., *The molecular bases of the suicidal brain.* Nature Reviews Neuroscience, 2014. **15**(12): p. 802-816.
8. Lutz, P., N. Mechawar, and G. Turecki, *Neuropathology of suicide: recent findings and future directions.* Molecular psychiatry, 2017. **22**(10): p. 1395-1412.
9. Turecki, G. and D.A. Brent, *Suicide and suicidal behaviour.* The Lancet, 2016. **387**(10024): p. 1227-1239.
10. McGirr, A., et al., *Familial aggregation of suicide explained by cluster B traits: a three-group family study of suicide controlling for major depressive disorder.* American Journal of Psychiatry, 2009. **166**(10): p. 1124-1134.
11. Brent, D.A., et al., *Suicidal behavior runs in families: a controlled family study of adolescent suicide victims.* Archives of general psychiatry, 1996. **53**(12): p. 1145-1152.
12. O'Neill, S., et al., *Factors associated with suicide in four age groups: a population based study.* Archives of suicide research, 2018. **22**(1): p. 128-138.
13. Brent, D.A., et al., *Familial transmission of mood disorders: convergence and divergence with transmission of suicidal behavior.* Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 2004. **43**(10): p. 1259-1266.
14. Fu, Q., et al., *A twin study of genetic and environmental influences on suicidality in men.* Psychological medicine, 2002. **32**(1): p. 11-24.
15. Brent, D.A., et al., *Familial pathways to early-onset suicide attempt: a 5.6-year prospective study.* JAMA psychiatry, 2015. **72**(2): p. 160-168.
16. Mann, J.J., *The serotonergic system in mood disorders and suicidal behaviour.* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2013. **368**(1615): p. 20120537.

17. Antypa, N., A. Serretti, and D. Rujescu, *Serotonergic genes and suicide: a systematic review.* European Neuropsychopharmacology, 2013. **23**(10): p. 1125-1142.
18. Oquendo, M.A., et al., *Toward a biosignature for suicide.* American Journal of Psychiatry, 2014. **171**(12): p. 1259-1277.
19. Arango, V., et al., *Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims.* Neuropsychopharmacology, 2001. **25**(6): p. 892-903.
20. Mann, J.J., *Neurobiology of suicidal behaviour.* Nature Reviews Neuroscience, 2003. **4**(10): p. 819-828.
21. Sullivan, G.M., et al., *Positron emission tomography quantification of serotonin1A receptor binding in suicide attempters with major depressive disorder.* JAMA psychiatry, 2015. **72**(2): p. 169-178.
22. Miller, J.M., et al., *Positron emission tomography quantification of serotonin transporter in suicide attempters with major depressive disorder.* Biological psychiatry, 2013. **74**(4): p. 287-295.
23. McGirr, A., et al., *Dysregulation of the sympathetic nervous system, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and executive function in individuals at risk for suicide.* Journal of Psychiatry and Neuroscience, 2010. **35**(6): p. 399-408.
24. O'Connor, D.B., et al., *Cortisol levels and suicidal behavior: A meta-analysis.* Psychoneuroendocrinology, 2016. **63**: p. 370-379.
25. Melhem, N.M., et al., *Blunted HPA axis activity in suicide attempters compared to those at high risk for suicidal behavior.* Neuropsychopharmacology, 2016. **41**(6): p. 1447-1456.
26. Turecki, G., et al., *Early life adversity, genomic plasticity, and psychopathology.* The Lancet Psychiatry, 2014. **1**(6): p. 461-466.
27. Raison, C.L. and A.H. Miller, *When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders.* American Journal of Psychiatry, 2003. **160**(9): p. 1554-1565.
28. Roy, A., et al., *Interaction of FKBP5, a stress-related gene, with childhood trauma increases the risk for attempting suicide.* Neuropsychopharmacology, 2010. **35**(8): p. 1674-1683.
29. Lahti, J., et al., *Associations between self-reported and objectively recorded early life stress, FKBP5 polymorphisms, and depressive symptoms in midlife.* Biological psychiatry, 2016. **80**(11): p. 869-877.
30. Dwivedi, Y., et al., *Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects.* Archives of general psychiatry, 2003. **60**(8): p. 804-815.
31. Banerjee, R., et al., *Decreased mRNA and protein expression of BDNF, NGF, and their receptors in the hippocampus from suicide: an analysis in human postmortem brain.* Clinical Medicine Insights: Pathology, 2013. **6**: p. CPath. S12530.

32. Grah, M., et al., *Brain-derived neurotrophic factor as a suicide factor in mental disorders.* Acta neuropsychiatrica, 2014. 26(6): p. 356-363.
33. Keller, S., et al., *Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects.* Archives of general psychiatry, 2010. 67(3): p. 258-267.
34. Kang, H.-J., et al., *BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients.* Journal of affective disorders, 2013. 151(2): p. 679-685.
35. Ernst, C., E. Chen, and G. Turecki, *Histone methylation and decreased expression of TrkB. T1 in orbital frontal cortex of suicide completers.* Molecular psychiatry, 2009. 14(9): p. 830-832.
36. Maussion, G., et al., *Regulation of a truncated form of tropomyosin-related kinase B (TrkB) by Hsa-miR-185* in frontal cortex of suicide completers.* PloS one, 2012. 7(6): p. e39301.
37. Stockmeier, C.A., et al., *Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression.* Biological psychiatry, 2004. 56(9): p. 640-650.
38. Rajkowska, G., et al., *Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression.* Biological psychiatry, 1999. 45(9): p. 1085-1098.
39. Videbech, P. and B. Ravnkilde, *Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies.* American Journal of Psychiatry, 2004. 161(11): p. 1957-1966.
40. Chandley, M.J., et al., *Gene expression deficits in pontine locus coeruleus astrocytes in men with major depressive disorder.* Journal of Psychiatry and Neuroscience, 2013. 38(4): p. 276-284.
41. Chandley, M.J., et al., *Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression.* International Journal of Neuropsychopharmacology, 2014. 17(10): p. 1569-1578.
42. Gray, A., et al., *Sex differences in glutamate receptor gene expression in major depression and suicide.* Molecular psychiatry, 2015. 20(9): p. 1057-1068.
43. Price, R.B., et al., *Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression.* Biological psychiatry, 2009. 66(5): p. 522-526.
44. Stenovec, M., et al., *Ketamine inhibits ATP-evoked exocytotic release of brain-derived neurotrophic factor from vesicles in cultured rat astrocytes.* Molecular neurobiology, 2016. 53(10): p. 6882-6896.
45. Grieco, S.F., et al., *Up-regulation of insulin-like growth factor 2 by ketamine requires glycogen synthase kinase-3 inhibition.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2017. 72: p. 49-54.
46. Ren, Z., et al., *Bidirectional homeostatic regulation of a depression-related brain state by gamma-aminobutyric acidergic deficits and*

ketamine treatment. Biological psychiatry, 2016. **80**(6): p. 457-468.
47. Serafini, G., et al., *The role of inflammatory cytokines in suicidal behavior: a systematic review.* European Neuropsychopharmacology, 2013. **23**(12): p. 1672-1686.
48. Isung, J., et al., *High interleukin-6 and impulsivity: determining the role of endophenotypes in attempted suicide.* Translational psychiatry, 2014. **4**(10): p. e470-e470.
49. Ohlsson, L., et al., *Leaky gut biomarkers in depression and suicidal behavior.* Acta Psychiatrica Scandinavica, 2019. **139**(2): p. 185-193.
50. Isung, J., et al., *Low plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) associated with completed suicide.* The World Journal of Biological Psychiatry, 2012. **13**(6): p. 468-473.
51. Okusaga, O., et al., *Combined Toxoplasma gondii seropositivity and high blood kynurenine–Linked with nonfatal suicidal self-directed violence in patients with schizophrenia.* Journal of psychiatric research, 2016. **72**: p. 74-81.
52. Pedersen, M.G., et al., *Toxoplasma gondii infection and self-directed violence in mothers.* Archives of general psychiatry, 2012. **69**(11): p. 1123-1130.
53. Cook, T.B., et al., *"Latent" infection with Toxoplasma gondii: association with trait aggression and impulsivity in healthy adults.* Journal of psychiatric research, 2015. **60**: p. 87-94.
54. Peng, X., et al., *Moderation of the relationship between Toxoplasma gondii seropositivity and trait impulsivity in younger men by the phenylalanine-tyrosine ratio.* Psychiatry research, 2018. **270**: p. 992-1000.
55. Galfalvy, H., et al., *A pilot genome wide association and gene expression array study of suicide with and without major depression.* The world journal of biological psychiatry, 2013. **14**(8): p. 574-582.
56. Galfalvy, H., et al., *A genome-wide association study of suicidal behavior.* American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, 2015. **168**(7): p. 557-563.
57. Sokolowski, M., J. Wasserman, and D. Wasserman, *Polygenic associations of neurodevelopmental genes in suicide attempt.* Molecular psychiatry, 2016. **21**(10): p. 1381-1390.
58. DeJong, T.M., J.C. Overholser, and C.A. Stockmeier, *Apples to oranges?: a direct comparison between suicide attempters and suicide completers.* Journal of affective disorders, 2010. **124**(1-2): p. 90-97.
59. Joo, S.H., et al., *Factors associated with suicide completion: a comparison between suicide attempters and completers.* Asia-Pacific Psychiatry, 2016. **8**(1): p. 80-86.
60. Stan, A.D., et al., *Human postmortem tissue: what quality markers matter?* Brain research, 2006. **1123**(1): p. 1-11.
61. Piras, I.S., et al., *A review and meta-analysis of gene expression profiles*

in suicide. European Neuropsychopharmacology, 2022. **56**: p. 39-49.
62. Collins, A.L., et al., *Hypothesis-driven candidate genes for schizophrenia compared to genome-wide association results.* Psychological medicine, 2012. **42**(3): p. 607-616.
63. Coon, H., et al., *Genome-wide significant regions in 43 Utah high-risk families implicate multiple genes involved in risk for completed suicide.* Molecular psychiatry, 2020. **25**(11): p. 3077-3090.
64. Punzi, G., et al., *Genetics and brain transcriptomics of completed suicide.* American journal of psychiatry, 2022. **179**(3): p. 226-241.
65. Cabello-Arreola, A., et al., *Differential dorsolateral prefrontal cortex proteomic profiles of suicide victims with mood disorders.* Genes, 2020. **11**(3): p. 256.
66. Pennington, K., D. Cotter, and M. Dunn, *The role of proteomics in investigating psychiatric disorders.* The British Journal of Psychiatry, 2005. **187**(1): p. 4-6.
67. Tanase, C., R. Albulescu, and M. Neagu, *Proteomic approaches for biomarker panels in cancer.* Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2016. **37**(1): p. 1-15.
68. Do, M., et al., *Marker Identification of the Grade of Dysplasia of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm in Pancreatic Cyst Fluid by Quantitative Proteomic Profiling.* Cancers, 2020. **12**(9): p. 2383.
69. Wagner, G., et al., *Prefrontal cortical thickness in depressed patients with high-risk for suicidal behavior.* Journal of psychiatric research, 2012. **46**(11): p. 1449-1455.
70. Zhao, J., et al., *Prefrontal changes in the glutamate-glutamine cycle and neuronal/glial glutamate transporters in depression with and without suicide.* Journal of psychiatric research, 2016. **82**: p. 8-15.
71. Raust, A., et al., *Prefrontal cortex dysfunction in patients with suicidal behavior.* Psychological medicine, 2007. **37**(3): p. 411-419.
72. Kim, D.K., et al., *Molecular and functional signatures in a novel Alzheimer's disease mouse model assessed by quantitative proteomics.* Molecular neurodegeneration, 2018. **13**(1): p. 1-19.
73. Han, D., et al., *In-depth proteomic analysis of mouse microglia using a combination of FASP and S tage T ip-based, high p H, reversed-phase fractionation.* Proteomics, 2013. **13**(20): p. 2984-2988.
74. Han, D., et al., *Proteomic analysis of mouse astrocytes and their secretome by a combination of FASP and StageTip-based, high pH, reversed-phase fractionation.* Proteomics, 2014. **14**(13-14): p. 1604-1609.
75. Vizcaíno, J.A., et al., *The PRoteomics IDEntifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013.* Nucleic acids research, 2012. **41**(D1): p. D1063-D1069.
76. Vizcaíno, J.A., et al., *ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination.* Nature biotechnology, 2014. **32**(3): p. 223-226.

77. Tyanova, S., et al., *The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data.* Nature methods, 2016. **13**(9): p. 731-740.
78. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.* Nature protocols, 2009. **4**(1): p. 44-57.
79. Langfelder, P. and S. Horvath, *WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis.* BMC bioinformatics, 2008. **9**(1): p. 1-13.
80. Marsicano, G. and B. Lutz, *Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system.* Journal of endocrinological investigation, 2006. **29**(3): p. 27.
81. Kawamura, Y., et al., *The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum.* Journal of Neuroscience, 2006. **26**(11): p. 2991-3001.
82. Sales, A.J., et al., *Cannabidiol induces rapid and sustained antidepressant-like effects through increased BDNF signaling and synaptogenesis in the prefrontal cortex.* Molecular neurobiology, 2019. **56**(2): p. 1070-1081.
83. Klempan, T.A., et al., *Altered expression of genes involved in ATP biosynthesis and GABAergic neurotransmission in the ventral prefrontal cortex of suicides with and without major depression.* Molecular psychiatry, 2009. **14**(2): p. 175-189.
84. Sequeira, A., et al., *Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression.* PloS one, 2009. **4**(8): p. e6585.
85. Teng, T., et al., *A diathesis-stress rat model induced suicide-implicated endophenotypes and prefrontal cortex abnormalities in the PKA and GABA receptor signaling pathways.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2022. **116**: p. 110538.
86. Merali, Z., et al., *Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABAA receptor subunits in frontal cortical brain region.* Journal of Neuroscience, 2004. **24**(6): p. 1478-1485.
87. Poulter, M.O., et al., *GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes.* Biological psychiatry, 2008. **64**(8): p. 645-652.
88. Baudry, M. and X. Bi, *Calpain-1 and calpain-2: the yin and yang of synaptic plasticity and neurodegeneration.* Trends in neurosciences, 2016. **39**(4): p. 235-245.
89. Aston, C., L. Jiang, and B. Sokolov, *Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder.* Molecular psychiatry, 2005. **10**(3): p. 309-322.
90. Bellas, R.E., et al., *Inhibition of NF-kappa B activity induces apoptosis in murine hepatocytes.* The American journal of pathology, 1997. **151**(4): p.

891.
91. Ni, H., et al., *NF-kappa B modulation is involved in celastrol induced human multiple myeloma cell apoptosis.* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95846.
92. Young, A., et al., *Aberrant NF-kappaB expression in autism spectrum condition: a mechanism for neuroinflammation.* Frontiers in Psychiatry, 2011. **2**: p. 27.
93. Murphy, C.E., A.K. Walker, and C.S. Weickert, *Neuroinflammation in schizophrenia: the role of nuclear factor kappa B.* Translational Psychiatry, 2021. **11**(1): p. 1-13.
94. Underwood, M.D., et al., *Neuron density and serotonin receptor binding in prefrontal cortex in suicide.* International Journal of Neuropsychopharmacology, 2012. **15**(4): p. 435-447.
95. Cabrera, B., et al., *Brain gene expression pattern of subjects with completed suicide and comorbid substance use disorder.* Molecular neuropsychiatry, 2019. **5**(1): p. 60-73.
96. McKenzie, A.T., et al., *Brain cell type specific gene expression and co-expression network architectures.* Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 1-19.
97. Cao-Lei, L., et al., *DNA methylation signatures triggered by prenatal maternal stress exposure to a natural disaster: Project Ice Storm.* PloS one, 2014. **9**(9): p. e107653.
98. Folger, A.T., et al., *Association between maternal adverse childhood experiences and neonatal SCG5 DNA methylation—effect modification by prenatal home visiting.* American journal of epidemiology, 2022. **191**(4): p. 636-645.
99. Molnar, B.E., L.F. Berkman, and S.L. Buka, *Psychopathology, childhood sexual abuse and other childhood adversities: relative links to subsequent suicidal behaviour in the US.* Psychological medicine, 2001. **31**(6): p. 965-977.
100. Enns, M.W., et al., *Childhood adversities and risk for suicidal ideation and attempts: a longitudinal population-based study.* Psychological medicine, 2006. **36**(12): p. 1769-1778.
101. Tang, F., K. Lao, and M.A. Surani, *Development and applications of single-cell transcriptome analysis.* Nature methods, 2011. **8**(4): p. S6-S11.
102. Tang, F., et al., *mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell.* Nature methods, 2009. **6**(5): p. 377-382.
103. Dusart, P., et al., *A systems-based map of human brain cell-type enriched genes and malignancy-associated endothelial changes.* Cell reports, 2019. **29**(6): p. 1690-1706. e4.
104. Gravina, P., et al., *Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1, GSTP1 and GSTA1 as risk factors for schizophrenia.* Psychiatry research, 2011. **187**(3): p. 454-456.
105. Mohammadynejad, P., et al., *Bipolar disorder and polymorphisms of glutathione S-transferases M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1).* Psychiatry research, 2011. **186**(1): p. 144-146.

106. Nunes, S.O.V., et al., *Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferases are associated with anxiety and mood disorders in nicotine dependence.* Psychiatric genetics, 2014. **24**(3): p. 87.
107. Smythies, J.R., *Oxidative reactions and schizophrenia: a review-discussion.* Schizophrenia Research, 1997. **24**(3): p. 357-364.
108. Zhang, L., et al., *P11 (S100A10) as a potential biomarker of psychiatric patients at risk of suicide.* Journal of psychiatric research, 2011. **45**(4): p. 435-441.
109. Tzang, R.-F., et al., *Association study of p11 gene with major depressive disorder, suicidal behaviors and treatment response.* Neuroscience letters, 2008. **447**(1): p. 92-95.
110. Mulligan, M.K., et al., *Molecular profiles of drinking alcohol to intoxication in C57BL/6J mice.* Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2011. **35**(4): p. 659-670.
111. Khemiri, L., et al., *Suicide risk associated with experience of violence and impulsivity in alcohol dependent patients.* Scientific reports, 2016. **6**(1): p. 1-11.
112. Arsenault-Lapierre, G., C. Kim, and G. Turecki, *Psychiatric diagnoses in 3275 suicides: a meta-analysis.* BMC psychiatry, 2004. **4**(1): p. 1-11.
113. Phillips, M.R., et al., *Assessing depressive symptoms in persons who die of suicide in mainland China.* Journal of Affective Disorders, 2007. **98**(1-2): p. 73-82.
114. Zhang, J., S. Xiao, and L. Zhou, *Mental disorders and suicide among young rural Chinese: a case-control psychological autopsy study.* American Journal of Psychiatry, 2010. **167**(7): p. 773-781.
115. Phillips, M.R., et al., *Risk factors for suicide in China: a national case-control psychological autopsy study.* The Lancet, 2002. **360**(9347): p. 1728-1736.
116. Gvion, Y. and A. Apter, *Aggression, impulsivity, and suicide behavior: a review of the literature.* Archives of suicide research, 2011. **15**(2): p. 93-112.
117. Lee, S.-R., et al., *The study on reliability and validity of Korean version of the Barratt Impulsiveness Scale-11-Revised in nonclinical adult subjects.* Journal of the Korean Neuropsychiatric Association, 2012. **51**(6): p. 378-386.
118. Na, K.-S., et al., *Psychological autopsy: review and considerations for future directions in Korea.* Journal of Korean Neuropsychiatric Association, 2015. **54**(1): p. 40-48.
119. Rosenberg, M.L., et al., *Operational criteria for the determination of suicide.* Journal of forensic Science, 1988. **33**(6): p. 1445-1456.
120. Jobes, D.A., et al., *Empirical criteria for the determination of suicide manner of death.* Journal of Forensic Sciences, 1991.
121. Center, K.S.P., *2020 Suicide Prevention Whitebook.*
122. Oni-Orisan, A., et al., *Altered vesicular glutamate transporter expression*

in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. Biological psychiatry, 2008. **63**(8): p. 766-775.
123. Eggan, S.M., T. Hashimoto, and D.A. Lewis, *Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia.* Archives of general psychiatry, 2008. **65**(7): p. 772-784.
124. Freyberg, Z., S.J. Ferrando, and J.A. Javitch, *Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action.* American Journal of Psychiatry, 2010. **167**(4): p. 388-396.
125. Law, A.J., et al., *Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders: molecular evidence for a pathology of dendritic spines.* American Journal of Psychiatry, 2004. **161**(10): p. 1848-1855.
126. Basil, B., et al., *The CATIE study.* The American Journal of Psychiatry, 2006. **163**(3): p. 555; author reply 555-6.
127. Tamminga, C.A., et al., *Neuroleptic-induced vacuous chewing movements as an animal model of tardive dyskinesia: a study in three rat strains.* Psychopharmacology, 1990. **102**(4): p. 474-478.
128. Konopaske, G.T., et al., *Effect of chronic antipsychotic exposure on astrocyte and oligodendrocyte numbers in macaque monkeys.* Biological psychiatry, 2008. **63**(8): p. 759-765.
129. Puranik, R., et al., *Sudden death in the young.* Heart rhythm, 2005. **2**(12): p. 1277-1282.
130. Kannel, W.B., J.F. Plehn, and L.A. Cupples, *Cardiac failure and sudden death in the Framingham Study.* American heart journal, 1988. **115**(4): p. 869-875.
131. Lim, M., S.U. Lee, and J.-I. Park, *Difference in suicide methods used between suicide attempters and suicide completers.* International journal of mental health systems, 2014. **8**(1): p. 1-4.
132. Sato, T., et al., *A preliminary study on postmortem interval estimation of suffocated rats by GC-MS/MS-based plasma metabolic profiling.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2015. **407**(13): p. 3659-3665.

Abstract

Identification of Biomarkers of Suicide Using Postmortem Brain Tissue

Min Ji Kim

Department of Medicine (Psychiatry)

The Graduate School

Seoul National University

Introduction: Suicide is the leading cause of death worldwide and a serious public health problem. Even though suicide occurs under the influence of various factors, it is important to understand its underlying biological mechanism in order to prevent and treat suicide. Existing suicide research is studied in patients with high-risk suicidal behavior. However, their biological characteristics may still differ from those that have completed suicide. Out study aims to investigate the biological basis of suicide, using a proteomic approach, which we believe has not been attempted before in Korea.

Methods: A protocol for proteomic analysis of postmortem brain tissue samples was established through a pilot study using 3 cases of suicidal deaths and 3 cases of sudden death. The established study protocol was applied to a larger sample of 36 postmortem brain tissues (23 suicide

survivors and 13 controls). Post confirmation of brain tissue quality, proteomic profiling of the prefrontal cortex (Broadmann areas 9 and 10) was performed using a tandem mass tag-based quantification technique, along with liquid chromatography analysis. Gene Ontology analysis, Ingenuity Pathway Analysis, Gene Set Enrichment Analysis, and Weighted Gene Co-expression Network Analysis were used as tools to extract functional units and biological pathway information related to suicidal death. Furthermore, subgroups were created based on clinical information such as psychiatric diagnosis, psychotropic use, and alcohol use at the time of death, and subgroup analysis was conducted to identify proteins commonly or differentially expressed in the samples.

Results: The tissue quality of 36 postmortem brains was evaluated and confirmed. Proteomic analysis, comparing brains from suicide and sudden death, showed significant differences in the expression of 295 (244 up-regulated, 81 down-regulated) out of 9,801 identified proteins. The in vivo cannabinoid, GABA, and apoptosis pathways were significantly altered in brains from suicidal deaths, when compared with sudden death. Furthermore, proteins like CAPNS1, CSNK2B, and PTP4A2 were differentially expressed in suicide victims, within networks related to nervous system development and function. A subgroup analysis was performed on the basis of clinical information in the suicidal deaths, and GSTT1 was found as a protein that showed a

significant difference depending on the presence or absence of mental illness, and S100A10 seemed to be associated with alcohol use disorder.

Conclusion: Our study is the first in Korea to analyze proteins using the postmortem suicide brain. Among the proteomic studies based on the brains of suicide victims so far, the largest number of proteins were identified in the current study. Also, new and relevant suicide-related biological pathways, such as the in vivo cannabinoid, GABA, and the apoptosis pathways were suggested to be related to suicidal death. This study will serve as a basis for the identification of more specific suicide-death-related mechanisms in the future.

Key words: suicide, postmortem brain tissue, cannabinoid pathway, GABA pathway, apoptosis
Student Number: 2018-32550