

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena N. Karanović

**VARIJANTE U GENIMA ZA EDITOVANJE RNK,
SEROTONINSKI RECEPTOR 2C I TRIPTOFAN-
HIDROKSILAZU 2 KAO FAKTORI RIZIKA ZA
POKUŠAJ SAMOUBISTVA KOD PSIHIJATRIJSKIH
BOLESNIKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena N. Karanović

**VARIANTS IN RNA EDITING, SEROTONERGIC
RECEPTOR 2C AND TRYPTOPHAN-HYDROXYLASE
2 GENES AS RISK FACTORS FOR SUICIDE
ATTEMPT IN PSYCHIATRIC PATIENTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor:

dr Dušanka Savić-Pavićević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu–Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Goran Brajušković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu–Biološki fakultet

dr Maja Ivković, docent
Univerzitet u Beogradu–Medicinski fakultet

dr Vladimir Jovanović, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu–Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Ova doktorska disertacija urađena je u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao deo projekta “Analiza promena u strukturi genoma kao dijagnostički i prognostički parametar humanih bolesti“ (OI 173016), pod neposrednim rukovodstvom prof. dr Dušanke Savić-Pavićević. Doktorska disertacija je rezultat saradnje Centra za humanu molekularnu genetiku i Klinike za psihijatriju Kliničkog centra Srbije.

Mom mentoru, prof. dr Dušanki Savić-Pavićević dugujem najveću zahvalnost, na odabiru beskrajno zanimljive teme doktorske disertacije, na usmeravanju tokom planiranja njenog originalnog dizajna i eksperimentalnog rada, na inspirativnoj i dinamičnoj atmosferi pri analizi i interpretaciji rezultata, na finalnom uobličavanju teze i radova, i na otvaranju novih pitanja i perspektiva u istraživanju epigenetičkih mehanizama.

Prof. dr Goranu Brajuškoviću dugujem ogromnu zahvalnost na svim korisnim savetima i sugestijama tokom osnovnih studija, kao i tokom izrade ove doktorske disertacije, a posebno u njenim odlučujućim fazama i prekretnicama.

Doc. dr Maji Ivković i dr Maji Pantović-Stefanović dugujem ogromnu zahvalnost na divnoj saradnji i nesebično podeljenoj kolekciji psihijatrijskih bolesnika sa svim relevantnim socio-demografskim i kliničkim podacima bez kojih ova studija ne bi bila izvodljiva.

Dr Vladimiru Jovanoviću, mom učitelju i motivatoru u svetu čudesnog programa R, neizmerno hvala na posvećenom vremenu i ogromnoj pomoći tokom analize i interpretacije rezultata ove disertacije, kao i na korisnim savetima tokom uobličavanja finalnih verzija ove teze i radova koji su iz nje proizašli.

Ogromnu zahvalnost dugujem Saši Švikoviću, Svetlani Đurici i Maši Ivin što su značajan deo svog vremena, energije i interesovanja podelili sa mnom tokom izrade eksperimentalnog dela ove teze. Svojim kolegama iz Centra za humanu molekularnu genetiku Milošu Brkušaninu, Zorani Dobrijević, Jovanu Pešoviću, Nemanji Vučiću i Neveni Kotarac, kao i svim studentima koje sam upoznala u Centru, beskrajno hvala na druženju, lepoj i prijatnoj svakodnevnoj radnoj atmosferi.

Svojoj porodici neizmerno zahvaljujem na beskrajnoj ljubavi, razumevanju i podršci, a posebno mojoj Sofiji koja mi je život učinila lepšim i sadržajnijim.

Naslov: Varijante u genima za editovanje RNK, serotonininski receptor 2C i triptofan-hidroksilazu 2 kao faktori rizika za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Sažetak: Samoubilačko ponašanje predstavlja globalni zdravstveni problem s obzirom da oko milion ljudi godišnje izvrši samoubistvo, a efikasne mere prevencije ili lečenja ne postoje. Kao i drugi složeni fenotipovi, etiologija samoubilačkog ponašanja vezuje se za brojne genetičke i sredinske faktore rizika i njihove međusobne interakcije. Pokušaj samoubistva je često, ali ne i nužno, povezan sa psihijatrijskim oboljenjima i stresnim događajima tokom života, kao što su stresni događaji iz detinjstva i akutni stresni događaji. Neurobiološka istraživanja ukazuju na hipofunkciju serotonininskog sistema kod osoba sa samoubilačkim ponašanjem. Editovanje RNK deaminacijom adenzina u inozin, katalizovan enzimima ADAR i ADARB1, doprinosi finoj i dinamičnoj regulaciji i održavanju optimalne serotoniniske transmisije kroz editovanje transkripata za triptofan-hidroksilazu 2 (*TPH2*), enzima koji katalizuje sintezu serotoninina u mozgu, i transkripata za postsinaptički serotonininski receptor 2C (*HTR2C*). Cilj ove doktorske teze je identifikacija varijanti u genima *TPH2*, *HTR2C*, *ADAR* i *ADARB1*, stresnih životnih događaja i njihovih međusobnih interakcija koje mogu napraviti razliku između psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili.

Studija je uključila 353 psihijatrijska bolesnika sa dijagnozom depresivnog poremećaja, bipolarnog afektivnog poremećaja i shizofrenije, od kojih je 165 pokušalo samoubistvo, dok njih 188 nije. Stresni događaji iz detinjstva i akutni stresni događaji procenjeni su korišćenjem upitnika Early Trauma Inventory–Self Report i List of Threatening Experiences Questionnaire, redom. Primenom Pirsonovog χ^2 -testa i logističke regresije testirane su potencijalne pojedinačne asocijacije stresnih događaja tokom detinjstva, akutnih stresnih događaja, 23 tag varijante gena *ADAR* i *ADARB1*, varijanta rs6318 gena *HTR2C* i varijante rs7305115 i rs4290270 gena *TPH2* sa pokušajem samoubistva. Generalizovani linearni modeli i selekcija unazad primenjeni su za ispitivanje udruženih efekata pojedinačnih faktora i njihovih interakcija na rizik za pokušaj samoubistva, uključujući psihijatrijske dijagnoze, pol i starost bolesnika kao konfounderi.

Opšte traume i emocionalno zlostavljanje tokom detinjstva, akutni stresni životni događaji, rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI*, haploblok rs9637192-rs2253763-rs4819035 iz 3' kraja gena *ADARBI*, kao i rs6318 gena *HTR2C* identifikovani su kao pojedinačni faktori rizika za pokušaj samoubistva u ispitivanom uzorku psihijatrijskih bolesnika. Ispitivanjem udruženog efekta pojedinačnih i interaktivnih efekata sredinskih i genetičkih faktora rizika ustanovljena su dva najbolje fitovana minimalna modela koja bi mogla identifikovati psihijatrijske bolesnike sa povećanim rizikom za pokušaj samoubistva. Jedan model obuhvatio je udruženi efekat emocionalnog zlostavljanja, akutnih stresnih događaja, rs9983925 gena *ADARBI* i rs6318 gena *HTR2C*, kao pojedinačnih faktora rizika, i interakcije opštih trauma iz detinjstva sa psihijatrijskim dijagnozama i emocionalnim zlostavljanjem. Drugi model identifikovao je udruženi efekat opštih trauma iz detinjstva, kao pojedinačnih faktora rizika, dvostruku interakciju opštih trauma i rs4290270 gena *TPH2* i trostruku interakciju opštih trauma, rs4290270 gena *TPH2* i rs4819035 gena *ADARBI*.

Rezultati studije ukazuju da geni *ADARBI*, *HTR2C* i *TPH2* i kumulativno izlaganje različitim stresnim događajima tokom detinjstva i akutnim stresnim događajima ostvaruju udruženi efekat koji doprinosi predispoziciji za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika, pre svega onih sa dijagnozom depresivnog poremećaja ili bipolarnog afektivnog poremećaja.

Ključne reči: pokušaj samoubistva, editovanje RNK, serotoniniski receptor 2C, triptofan-hidroksilaza, zlostavljanje u detinjstvu, stresni događaji, gen-sredina interakcije, rizični faktori, studija asocijacije, statistički model.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

UDK broj: [[577.21:575.22]+316.614.5]:616.89-008.441.44(043.3)

Title: Variants in RNA editing, serotonergic receptor 2C and tryptophan-hydroxylase 2 genes as risk factors for suicide attempt in psychiatric patients

Abstract: Suicidal behavior is a global health problem since about one million people per year commit suicide and there is no effective prevention or treatment. Like other complex phenotypes, etiology of suicidal behavior is associated with numerous genetic and environmental risk factors and their interactions. A suicide attempt is often, although not necessarily, associated with psychiatric disorders and stressful life events, such as childhood abuse and acute stressful life events. Neurobiological studies have indicated a hypofunction of the serotonin system in patients with suicidal behavior. RNA editing by deamination of adenosine to inosine, catalysed by ADAR and ADARB1 enzymes, contributes to fine and dynamic tuning and maintenance of an optimal serotonin transmission through the editing of transcripts encoded by the tryptophan-hydroxylase 2 (*TPH2*) and serotonin receptor 2C (*HTR2C*) genes. TPH2 is a rate limiting enzyme for serotonin synthesis in the brain, while HTR2C is a postsynaptic receptor. The aim of this doctoral thesis was to identify variants in the *TPH2*, *HTR2C*, *ADAR* and *ADARB1* genes, individual stressful life events, and possible interaction among these factors that might help to differentiate between psychiatric patients who attempted suicide and those who did not.

The study included 353 patients diagnosed with major depressive disorder, bipolar affective disorder and schizophrenia, of which 165 attempted suicide, while 188 did not. Childhood abuse and acute stressful life events were evaluated using the Early Trauma Inventory Self-Report questionnaire and the List of Threatening Experiences Questionnaire, respectively. Pearson's χ^2 -test and logistic regression were performed to test potential individual association of various domains of child abuse, acute stressful events, 23 *ADAR* and *ADARB1* tag variants, *HTR2C* variant rs6318 and *TPH2* variants rs7305115 and rs4290270 with attempted suicide. Generalized linear models and backward selection were applied to test the joint effect of individual and interacting effects of examined factors on suicide attempt, including psychiatric diagnoses, patients' gender and age as potential confounders.

Childhood general traumas and emotional abuse, acute stressful life events, *ADARBI* rs9983925 and rs4819035, haploblock rs9637192-rs2253763-rs4819035 at the 3' end of the *ADARBI* gene, and *HTR2C* rs6318 were identified as individual risk factors for suicide attempt in the examined sample of psychiatric patients. The examination of the joint effect of the individual and interactive effects of environmental and genetic risk factors revealed two best fitting minimal models which might identify psychiatric patients with an increased risk for suicide attempt. One model included the joint effect of emotional abuse, acute stressful events, *ADARBI* rs9983925 and *HTR2C* rs6318 as individual risk factors and the two-way interactions of childhood general traumas with psychiatric diagnoses and with emotional abuse. Another model revealed the joint effect of childhood general traumas as individual risk factors, a two-way interaction of general trauma and *TPH2* rs4290270 and a three-way interaction of general traumas, *TPH2* rs4290270 and *ADARBI* rs4819035.

The results of this study indicate that *ADARBI*, *HTR2C* and *TPH2* genes and a cumulative exposure to a variety of childhood and acute stressful events display a joint effect that contributes to a predisposition for suicide attempt in psychiatric patients, primarily in those suffering from major depressive disorder or bipolar affective disorder.

Key words: attempted suicide, RNA editing, serotonin receptor 2C, tryptophan-hydroxylase, child abuse, stressful events, gene-environment interaction, risk factors, association study, statistical model.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular Biology

UDC number: [[577.21:575.22]+316.614.5]:616.89-008.441.44(043.3)

Lista skraćenica

ADAR –adenozin deaminaza koja deluje na RNK

ADARB1 –adenozin deaminaza B1 koja deluje na RNK

CI – interval poverenja (eng. *confidence interval*)

df – broj stepeni slobode (eng. *degrees of freedom*)

E x E – interakcija sredina-sredina

ETI-SR – *Early Trauma Inventory–Self Report*

G x E – interakcija gen-sredina

G x G – interakcija gen-gen

GLMs – generalizovani linearni modeli (eng. *Generalized Linear Models*)

HTR2C – serotoninski receptor 2C

kb – kilobaza

LD – neravnotežna vezanost (eng. *linkage disequilibrium*)

LTE-Q – *List of Threatening Experiences Questionnaire*

OR – odnos verovatnoća (eng. *odds ratio*)

MAF – učestalost ređeg alela (eng. *minor allele frequency*)

SA – pokušaj samoubistva (eng. *suicide attempt*)

SNVs – tačkaste varijante (eng. *single nucleotide variants*)

tagSNVs – tag tačkaste varijante

TPH2 – triptofan-hidroksilaza 2

UTR – netranslatirajući region (eng. *untranslated region*)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Samoubilačko ponašanje i faktori rizika	1
1.2. Psihijatrijska oboljenja kao faktori rizika za pokušaj samoubistva	3
1.3. Stresni životni događaji kao faktori rizika za pokušaj samoubistva	5
1.4. Pristupi u izučavanju genetičkih faktora rizika	6
1.5. Hipofunkcija serotoninskog sistema i samoubilačko ponašanje	8
1.5.1. Serotoninski sistem	9
1.5.2. Triptofan-hidroksilaza 2	11
1.5.3. Serotoninski receptor 2C	13
1.6. Editovanje RNK i samoubilačko ponašanje	14
1.7. Interakcije stresnih životnih događaja, serotoninskog sistema i editovanja RNK	21
2. Ciljevi rada	23
3. Materijal i metode	24
3.1. Ispitanici	24
3.2. Instrumenti za procenu stresnih životnih događaja	25
3.3. Odabir tačkastih varijanti gena-kandidata	26
3.3.1. Odabir tačkastih varijanti gena <i>HTR2C</i> i <i>TPH2</i>	26
3.3.2. Odabir tag tačkastih varijanti gena <i>ADAR</i> i <i>ADARBI</i>	26
3.3.3. Prikupljanje karakteristika odabranih tačkastih varijanti i njihova funkcionalna anotacija	33
3.4. Molekularno-genetičke metode	33
3.4.1. Izolovanje DNK, provera kvaliteta i kvantifikacija	33
3.4.2. Genotipizacija tačkastih varijanti primenom eseja alelske diskriminacije	35
3.4.3. Genotipizacija tačkastih varijanti metodom polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata	38
3.5. Statistička obrada rezultata	39
4. Rezultati	44
4.1. Karakteristike ispitanika	44
4.2. Asocijacija stresnih životnih događaja sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika	45
4.3. Odabrane tag tačkaste varijante u <i>ADAR</i> i <i>ADARBI</i> regionima od interesa	48

4.4. Karakteristike i funkcionalna anotacija tačkastih varijanti <i>ADAR</i> i <i>ADARBI</i> regiona od interesa i gena <i>HTR2C</i> i <i>TPH2</i>	52
4.5. Rezultati molekularno-genetičkih metoda	55
4.6. Asocijacije alela i genotipova varijanti gena <i>ADAR</i> , <i>ADARBI</i> , <i>HTR2C</i> i <i>TPH2</i> sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika	58
4.7. Asocijacija hablobloka 2 <i>ADARBI</i> regiona od interesa sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika	62
4.8. Udruženi efekat gena <i>HTR2C</i> , gena <i>ADARBI</i> , stresnih životnih događaja i psihijatrijskih dijagnoza na rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika.....	64
4.9. Asocijacija interakcije rs4290270 gena <i>TPH2</i> i opštih trauma iz detinjstva sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika	67
4.10. Udruženi efekat gena <i>TPH2</i> , gena <i>ADARBI</i> i opštih trauma iz detinjstva na rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika.....	69
5. Diskusija	73
6. Zaključci	92
7. Literatura	94
8. Prilozi	111
8.1. Upitnik LTE-Q za procenu akutnih stresnih događaja	111
8.2. Asocijacije interakcija varijante rs4290270 gena <i>TPH2</i> i domena zlostavljanja iz detinjstva sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika	112
8.3. Raspodela ispitanika prema genotipovima rs4290270 gena <i>TPH2</i> i rs4819035 gena <i>ADARBI</i> i opštim traumama iz detinjstva.....	116

1. Uvod

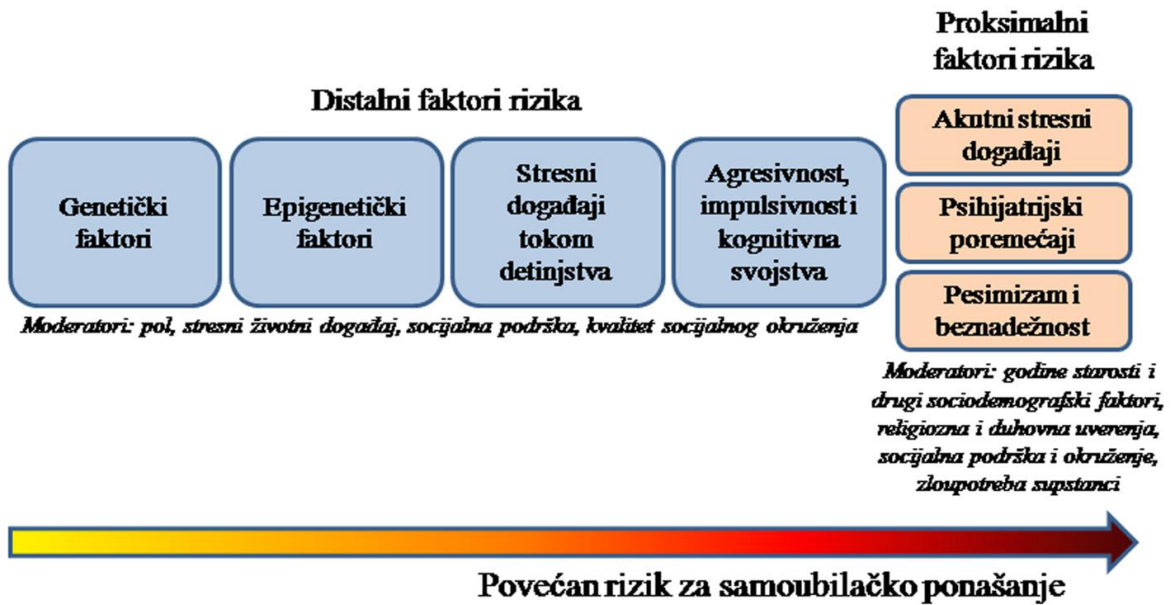
1.1. Samoubilačko ponašanje i faktori rizika

Samoubilačko ponašanje predstavlja fenotipski kontinuum koji obuhvata samoubilačke ideacije, pokušaje samoubistva različitog stepena letalnosti i izvršena samoubistva (Mann, 2003). Samoubilačke ideacije su razmišljanja o samoubistvu sa ili bez njegovog planiranja. Pokušaj samoubistva predstavlja svaki svestan samopovređujući postupak sa jasno izraženom namerom da se oduzme sopstveni život i smatra se najvažnijim prediktivnim faktorom za smrtni ishod koji je posledica samoubistva (Gunnell and Lewis, 2005).

Samoubilačko ponašanje predstavlja globalni zdravstveni problem za koji ne postoje efikasne mere prevencije ili lečenja. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, oko milion ljudi godišnje izvrši samoubistvo (World Health Organization, 2012a), uz očekivani trend porasta na 1.5 milion ljudi do 2020. godine (Levi et al., 2003). U Americi je, na primer, samoubistvo češći uzrok smrti u poređenju sa saobraćajnim nesrećama, karcinomom prostate ili ubistvima (Suicide watch, 2014). Prosečna godišnja stopa samoubistva u Evropi iznosi 13.9/100000 (World Health Organization, 2012b), dok su najveće stope zabeležene u istočnim evropskim zemljama, dostižući preko 30/100000 (World Health Organization, 2012a). Prosečna godišnja stopa samoubistva u Srbiji je nešto viša od proseka u Evropi i iznosi 18.15/100000 (Dedic, 2014). Izvršeno samoubistvo rangirano je kao petnaesti globalni uzročnik smrti tokom 2012. godine, dok je stopa pokušaja samoubistva čak 20 puta veća (World Health Organization, 2014). Stopa izvršenja samoubistva je četiri puta veća kod muškaraca nego kod žena, iako žene tri puta češće pokušavaju samoubistvo (Mościcki, 1994).

Zabrinjavajući podaci o učestalosti samoubilačkog ponašanja doprineli su da Svetska zdravstvena organizacija 2014. godine kao svoj imperativ postavi prevenciju samoubistva. Skoro istovremeno, samoubilačko ponašanje dobija status nezavisne dijagnoze prema kriterijumima DSM-5 (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition*), objavljenim 2013. godine od strane Američkog udruženja psihijatara (American Psychiatric Association, 2013). Naime, iako je samoubilačko ponašanje veoma često povezano sa psihijatrijskim poremećajima (Beautrais et al., 1996; Hawton and van Heeringen, 2009), prema kriterijumima DMS-5, ovaj fenotip definiše se kao pretpostavljena dijagnoza za sve osobe koje su pokušale da izvrše samoubistvo tokom poslednje dve godine života, uz napomenu da je samoubilačko ponašanje neophodno dodatno istraživati pre nego što postane rutinska klinička dijagnoza (American Psychiatric Association, 2013).

Samoubilačko ponašanje predstavlja složeni fenotip uzrokovan brojnim faktorima rizika i njihovim međusobnim interakcijama. Prema modelu 'predispozicija-stres' za samoubilačko ponašanje (eng. '*diathesis-stress*'), 'predispozicija' je određena stepenom individualne osetljivosti na stresne uslove koji predstavljaju okidače za samoubilačke postupke (Mann, 2003) (Slika 1.1). 'Predispoziciju' definišu distalni faktori rizika, dok komponenta 'stresa' obuhvata proksimalne faktore rizika. Prema dopunjenom originalnom modelu 'predispozicija-stres' za samoubilačko ponašanje (Mann, 2003), distalni faktori rizika obuhvataju genetičke i epigenetičke faktore, stresne događaje iz detinjstva, crte ličnosti kao što su impulsivnost i agresija, i kognitivna svojstva (Turecki et al., 2012). Proksimalni faktori rizika uključuju akutne stresne životne događaje, psihijatrijske poremećaje, pesimizam i osećaj beznadežnosti. Efekat distalnih i proksimalnih faktora rizika dalje može biti modifikovan različitim moderatorima (Slika 1.1). Ukupan rizik neke osobe za samoubilačko ponašanje određen je udruženim efektom različitih kombinacija distalnih i proksimalnih faktora rizika.



Slika 1.1. Model etiologije samoubilačkog ponašanja 'predispozicija-stres'. 'Predispoziciju' za samoubilačko ponašanje određuje stepen individualne osetljivosti na stresne uslove koji predstavljaju okidače za samoubilačke postupke. 'Predispozicija' je definisana distalnim faktorima rizika, dok komponenta 'stresa' obuhvata proksimalne faktore rizika. Efekat proksimalnih i distalnih faktora rizika za samoubilačko ponašanje može biti modifikovan različitim faktorima, označenim kao moderatori (modifikovano prema Turecki et al., 2012).

1.2. Psihijatrijska oboljenja kao faktori rizika za pokušaj samoubistva

Poremećaji raspoloženja, kao što su depresivni poremećaj (eng. *major depressive disorder*) ili bipolarni afektivni poremećaj (eng. *bipolar affective disorder*) najčešće su psihijatrijske dijagnoze u trenutku pokušaja samoubistva (Beautrais et al., 1996). Depresivni poremećaj se karakteriše lošim raspoloženjem, smanjenim osećajem zadovoljstva (anhedonijom) u većini svakodnevnih aktivnosti, psihomotornom retardacijom (agitacijom), konstantnim osećajem umora ili nedostatkom energije, osećajem bezvrednosti ili krivice, poremećajem mišljenja, poteškoćama u koncentraciji i donošenju odluka, poremećajima apetita i spavanja, i čestim razmišljanjima o smrti (American Psychiatric Association, 2000, 2013). Bipolarni afektivni poremećaj je karakterističan po cikličnom smenjivanju epizoda depresije i manije (American Psychiatric Association, 2000; 2013). Epizode depresije su slične kao kod depresivnog poremećaja, dok epizode manije predstavljaju pojačano, ekspanzivno ili iritabilno raspoloženje, poput pojačanog osećaja lične vrednosti

(grandioznosti), smanjenu potrebu za spavanjem, povećanu govornost, nalete ideja ili subjektivnog doživljaja da se misli utrkuju, lako skretanje pažnje na nebitne spoljašnje stimulse, pojačane aktivnosti usmerene ka određenom cilju, psihomotorne agitacije i povećano učešće u prijatnim aktivnostima koja mogu imati veoma bolne posledice.

Samoubilačko ponašanje prisutno je i kod bolesnika sa shizofrenijom (eng. *schizophrenia*) (Gallego et al., 2015). Ona predstavlja tešku mentalnu bolest praćenu dubokim poremećajima u procesu mišljenja, percepcije, kognitivnih, emocionalnih i voljno-nagonskih funkcija (American Psychiatric Association, 2000; 2013). Karakteriše se pozitivnom (produktivnom, psihotičnom) simptomatologijom i/ili negativnim sindromom. Pozitivna simptomatologija podrazumeva sumanute ideje i uverenja (deluzije), halucinacije, dezorganizaciju ponašanja i motoričke poremećaje poput agitacije, nepomičnosti (katatonije) ili ponavljanja pokreta. Negativni sindrom se karakteriše apatijom, anhedonijom, ambivalencijom, socijalnom restrikcijom, nemogućnošću započinjanja ili izvršavanja planirane aktivnosti i smanjenom govornosti. Usled navedenih simptoma, osoba nije u mogućnosti da funkcioniše normalno u radnom okruženju, međuljudskim odnosima, niti da adekvatno brine o sebi.

Većina osoba u trenutku kada izvrše ili pokušaju samoubistvo imaju dijagnostikovan neki psihijatrijski poremećaj (Beautrais et al., 1996; Cavanagh et al., 2003), tako da je učestalost samoubilačkog ponašanja veća u grupi psihijatrijskih bolesnika u odnosu na opštu populaciju. Na primer, osobe sa dijagnozom depresivnog poremećaja imaju 20 puta povećan rizik za samoubistvo u odnosu na opštu populaciju (Kutcher and Chehil, 2011). Takođe, podaci ukazuju da je pokušaj samoubistva dva puta češći kod bolesnika sa bipolarnim afektivnim poremećajem u odnosu na bolesnike sa depresivnim poremećajem (Holma et al., 2014). Sa druge strane, značajan broj psihijatrijskih bolesnika nikada ne ispolji samoubilačko ponašanje (Beghi et al., 2013; Bostwick and Pankratz, 2000) što je dugi niz godina bilo osnov da se samoubilačko ponašanje izučava nezavisno od primarne psihijatrijske dijagnoze. Ovakvo mišljenje je, kao što je već navedeno, u skladu sa sadašnjim kriterijumima DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013).

1.3. Stresni životni događaji kao faktori rizika za pokušaj samoubistva

Stresni životni događaji predstavljaju nezavisne i veoma intenzivne faktore rizika i okidače za samoubilačko ponašanje (Turecki et al., 2012). Stresni događaji iz detinjstva najčešće podrazumevaju različite tipove zlostavljanja osoba uzrasta do 15. ili 18. godine života od strane osoba koji su minimum pet godina starije (Brodsky and Stanley, 2008). Oni mogu imati familijarnu ili socijalnu formu, u zavisnosti da li se dešavaju u kućnim uslovima ili u različitim socijalnim okruženjima, kao i da li potiču od članova porodice, bliskih prijatelja ili stranaca (Brezo et al., 2008). Najčešće kategorije stresnih događaja iz detinjstva su fizičko ili emocionalno zanemarivanje ili zlostavljanje, i seksualno zlostavljanje. Fizičko zlostavljanje deteta podrazumeva nanošenje telesne povrede, zatvaranje u određenu prostoriju ili uskraćivanje vode, hrane, odeće i adekvatne higijene. Emocionalno zlostavljanje je poricanje i neadekvatno vrednovanje dečijih osećanja ili neobraćanje pažnje na dečije emocionalne potrebe. Seksualno zlostavljanje može biti kontaktno ili beskontaktno. Pod zlostavljanjem iz detinjstva podrazumeva se i postojanje nasilnog ponašanja među roditeljima, njihovo razdvajanje ili razvod, prisustvo mentalno obolelih ukućana bez adekvantne brige, ukućana koji koriste nedozvoljene supstance (droge, alkohol) ili pripadaju kriminalnom miljeu, nedostatak finansijskih sredstava u porodici i nedostatak socijalne podrške (Brezo et al., 2008; Dube et al., 2001). Kod dece koja su žrtve zlostavljanja često se ispoljavaju promene ponašanja i raspoloženja, kao što su anksioznost, agresija, hiperaktivnost, nemogućnost održavanja pažnje i slično (Brezo et al., 2008).

Svi ispitivani tipovi stresnih događaja iz detinjstva dva do pet puta povećavaju rizik za pokušaj samoubistva tokom života (Dube et al., 2001). Među njima, kao najznačajniji faktori rizika, ističu se fizičko i seksualno zlostavljanje (Brezo et al., 2008; Brodsky and Stanley, 2008), koji su i najčešće ispitivani stresni događaji iz detinjstva. Kod osoba koje su doživele i fizičko i seksualno zlostavljanje, rizik za pokušaj samoubistva je dodatno povećan (Leverich et al., 2003).

Akutni stresni životni događaji podrazumevaju nedavno doživljene događaje koji predstavljaju promene u rutini svakodnevnog života (Liu and Miller, 2014). Akutni stresni

dogadjaji mogu biti pozitivni i negativni, a njihov efekat zavisi od subjektivnog doživljaja. Pozitivni događaji predstavljaju rođenje deteta, venčanje, iznenadni priliv velikog novca, upis deteta na fakultet, osamostaljivanje i odlazak deteta iz kuće (Brezo et al., 2008; Liu and Miller, 2014). Negativni događaji mogu biti teško oboljenje ili povreda kod same osobe ili osobe iz bliskog okruženja, smrt deteta ili bliskog člana porodice ili prijatelja, problemi vezani za posao ili školu, fizičko i seksualno nasilje nad ženama, finansijska kriza, razdvajanje ili razvod od emotivnog partnera, problemi vezani za roditeljstvo i slično. Za razliku od stresnih događaja iz detinjstva, čiji se efekti na samoubilačko ponašanje ispoljavaju u adultnom periodu života, akutni stresni događaji uglavnom predstavljaju neposredne povode za pokušaj samoubistva, čak i kod osoba koje nemaju psihijatrijsku dijagnozu (Liu and Miller, 2014).

Merenje stresnih životnih događaja vrši se pomoću semistruktuiranih upitnika, koji predstavljaju pažljivo osmišljene i testirane kliničke instrumente, ili putem nezavisnih izveštaja, na primer, iz policijskih uprava i sudskih postupaka (Liu and Miller, 2014). Za potrebe naučnih istraživanja prednost se daje upotrebi standardizovanih kliničkih instrumenata koji imaju potvrđenu validnost i pouzdanost.

1.4. Pristupi u izučavanju genetičkih faktora rizika

Na osnovu studija na blizancima i usvojenoj deci, procenjena heritabilnost samoubilačkog ponašanja je 30-55% (Voracek and Loibl, 2007). Prema navodima nekih studija, procenjena heritabilnost pokušaja samoubistva iznosi 17-55% (Brent and Mann, 2005). Genetička osnova pokušaja samoubistva nije razjašnjena, i smatra se da se, barem delimično, razlikuje od genetičke osnove drugih psihijatrijskih poremećaja (Brezo et al., 2010).

Poslednjih dvadesetak godina doprinos genetičke osnove složenim osobinama, u koje spadaju i česte bolesti kao što su psihijatrijska oboljenja i samoubilačko ponašanje, uglavnom se ispituje studijama genetičke asocijacije. U osnovi ovog pristupa je hipoteza 'česta bolest–česta varijanta', prema kojoj česte genetičke varijante doprinose razvoju česte bolesti, na takav način da svaka pojedinačna genetička varijanta niti je neophodna, niti

dovoljna za razvoj određene bolesti, već je genetička predispozicija posledica kumulativnog efekta velikog broja čestih varijanti (Risch and Merikangas, 1996). Neka tačkasta varijanta smatra se čestom ukoliko je učestalost njenog manje zastupljenog alela veća od 1-5%, i one, za razliku od retkih varijanti povezanih sa mendelovskim (retkim) bolestima, imaju veoma malu penetrabilnost (Schork et al., 2009).

Studije genetičke asocijacije procenjuju uticaj genetičkih faktora, najčešće čestih tačkastih varijanti (eng. *single nucleotide variants*, SNVs), na razvoj složenih osobina u određenoj populaciji, poređenjem učestalosti određenih genetičkih varijanti između slučajeva (bolesnika) i kontrola (eng. *case-control study*) ili između slučajeva podeljenih u dve grupe na osnovu određenih fenotipskih osobina (eng. *case-only study*) (Al-Chalabi, 2009; Lewis and Knight, 2012). U studijama genetičke asocijacije može se ispitivati kompletan genom (eng. *genome-wide association studies*, GWAS), ili pojedinačni genikandidati (Pettersson et al., 2009). Osim razlike u veličini regiona genoma koji se ispituje, osnovna razlika između navedenih pristupa je početna hipoteza. Naime, u slučaju studija na nivou celog genoma početna hipoteza ne postoji, već se ispituje kompletan genom u cilju identifikacije lokusa koji su povezani sa ispitivanim složenim fenotipom. U slučaju ispitivanja gena-kandidata, polazi se od pretpostavljene hipoteze o mogućoj povezanosti datog gena sa ispitivanim fenotipom na osnovu njegove biološke funkcije ili lokalizacije njegovog produkta.

Nakon velikog broja studija na nivou celog genoma zadovoljavajuće statističke snage za razne složene osobine/česte bolesti i spoznaje da česte varijante mogu objasniti samo deo genetičke osnove ovih osobina, fokus u istraživanjima pomeren je ka identifikaciji efekata statističkih interakcija između genetičkih faktora (gen-gen, G x G) ili genetičkih i sredinskih faktora (gen-sredina, eng. *gene-environment*, G x E) (Cordell, 2009). Studije G x G mogu povećati statističku snagu studije da detektuje asocijacije genetičkih faktora sa složenim osobinama i mogu biti informativne za identifikaciju potencijanih bioloških puteva koji se nalaze u njihovoj osnovi (Cordell, 2009). Interakcije G x E podrazumevaju da jedan ili više genetičkih faktora određuje predispoziciju za individualnu osetljivost pri izlaganju nekom sredinskiom faktoru (Schwartz, 2006). Studije G x E testiraju da li postoje

statističke interakcije između genetičkih i sredinskih faktora koje bi povećavale ili smanjivale rizik za razvoj čestih bolesti.

Poznato je da su u osnovi samoubilačkog ponašanja, pored nezavisnih efekata genetičkih i sredinskih faktora, veoma važne interakcije između gena i sredine (Mann, 2003), zbog čega postoji posebna potreba za ispitivanjem interakcija različitih faktora rizika (McGowan et al., 2008). Zbog pojednostavljivanja u istraživanju heterogenih i složenih fenotipova, kao što su samoubilačko ponašanje i drugi psihijatrijski poremećaji, može se ispitivati samo određeni skup gena koji definiše tip ili deo određenog fenotipa (intermedijarni fenotip ili endofenotip) (Gottesman and Gould, 2003; Kendler and Neale, 2010). Ispitivani tipovi samoubilačkog ponašanja su samoubilačke ideacije, pokušaj samoubistva ili izvršenje samoubistva, dok endofenotipovi mogu biti impulsivnost, agresivnost, psihomotorne promene, poremećaji spavanja, kao i biološki markeri vezani, na primer, za serotoninški sistem (Mann et al., 1999).

U ovoj studiji ispitivani su geni-kandidati, odabrani na osnovu neurobiološke osnove samoubilačkog ponašanja, i njihova interakcija sa stresnim životnim događajima u grupi psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo, u cilju smanjenja fenotipske heterogenosti ispitanika.

1.5. Hipofunkcija serotoninškog sistema i samoubilačko ponašanje

Ispitivanjem *postmortem* uzoraka mozga žrtava samoubistva uočeni su poremećaji u funkcionisanju većeg broja neurotransmiterskih sistema, kao što su serotoninški, noradrenalinški i dopaminski sistem, kao i u funkcionisanju hipotalamus-hipofiza-adrenalne ose (Mann, 2003). Među njima, najčešće detektovan i najviše ispitivan poremećaj je hipofunkcija serotoninškog sistema (Bortolato et al., 2013; Mann, 2003; Ryding et al., 2008).

1.5.1. Serotoninski sistem

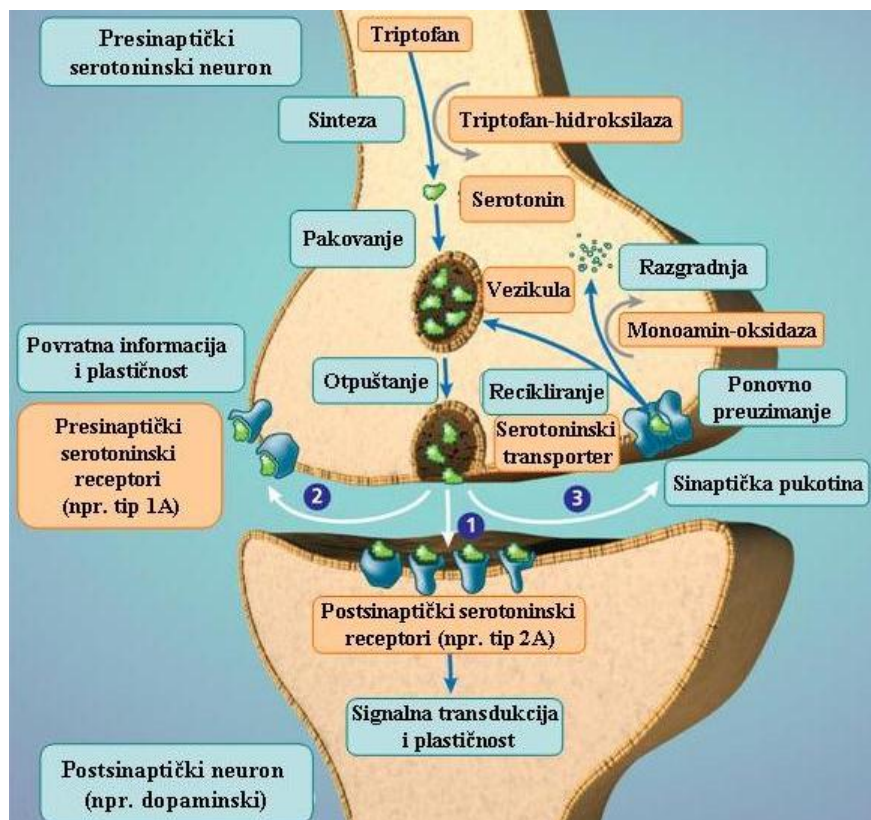
Serotoninski sistem je najrasprostranjeniji monoaminski sistem u mozgu kičmenjaka. Učestvuje u regulaciji brojnih fizioloških procesa i složenih oblika ponašanja, kao što su apetit, cirkadijalni ritam, osetljivost na bol, kognicija, raspoloženje, agresija, anksioznost, socijalno i reproduktivno ponašanje (Lucki, 1998). Ovaj neurotransmitterski sistem ima važnu ulogu u modulisanju razvića mozga i odgovora na stres.

Serotonin se u mozgu sintetiše u neuronima nukleusa *raphe* smeštenih u srednjem mozgu, moždanom stablu (Varolijevom mostu) i produženoj moždini (Hornung, 2003). Najveća količina serotonina sintetiše se u dorzalnim nukleusima *raphe* koji se nalaze u moždanom stablu. Pored centralnog nervnog sistema, serotonin se sintetiše u gastrointestinalnom traktu i trombocitima.

Serotoninski neuroni imaju veoma guste i divergentne projekcije prema specifičnim regionima mnogih delova mozga i pripadaju različitim neuronskim kolima senzornog, motornog i limbičkog sistema (Hornung, 2003). Srednji i dorzalni nukleusi *raphe* obezbeđuju paralelne i preklapajuće projekcije do mnogih struktura prednjeg mozga (eng. *forebrain*). Nakon odgovarajućeg stimulusa, serotoninska neurotransmisija odvija se uglavnom putem serotoninskih sinapsi (Slika 1.2) (aan het Rot et al., 2009).

U presinaptičkom serotoninskom neuronu, serotonin se nakon sinteze iz triptofana pakuje u vezikule iz kojih se otpušta u sinaptičku pukotinu (aan het Rot et al., 2009). Otpušten serotonin dalje prenosi stimulus vezivanjem za serotoninske receptore postsinaptičkih neurona. Istovremeno, serotonin iz postsinaptičke pukotine vezuje se i za presinaptičke serotoninske receptore, što omogućava fino podešavanje sinteze serotonina putem povratne sprege. Kod čoveka je identifikovano sedam klasa serotoninskih receptora, označenih redom od 1 do 7 (eng. *5-hydroxytryptamine receptor type 1-7*, HTR1-HTR7), pri čemu se neki od njih dele na dodatne podtipove (Hoyer et al., 1994). Na primer, klasa HTR2 obuhvata receptore HTR2A, HTR2B i HTR2C. Serotoninski receptori se odlikuju velikim funkcionalnim diverzitetom, i u zavisnosti od tipa receptora i regiona mozga u kojima se eksprimiraju pokreću različite ekscitatorne ili inhibitorne signalne puteve.

Presinaptički neuron pomoću serotoninskog transportera preuzima neiskorišćeni serotonin iz sinaptičke pukotine, koji se reciklira ponovnim pakovanjem u vezikule, ili podleže razgradnji pomoću enzima monoamin-oksidge (aan het Rot et al., 2009).



Slika 1.2. Serotoninska sinapsa. Serotonin se sintetiše iz triptofana delovanjem enzima triptofan-hidroksilaze (TPH) koja ga prevodi u 5-hidroksitriptofan, a koji se delovanjem dekarboksilaze aromatičnih aminokiselina prevodi u serotonin. Serotonin se pakuje u vezikule iz kojih se otpušta u sinaptičku pukotinu nakon stimulusa. Aktivnosti serotonina u sinaptičkoj pukotini podrazumevaju: (1) vezivanje za postsinaptičke serotoninske receptore (na primer, tip 2C) čime se signal dalje prenosi; (2) vezivanje za presinaptičke receptore (na primer, tip 1A), što obezbeđuje povratnu informaciju i reguliše plastičnost presinaptičkog neurona; (3) preuzimanje serotonina u presinaptički neuron pomoću transportera, nakon čega se ponovo pakuje u vezikule ili se razgrađuje delovanjem enzima monoamin-oksidge (modifikovano prema aan het Rot et al., 2009).

Na hipofunkciju serotoninskog sistema kod samoubilačkog ponašanja ukazala je niska koncentracija 5-hidroksiindolsirćetne kiseline, glavnog metabolita serotonina u cerebrospinalnoj tečnosti (Åsberg et al., 1986) i zadnjem mozgu (Mann et al., 1989). Takođe, nakon primene fenfluramina, koji povećava serotoninsku transmisiju inhibicijom

ponovnog preuzimanja serotonina i stimulisanjem oslobađanja serotonina iz vezikula, kod osoba koje su pokušale samoubistvo uočeno je smanjeno lučenje prolaktina, što je direktno ukazalo na postojanje smanjene aktivnosti centralnog serotonina (Malone et al., 1996; Mann et al., 1995). Pored toga, kod žrtava samoubistva opisana je za 35% veća gustina i broj serotoninskih neurona u dorzalnim nukleusima *raphe* u odnosu na osobe koje nisu ispoljavale samoubilačko ponašanje (Underwood et al., 1999). Prethodno navedeni rezultati neurobioloških istraživanja inicirali su brojne studije genetičke asocijacije u kojima je ispitivan doprinos genetičke osnove disfunkciji serotonininskog sistema kod osoba sa samoubilačkim ponašanjem. Česte tačkaste varijante mnogih gena serotonininskog sistema povezane su sa samoubilačkim ponašanjem ili njegovim određenim tipovima i endofenotipovima (Antypa et al., 2013).

1.5.2. Triptofan-hidroksilaza 2

Triptofan-hidroksilaza katalizuje prevođenje triptofana u 5-hidroksitriptofan, što ujedno predstavlja i korak ograničenja brzine sinteze serotonina (Walther and Bader, 2003). Postoje dve izoforme triptofan-hidroksilaze koje su kodirane od strane dva različita gena: triptofan-hidroksilaze 1 (*TPH1*) i triptofan-hidroksilaze 2 (*TPH2*). Neposredno nakon neočekivanog otkrića *TPH2* (Walther et al., 2003), koja se izgleda ekskluzivno eksprimira u mozgu, smatralo se da postoje periferni i centralni serotoninski sistem koji nezavisno funkcionišu (Walther and Bader, 2003). Uprkos označavanju *TPH1* kao periferne, a *TPH2* kao centralne izoforme, ubrzo je pokazano da se obe forme ekspimiraju u različitim regionima mozga čoveka (Zill et al., 2007a). Ipak, u nukleusima *raphe* nivo *TPH2* je sedam puta viši u odnosu na druge regione mozga čoveka i četiri puta viši u odnosu na *TPH1* (Zill et al., 2007a). U *postmortem* uzorcima mozga žrtava samoubistva sa dijagnozom depresivnog poremećaja opisani su povećani nivoi iRNK *TPH2* (Bach-Mizrachi et al., 2006; 2008) i proteina *TPH2* (Boldrini et al., 2005), što bi moglo predstavljati mehanizam kompenzacije na sniženi nivo serotonina kod ovih osoba (Bach-Mizrachi et al., 2008). Miševi koji ne ekspimiraju *Tph2* (*Tph2*^{-/-}) ispoljavaju agresiju i ponašanje nalik depresiji i anksioznosti (Mosienko et al., 2015), što dodatno ukazuje na moguću povezanost *TPH2* i samoubilačkog ponašanja. U dosadašnjim studijama genetičkih asocijacija, česte varijante u

genu *TPH2* pokazale su nekonzistentnu povezanost sa samoubilačkim ponašanjem (Antypa et al., 2013).

Varijante rs7305115 i rs4290270 su potencijalno funkcionalne sinonimne varijante koje se nalaze u egzonima 7 i 9 gena *TPH2*, redom. U eksperimentima alel-specifične ekspresije iRNK *TPH2* u *postmortem* uzorcima dela moždanog stabla zdravih osoba, koji je sadržao dorzalne i srednje nukleuse *raphe*, pokazano je da heterozigotni nosioci varijante rs7305115 imaju 1.2 do 2.5 puta povećanu ekspresiju iRNK *TPH2*, kao i da je ekspresija sa kopije gena koji nosi manje učestali alel veća u odnosu na ekspresiju sa kopije gena koja sadrži učestaliji alel (Lim et al., 2007). Genotipizacija dodatnih 20 tačkastih varijanti, ukazala je da u ovom regionu gena *TPH2* postoji pet čestih varijanti, uključujući i sinonimnu varijantu rs4290270, koje su u visokoj neravnotežnoj vezanosti, i čija heterozigotnost koreliše sa povećanim nivoom ekspresije iRNK *TPH2* u moždanom stablu zdravih osoba (Lim et al., 2007). Dodatno, za varijantu rs4290270 pokazano je da je povezana sa alternativnim splajsovanjem i editovanjem iRNK *TPH2* (Grohmann et al., 2010).

Varijanta rs7305115 povezana je sa pokušajem samoubistva u grupi depresivnih bolesnika iz Kine (Ke et al., 2006; Zhang et al., 2010) i heterogenoj grupi bolesnika, sa raznim psihijatrijskim i organskim poremećajima, iz Meksika (López-Narváez et al., 2015). Takođe, kao deo haplobloka povezana je sa pokušajem samoubistva kod klinički heterogene grupe finskih belaca i afričkih Amerikanaca (Zhou et al., 2005), evropske (Perez-Rodriguez et al., 2010) i meksičke populacije (López-Narváez et al., 2015). Nasuprot navedenim studijama, varijanta rs7305115 nije povezana sa izvršenjem samoubistva kod osoba nepoznate psihopatologije iz Japana (Mouri et al., 2009). Varijanta rs4290270 nezavisno je asocirana sa izvršenim samoubistvom kod osoba nepoznate psihopatologije iz Nemačke (Grohmann et al., 2010), a kao deo haplobloka i sa pokušajem samoubistva kod klinički heterogene grupe bolesnika iz Meksika (López-Narváez et al., 2015).

1.5.3. Serotoninski receptor 2C

Serotoninski receptor 2C (HTR2C) je postsinaptički G-kuplovani receptor sa konstitutivnom aktivnošću. Uključen je u regulaciju apetita, spavanja, anksioznosti i socijalnog ponašanja (Barnes and Sharp, 1999; Séjourné et al., 2015). Detektovan je u različitim delovima mozga čoveka, sa najvišim nivoom ekspresije u horoidnom pleksusu, zatim hipotalamusu i nukleusu *accumbens*, a najmanjim u prefrontalnom korteksu i cerebelumu (Pandey et al., 2006). Serotoninska transmisija posredovana receptorom HTR2C u prefrontalnom korteksu inhibitorno deluje na dopaminski sistem (Berg et al., 2008). Miševi koji ne ekspimiraju *Htr2C* (*Htr2C*^{-/-}) odlikuju se hiperfagijom, hiperaktivnošću, adultnom gojaznošću, rezistencijom na insulin, spontanom smrtnošću u adultnom periodu usled konvulzija nastalih produženim izlaganjem zvucima visoke frekvencije (audiogeni napadi), kao i izmenjenim socijalnim ponašanjem u adultnom periodu života (Séjourné et al., 2015). U prefrontalnom korteksu žrtava samoubistva opisan je povišen nivo iRNK *HTR2C* i proteina HTR2C u odnosu na kontrolni uzorak (Pandey et al., 2006). Pored toga, pozicija gena *HTR2C* na hromozomu X dodatno opravdava njegovo izučavanje u etiologiji samoubilačkog ponašanja, s obzirom da se ovaj fenotip različito ispoljava među polovima, što ukazuje na mogućnost delimično X-vezanog nasleđivanja (Bondy et al., 2006).

Varijanta rs6318 nalazi se u egzonu 4 gena *HTR2C* koji kodira signalnu sekvencu na N-kraju proteina koji se nalazi u vanćelijskom prostoru. Predstavlja nesinonimnu kodirajuću varijantu koja cistein na poziciji 23 menja u serin (Cys23Ser). U *in situ* rekonstruisanom sistemu pokazano je da izoforma Ser23 ima veću konstitutivnu aktivnost, dok je u kulturi ćelija sisara opisan njen smanjeni afinitet za serotonin, najverovatnije kao posledica povećane desenzitizacije (Okada et al., 2004).

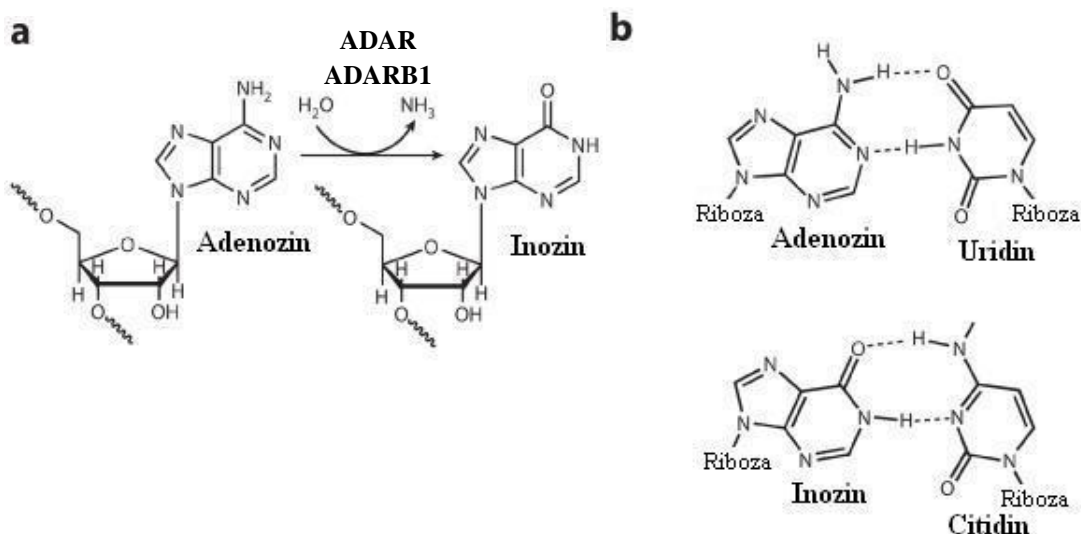
Studije genetičke asocijacije nisu pokazale povezanost varijante rs6318 sa pokušajem samoubistva u većini ispitivanih psihijatrijskih uzoraka iz Evrope (Lerer et al., 2001; Serretti et al., 2007), Kine (Zhang et al., 2008) i Meksika (Molina-Guzman et al., 2017). Sa druge strane, ona je povezana sa izvršenim samoubistvom u populaciji Slovenije (Videtic et al., 2009), dok je suprotan rezultat dobijen za populaciju Hrvatske (Stefulj et al., 2004).

Usled nekonzistentnih rezultata dosadašnjih studija asocijacije čestih varijanti gena *TPH2* i *HTR2C* sa samoubilačkim ponašanjem, postoji potreba za dodatnim istraživanjima doprinosa genetički determinisanih izmena u funkcionisanju serotoninskog sistema u fenotipski što homogenije odabranim grupama sa samoubilačkim ponašanjem. Sa druge strane, treba imati u vidu da homeostazi i optimalnom funkcionisanju serotoninskog sistema u centralnom nervnom sistemu značajno doprinosi dinamično editovanje transkripata *TPH2* (Grohmann et al., 2010) i *HTR2C* (Burns et al., 1997) koji kodiraju izoforme proteina sa različitim stepenom funkcionalnosti.

1.6. Editovanje RNK i samoubilačko ponašanje

Editovanje RNK je ko-transkripcioni proces u kome se genomski kodirana informacija menja na nivou RNK u enzimski katalizovanim reakcijama. Najčešći tip editovanja RNK kod metazoa, koji je ujedno i najzastupljeniji u centralnom nervnom sistemu, je deaminacija adenozina u inozin (editovanje A-u-I), katalizovana adenozin deaminazama koje deluju na RNK (eng. *adenosine deaminases acting on RNA*, ADARs) (Slika 1.3) (Bass, 2002; Nishikura, 2010). Inozin se u pogledu sparivanja baza ponaša kao guanozin, što može promeniti značenje genomski kodirane informacije (Slika 1.3).

Familija proteina ADAR kod sisara obuhvata tri člana: ADAR, ADARB1 i ADARB2. Svi članovi na C-kraju imaju visokokonzervisani deaminazni domen, koji kod ADARB2 nije katalitički aktivan, dok na N-kraju imaju različit broj i raspored domena koji vezuju dvolančanu RNK (Savva et al., 2012). Geni *ADAR* i *ADARB1* eksprimiraju se u mnogim tkivima, a najveći nivo ekspresije imaju u centralnom nervnom sistemu, dok je gen *ADARB2* najverovatnije eksprimiran samo u centralnom nervnom sistemu (Savva et al., 2012). Neophodan uslov za ispoljavanje katalitičke aktivnosti je dimerizacija proteina familije ADAR (Bass, 2002). Proteini ADAR mogu formirati homo- i heterodimere (Gallo et al., 2003), što ukazuje da bi kroz formiranje heterodimera katalitički neaktivan protein ADARB2 mogao regulisati funkciju ADAR i ADARB1 (Nishikura, 2010).



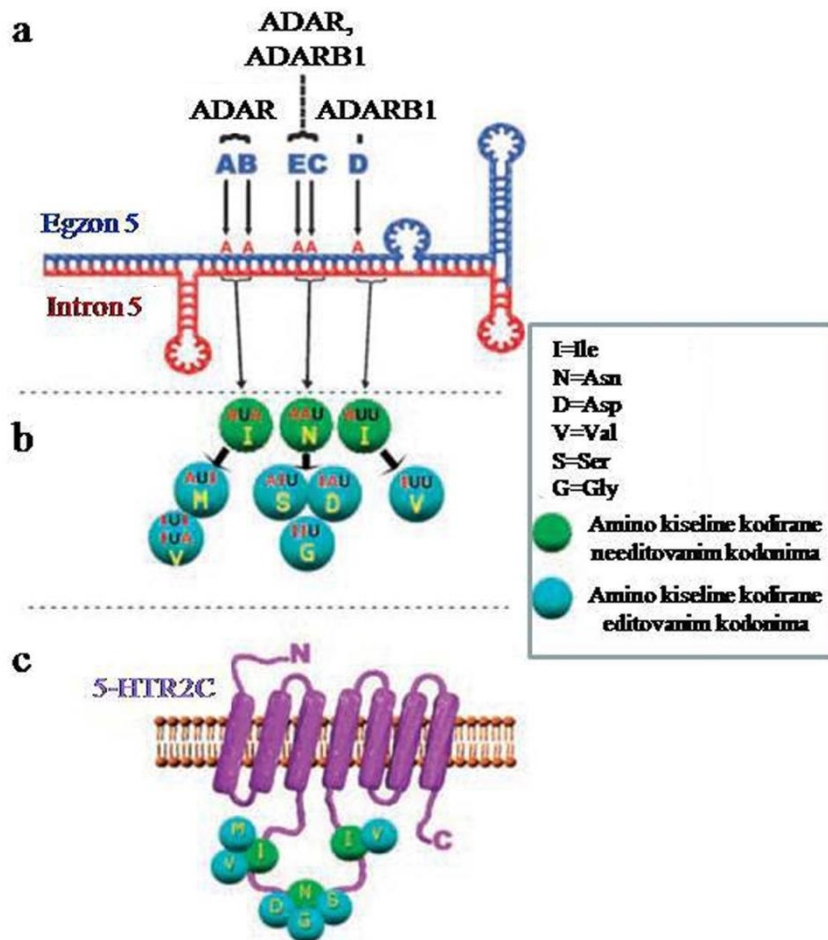
Slika 1.3. Editovanje deaminacijom adenzina u inozin. (a) Adenzin deaminaze koje deluju na RNK (ADAR i ADARB1) katalizuju hidrolitičku deaminaciju adenzina u inozin. (b) Adenzin se sparuje sa uridinom, dok se inozin pomoću dve vodonične veze sparuje sa citidinom, zbog čega ga ribozom i splajsozom prepoznaju kao guanozin (modifikovano prema Nishikura, 2010).

Editovanje RNK predstavlja epigenetički mehanizam na nivou RNK koji posreduje u interakciji između genoma i signala koje ćelija prima (Mehler and Mattick, 2007). Milioni genomski kodiranih adenzina edituju se u inozin u dvolančanim delovima RNK nastalih sparivanjem invertovanih elemenata *Alu* u intronima i UTR-ovima (Bazak et al., 2014; Levanon et al., 2004). Ovaj tip editovanja poznat je pod nazivom hipereditovanje jer se u okviru pojedinačnih ukosnica RNK edituje veliki broj adenzina. Hipereditovanje je izgleda uključeno u post-transkripcionu regulaciju ekspresije gena (Nishikura, 2010), a pretpostavlja se da predstavlja urođeni imunski sistem koji ćeliji omogućava da razlikuje sopstvene od virusnih dvolančanih RNK (Mannion et al., 2014). Editovanje A-u-I moduliše ekspresiju mikroRNK i ograničava potencijal malih interferirajućih RNK (Nishikura, 2010). Izuzetno mala proporcija editovanja A-u-I dešava se na tačno određenim mestima u kodirajućim regionima ili mestima splajsovanja i ovaj tip editovanja naziva se mesto-specifično editovanje ili rekodiranje (Hoopengardner et al., 2003).

Najveći broj transkripata koji podležu mesto-specifičnom editovanju ekspirira se u centralnom nervnom sistemu i kodira proteine uključene u brzu neurotransmisiju i sinaptičku plastičnost (Hoopengardner et al., 2003; Tariq and Jantsch, 2012). Rekodiranje dovodi do finih promena u efikasnosti funkcionisanja proteina, a kroz dinamično

regulisanje stepena i obrasca editovanja transkripata u skladu sa signalima koje ćelija prima, doprinosi graduisanom regulisanju funkcije proteina povećavajući plastičnost neurona. Kao takav, proces editovanja A-u-I predstavlja izuzetno važan mehanizam za održavanje optimalne neurotransmisije, uključujući i serotoninsku neurotransmisiju. Mesto-specifično editovanje A-u-I je precizno regulisan proces tokom razvića i funkcionisanja centralnog nervnog sistema usklađen sa fiziološkim i sredinskim signalima (Wahlstedt et al., 2009). Izmenjeni obrasci i stepeni editovanja transkripata brojnih gena koji učestvuju u neurotransmisiji i sinaptičkoj plastičnosti povezani su sa neurodegenerativnim, neurorazvojnim i psihijatrijskim oboljenjima, kao što su epilepsije, amiotrofična lateralna skleroza, Alchajmerova bolest, autizam, shizofrenija, poremećaji raspoloženja i izvršenje samoubistva (Eran et al., 2013; Iwamoto et al., 2009; Khmermesh et al., 2016; Maas et al.; 2006; Silberberg et al., 2012; Slotkin and Nishikura, 2013).

HTR2C je jedini gen za serotoninski receptor čiji transkripti podležu rekodiranju (Burns et al., 1997). Editovanje adenzina dešava se na pet specifičnih pozicija, označenih kao mesta A, B, C, D i E. Ova mesta nalaze se u egzonu 5 koji kodira drugu unutarćelijsku petlju koja sadrži domen za kuplovanje sa proteinom G (Slika 1.4). Različitim kombinacijama editovanja mesta A-E mogu nastati 32 varijante iRNK *HTR2C*, koje kodiraju 24 izoforme proteina različite funkcionalnosti i farmakoloških svojstava (Werry et al., 2008). Needitovana izoforma *HTR2C* na pozicijama 156, 158 i 160 sadrži izoleucin (I), asparagin (N) i I, redom, dok potpuno editovana izoforma sadrži valin (V), glicin (G) i V (Slika 1.4.). Sa povećanjem stepena editovanja transkripata *HTR2C* smanjuje se konstitutivna aktivnost receptora (Niswender et al., 1999), efikasnost receptora za kuplovanje sa proteinom G smanjuje se 15 do 25 puta, potencijacija serotoninom 20 puta i vezivanje agonista serotonina 6 puta (Maas et al., 2006; Wang et al., 2000).



Slika 1.4. Editovanje A-u-I transkripata *HTR2C* i proteinske izoforme HTR2C. (a) Editovanju podležu adenzini sa pet specifičnih pozicija u egzonu 5, označenih kao mesta A-E, nakon formiranja dvolančane strukture RNK između egzona 5 (označen plavom bojom) i dela introna 5 (označen crvenom bojom). Mesta A i B uglavnom edituje ADAR, mesto D najčešće edituje ADARB1, dok mesta C i E edituju oba enzima. (b) Različitim kombinacijama editovanja mesta A-E mogu nastati 32 varijante iRNK *HTR2C* koje kodiraju 24 različite proteinske izoforme, počevši od potpuno needitovane izoforme INI (Ile-Asn-Ile) do potpuno editovane izoforme VGV (Val-Gly-Val) na pozicijama 156, 158 i 160. (c) HTR2C je transmembranski receptor, a egzon 5 kodira drugu unutarćelijsku petlju koja sadrži domen za kuplovanje sa proteinom G. Funkcija ovog domena i dalji prenos signala smanjuje se sa porastom stepena editovanja (modifikovano prema Dracheva et al., 2008).

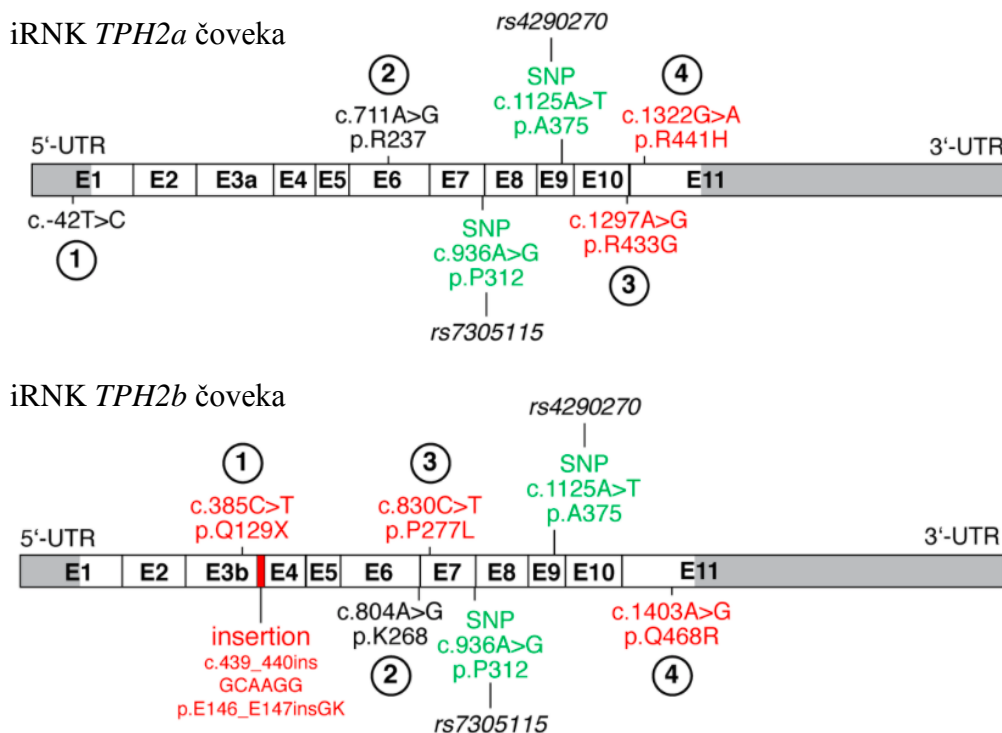
Pored prethodno navednog, kod needitovanih transkripata *HTR2C* favorizovano je isključivanje egzona 5 i sinteza nefunkcionalnog receptora, što verovatno predstavlja kontrolni mehanizam kojim se smanjuje sinteza najaktivnije izoforme receptora INI (Maas et al., 2006). Takođe, potpuno editovana izoforma VGV se u potpunosti eksprimira na

površini ćelije u bazalnim uslovima, a u prisustvu agonista brzo internalizuje, dok je izoforma INI konstitutivno internalizovana u endozomima (Marion et al., 2004). Sveukupno, efekti editovanja transkripata *HTR2C* generalno redukuju odgovor postsinaptičkog neurona na serotonin. Sa druge strane, stepen i obrazac editovanja se brzo menja u odgovoru na promene nivoa serotonina u sinaptičkoj pukotini, koji povratnom spregom reguliše editovanje transkripata *HTR2C* (Werry et al., 2008). Navedeno ukazuje da editovanje transkripata *HTR2C* značajno doprinosi optimalnoj aktivnosti receptora kroz dinamičke i adaptivne mehanizme.

U *postmortem* uzorcima prefrontalnog korteksa psihijatrijskih bolesnika koji su izvršili samoubistvo opisano je hipereditovanje iRNK *HTR2C* (Gurevich et al., 2002; Dracheva et al., 2008; Iwamoto et al., 2009; Lyddon et al., 2013). Uprkos tome što se rezultati studija međusobno razlikuju prema detektovanim izmenjenim obrascima editovanja, opisani opšti trend povećanja stepena editovanja iRNK *HTR2C* pogoršavao bi efekat već smanjenog nivoa serotonina kod osoba koje su izvršile samoubistvo (Iwamoto et al., 2009).

Regulaciji ekspresije, finom podešavanju aktivnosti i funkcionalnoj raznovrsnosti TPH2 doprinose različiti događaji alternativnog splajsovanja (Abumaria et al., 2008; Grohmann et al., 2010; Haghghi et al., 2008) i različiti tipovi editovanja RNK, uključujući i editovanje A-u-I (Grohmann et al., 2010). Insercijom šest nukleotida između egzona 3 i 4, usled korišćenja alternativnog kanonskog GT 5' mesta splajsovanja, umesto ređe zastupljenog GC 5' mesta splajsovanja koje se nalazi na početku introna 3, nastaje alternativni transkript *TPH2b* (Slika 1.5) (Grohmann et al., 2010). Proteinska izoforma TPH2b na pozicijama 146 i 147 sadrži dve dodatne amino kiseline, glicin i lizin, koje obezbeđuju lakšu dostupnost supstrata katalitičkom centru enzima. Iz ovog razloga izoforma TPH2b ima dva puta veću katalitičku aktivnost u odnosu na referentnu izoformu TPH2a. Transkripti *TPH2a* i *TPH2b* podležu različitim tipovima editovanja na četiri međusobno različite pozicije označene u oba slučaja kao 1, 2, 3 i 4, uključujući i editovanje A-u-I na određenim pozicijama (Slika 1.5) (Grohmann et al., 2010). Editovane izoforme imaju smanjenu katalitičku aktivnost ili su katalitički neaktivne (Grohmann et al. 2010).

Potpuno editovana izoforma transkripta *TPH2a* 1234 je katalitički skoro neaktivna, dok editovana izoforma transkripta *TPH2b* 234 ima za 50% smanjenu katalitičku aktivnost u odnosu na needitovanu izoformu. Katalitička aktivnost proteina TPH2b može biti potpuno ukinuta editovanjem na poziciji 1 kojim se uvodi prevremeni stop kodon uzvodno od katalitičkog domena (c.385C>T, p.Q129X). Smatra se da bi izoforma TPH2b mogla biti važna za brzi odgovor na povećanu potrebu za sintezom serotonina, kao i brzo isključivanje njene ekspresije editovanjem na poziciji 1.



Slika 1.5. Alternativno splajsovanje i editovanje transkripata *TPH2*. Izoforme transkripata *TPH2* označene su kao *TPH2a* i *TPH2b*. Izoforma *TPH2b* nastaje kao rezultat korišćenja alternativnog 5' mesta splajsovanja u intronu 3, što dovodi do insercije šest nukleotida koji kodiraju glicin i lizin na pozicijama 146 i 147. Oba alternativna transkripta poseduju po četiri različite pozicije, označene brojevima 1, 2, 3 i 4, koje podležu različitim tipovima editovanja, uključujući i editovanje A-u-I. Editovane izoforme odlikuju se smanjenom katalitičkom aktivnošću u odnosu na odgovarajuće needitovane izoforme, dok editovanje citidina u uridin na poziciji 385 u transkriptu *THP2b* uvodi prevremeni stop kodon (p.Q129X). Crvenim slovima označene su pozicije nukleotida čije editovanje dovodi do rekodiranja i uvođenja stop kodona, dok su crnim slovima označene one čije editovanje ne menja značenje genomske kodirane informacije. Zelenim slovima označene su sinonimne varijante rs7305115 i rs4290270, od kojih je poslednje-navedena povezana sa post-transkripcionom obradom pre-iRNK *TPH2* (preuzeto iz Grohmann et al., 2010).

U *postmortem* uzorcima mozga čoveka pokazano je da iRNK *TPH2a* podleže editovanju samo u amigdali, dok su editovane forme *TPH2b* uočene u različitim regionima mozga. Povećan nivo editovanja iRNK *TPH2a* u amigdali opisan je kod žrtava samoubistva (Grohmann et al. 2010). Sa opisanom post-transkripcionom obradom pre-iRNK *TPH2*, za sada nepoznatim mehanizmom, povezana je česta varijanta rs4290270. U kulturi ćelija pokazano je da se jedino u prisustvu češćeg alela T eksprimiraju *TPH2b* i editovane izoforme *TPH2a* i *TPH2b* (Grohmann et al. 2010).

Uzrok izmenjenog obrasca editovanja transkripata *HTR2C* i *TPH2* kod osoba koje su izvršile samoubistvo nije poznat. Pokazano je da nivoi ekspresije gena *ADAR* i *ADARBI* direktno utiču na stepen i obrazac editovanja transkripta *HTR2C* (Yang et al., 2004), dok nivo ekspresije samog gena *HTR2C* izgleda nema uticaj (Gurevich et al., 2002; Dracheva et al., 2008). Dodatno, transgeni miš sa izmenjenom ekspresijom katalitički aktivne izoforme *ADARB1* pacova predstavlja model glodara za izučavanje endogenog očaja i anksioznosti (Singh et al., 2009). Prethodno navedeno ukazuje da bi mehanizmi koji dovode do izmenjenog nivoa ekspresije gena *ADAR* i *ADARBI* i remete homeostazu u funkcionisanju procesa editovanja A-u-I mogli biti u osnovi složenih oblika ponašanja, uključujući i samoubilačko ponašanje kod psihijatrijskih oboljenja. Zaista, u *postmortem* uzorcima mozga žrtava samoubistva koji su imali dijagnozu shizofrenije ili bipolarnog afektivnog poremećaja opisana je povećana ekspresija varijante iRNK *ADARBI* koja kodira protein smanjene aktivnosti (Silberberg et al., 2012), dok je kod žrtava samoubistva sa dijagnozom depresivnog poremećaja uočena smanjeni nivo iRNK *ADARBI* (Lyddon et al., 2013) i povećan nivo iRNK *ADAR* (Simmons et al., 2010). Moglo bi se pretpostaviti da na nivo ekspresije gena *ADAR* i *ADARBI*, kao i na izmenjenu ekspresiju izoformi transkripata *ADARBI*, koji nastaju alternativnom obradom na 3' kraju (Kawahara et al., 2005), delom doprinose genetički determinisane razlike između individua. Međutim, asocijacije čestih varijanti gena *ADAR* i *ADARBI* sa psihijatrijskim poremećajima, uključujući i samoubilačko ponašanje, do sada nisu ispitivane.

1.7. Interakcije stresnih životnih događaja, serotoninskog sistema i editovanja RNK

Uticaj stresnih životnih događaja na homeostazu serotoninske neurotransmisije i stepen i obrazac editovanja transkripata *HTR2C* opisan je u studijama na glodarima. Takođe, studije G x E ukazuju da efekat izlaganja stresnim događajima na samoubilačko ponašanje može zavistiti od genetičke osnove individue.

Eksperimenti na miševima pokazali su da stresni životni događaji mogu uticati na homeostazu serotoninske neurotransmisije modulisanjem stepena i/ili obrasca editovanja transkripata *Htr2C* (Bhansali et al., 2007; Englander et al., 2005). Opisani efekti zavisili su od razlika u ponašanju sojeva miševa koje je genetički determinisano. Soj miševa BALB/c u fiziološkim uslovima ima prirodno nizak nivo serotonina, zbog smanjene katalitičke aktivnosti TPH2 koja je posledica genetičke promene c.1473C>G (p.Pro447Arg) (Zhang et al., 2004). Ovaj soj miševa odlikuje i nizak stepen editovanja transkripata *Htr2C*, što je verovatno adaptacija na nizak nivo serotonina, kao i urođeno povećana osetljivost na stres (Bhansali et al., 2007; Englander et al., 2005). Sa druge strane, soj miševa C57BL/6 u fiziološkim uslovima ima normalan nivo serotonina i otporniji je na stres u odnosu na soj BALB/c. Akutni i hronični stres, kao i stres u ranom periodu života rezultovali su u povećanju stepena i promeni obrasca editovanja transkripta *Htr2C* kod soja BALB/c, remeteći fiziološku homeostazu serotoninske neurotransmisije, dok je kod soja C57BL/6 editovanje transkripta *Htr2C* bilo nepromenjeno (Bhansali et al., 2007; Englander et al., 2005). U eksperimentima na pacovima pokazano je da interakcije ranih stresnih događaja i neprijatnih doživljaja tokom adultnog perioda imaju važan uticaj na nivo ekspresije *Tph2* (Hale et al., 2011).

Rezultati dosadašnjih studija G x E ukazuju da efekat stresnih životnih događaja na samoubilačko ponašanje može biti modifikovan nekim varijantama gena serotoninskog sistema (Mandelli and Serretti, 2013). Na primer, efekat fizičkog i seksualnog zlostavljanja tokom detinjstva na pokušaj samoubistva zavisi od određenih varijanti gena *HTR2A* (Brezo et al., 2010), dok njihov efekat na samoubilačke ideacije kod depresivnih bolesnika zavisi

od varijante rs4131347 u promotoru gena *TPH2* (Mann et al., 2008). Takođe, opisano je da efekat negativnih akutnih stresnih događaja na pokušaj samoubistva zavisi od varijante rs7305115 gena *TPH2* kod depresivnih bolesnika iz Kine (Zhang et al., 2010).

Polazeći od (1) činjenice da je pokušaj samoubistva često, ali ne i nužno, povezan sa psihijatrijskim oboljenjima i stresnim životnim događajima, (2) činjenice da je kod samoubilačkog ponašanja opisana hipofunkcija serotoninskog sistema, (3) važnosti procesa editovanja RNK u dinamičnoj regulaciji i održavanju optimalne serotoninske transmisije tokom razvića i u odgovoru na signale koje ćelija prima, i (4) nepostojanja efikasnog tretmana i prevencije samoubilačkog ponašanja, pretpostavili smo da bi narušena homeostaza serotoninske neurotransmisije kod osoba sklonih samoubilačkom ponašanju jednim delom mogla zavisiti od genetički determinisanih razlika u sintezi i neurotransmisiji serotonina i/ili u procesu editovanja A-u-I, kao i njihovih interakcija sa stresnim životnim događajima. Stoga je predmet ove studije bila identifikacija potencijalnih varijanti u genima *ADAR*, *ADARB1*, *TPH2* i *HTR2C*, stresnih životnih događaja, kao i interakcija i udruženih efekata navedenih faktora, čija bi procena mogla pomoći da se napravi razlika između psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili.

2. Ciljevi rada

1. Ispitati pojedinačne asocijacije četiri domena stresnih događaja tokom detinjstva (opštih trauma, fizičkog, emocionalnog i seksualnog zlostavljanja) i akutnih stresnih događaja sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika iz Srbije.
2. Izvršiti odabir tag tačkastih varijanti gena za editovanje RNK (*ADAR* i *ADARBI*) i analizirati strukturu haploblokova u regionima genoma od interesa.
3. Ispitati asocijacije gena *ADAR* i *ADARBI* sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika kroz testiranje asocijacije pojedinačnih tag varijanti i haploblokova.
4. Ispitati asocijacije pojedinačnih varijanti rs6318 (Cys23Ser) gena *HTR2C* i varijanti rs7305115 i rs4290270 gena *TPH2* sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika.
5. Ispitati udruženi efekat sredinskih i genetičkih faktora i njihove međusobne interakcije na rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

Doprinos odabranih sredinskih i genetičkih faktora rizika, kao i doprinos njihovih interakcija predispoziciji za pokušaj samoubistva ispitivani su u grupi od 353 nesrodna bolesnika sa dijagnostikovanim jednim od tri glavna psihijatrijska poremećaja – depresivnim poremećajem, bipolarnim afektivnim poremećajem ili shizofrenijom. U periodu između 2006. i 2012. godine, svi bolesnici su tokom pet nedelja psihijatrijskog ispitivanja na Klinici za psihijatriju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu prošli kroz identičnu proceduru kliničkih intervjuja i popunjavanja upitnika, koju su vodili psihijatari Klinike za psihijatriju. Prilikom otpusta, svakom ispitaniku uzet je uzorak krvi (5 ml sa 0.38% w/v natrijum citratom kao antikoagulansom). Uzorci krvi čuvani su na temperaturi +4°C do izolovanja DNK za molekularno-genetičke analize, a nakon toga na temperaturi od -20°C. Prema nezavisnoj proceni dva psihijatra, svi ispitanici bili su sposobni da se samostalno izjasne o učešću u ovoj studiji. Nakon detaljnog uvida u ciljeve i potrebe istraživanja, svi ispitanici dali su svoju saglasnost za dobrovoljno učešće u ovoj studiji. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije u Beogradu (Odluka broj 3672/10).

Dijagnostikovanje depresivnog poremećaja, bipolarnog afektivnog poremećaja i shizofrenije, kao i isključivanje potencijalno prisutnog psihijatrijskog komorbiditeta, vršeno je korišćenjem semistruktuiranog kliničkog intervjuja SCID-1 (eng. *Structured Clinical Interview for DSM-IV*) (First et al., 1996). Pomoću ovog intervjuja utvrđena je odgovarajuća psihijatrijska dijagnoza prema kriterijumima DSM-IV (eng. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition*) za klasifikaciju mentalnih poremećaja datom od strane Američkog udruženja psihijatara (American Psychiatric Association, 2000). Dijagnozu depresivnog poremećaja imala su 142 ispitanika, dijagnozu bipolarnog

afektivnog poremećaja 80 ispitanika i dijagnozu shizofrenije 131 ispitanik. Prosečna starost bolesnika bila je 41.99 ± 11.64 godina, a ženski pol je bio dva puta zastupljeniji u ispitivanom uzorku.

Za potrebe ovog istraživanja ispitanici su podeljeni u dve grupe: bolesnike koji su pokušali samoubistvo (165) i bolesnike koji nikada nisu pokušali samoubistvo (188). Bolesnici iz prve navedene grupe hospitalizovani su odmah nakon pokušaja samoubistva, dok su bolesnici iz grupe onih koji nisu pokušali samoubistvo hospitalizovani usled pogoršanja psihijatrijskog stanja.

3.2. Instrumenti za procenu stresnih životnih događaja

U cilju ispitivanja stresnih životnih događaja, kao nezavisnih sredinskih faktora rizika, njihovih međusobnih interakcija i interakcija sa genetičkim faktorima rizika, kod ispitanika je vršena procena doživljenih stresnih životnih događaja iz detinjstva i akutnih stresnih događaja tokom poslednjih 12 meseci života.

Za procenu stresnih događaja iz detinjstva primenjen je upitnik ETI-SR (eng. *Early Trauma Inventory–Self Report*). ETI-SR sadrži 62 pitanja na osnovu kojih se procenjuju četiri domena stresnih događaja doživljenih do 18. godine života: fizičko, emocionalno i seksualno zlostavljanje, i opšte traume (Bremner et al., 2007). Prema ovom upitniku, fizičko zlostavljanje definisano je kao fizički kontakt, ograničavanje i zatvaranje žrtve sa namerom da se ona povredi ili da joj se naudi. Emocionalno zlostavljanje je predstavljeno kao namerno ponižavanje i degradiranje žrtve putem verbalne komunikacije. Seksualno zlostavljanje je definisano kao svaki neželjeni seksualni kontakt koji ima za cilj da zadovolji počinioca ili da potkrepi njegovu potrebu za dominacijom nad žrtvom ili za njenim degradiranjem. Opšte traume definisane su čitavim nizom stresnih i traumatskih događaja koji su posledica slučajnih događaja ili događajima koje je počinila neka nepoznata osoba sa specifičnom namerom da naudi žrtvi. Skor ETI-SR određivan je za svaki od četiri domena zlostavljanja i dobijen je sabiranjem potvrdnih odgovora. Skorovi ETI-SR nedostajali su za četiri ispitanika.

Za procenu akutnih stresnih životnih događaja, korišćen je upitnik LTE-Q (eng. *Life Threatening Experiences Questionnaire*) koji sadrži 12 pitanja o stresnim događajima za koje je poznato da imaju dugoročne posledice (Brugha et al., 1985). Pitanja su, na primer, vezana za tešku bolest ili povredu koje su doživeli ispitanik ili njegovi najbliži srodnici, smrt bliskih osoba, razvod, prekid stabilne veze, probleme sa prijateljima, poslovne i finansijske probleme, probleme sa policijom ili sudom (Prilog 8.1). Ispitivani stresni događaji, primenom upitnika LTE-Q, odnosili su se na vremenski period od 12 meseci pre hospitalizacije bolesnika, bilo zbog pokušaja samoubistva ili zbog pogoršanja bolesti. Intervju su nezavisno vodila dva psihijatra. Za svaki stresni događaj koji je bolesnik prijavio da je doživeo, potvrđeno je da se desio tokom poslednjih 12 meseci. Sabiranjem potvrđenih odgovora, dobijen je skor LTE-Q za svakog ispitanog bolesnika. Podaci su nedostajali za njih petoro.

3.3. Odabir tačkastih varijanti gena-kandidata

3.3.1. Odabir tačkastih varijanti gena *HTR2C* i *TPH2*

U ovoj studiji ispitivane su tačkaste varijante dva gena serotoninskog sistema, *HTR2C* i *TPH2*, čiji transkripti podležu mesto-specifičnom editovanju A-u-I. Iz navedenih gena odabrane su funkcionalne varijante za koje su prethodne studije genetičke asocijacije sa samoubilačkim ponašanjem dale nekonzistentne rezultate. Iz gena *HTR2C*, odabrana je nesinonimna kodirajuća varijanta rs6318 (Cys23Ser) koja se nalazi u egzonu 4. Iz gena *TPH2*, odabrane su dve sinonimne kodirajuće varijante, rs7305115 i rs4290270, smeštene u egzonima 7 i 9, redom. Među odabranim varijantama *TPH2*, od posebnog interesa bila je varijanta rs4290270 za koju je pokazano da utiče na alternativno splajsovanje i editovanje pre-iRNK *TPH2* (Grohmann et al., 2010).

3.3.2. Odabir tag tačkastih varijanti gena *ADAR* i *ADARBI*

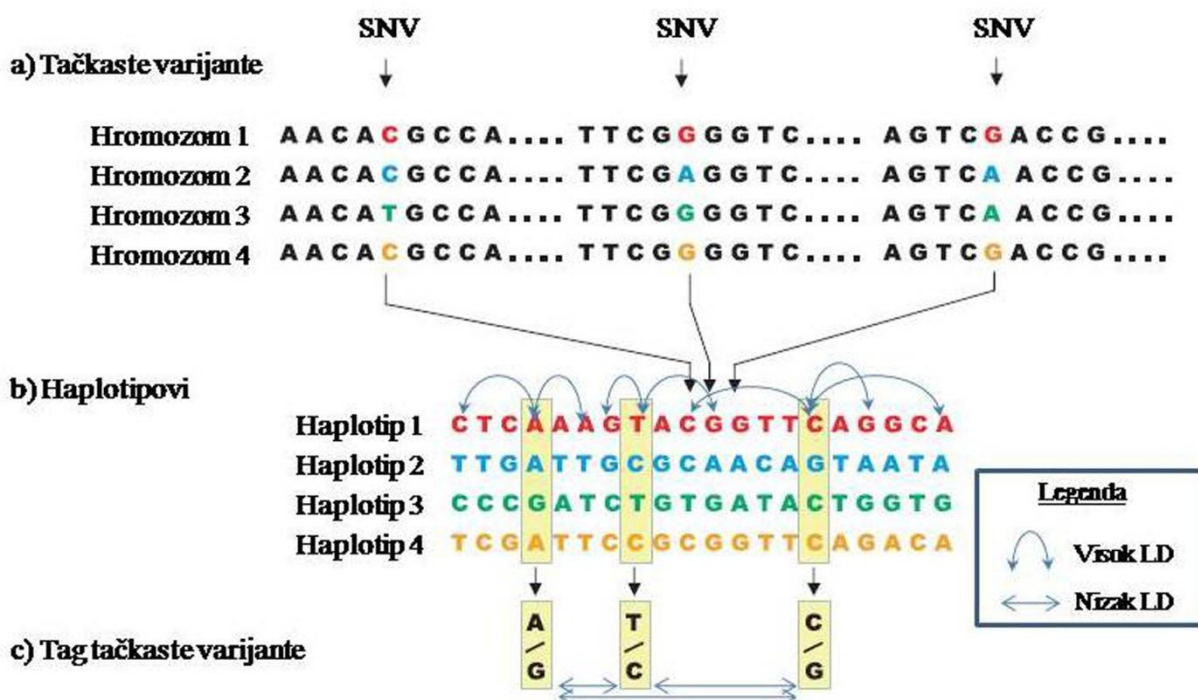
Na osnovu uloge u finoj modulaciji neurotransmisije i sinaptičke plastičnosti, uključujući i modulaciju funkcije proteina serotoninskog sistema, *HTR2C* i *TPH2*, i podatka o mogućoj povezanosti sa samoubilačkim ponašanjem, posebno kod psihijatrijskih bolesnika, geni

ADAR i *ADARBI* su u ovom istraživanju prvi put ispitivani kao geni-kandidati u studiji koja ispituje genetičke asocijacije. Naime, u periodu dizajniranja ove studije nisu postojale objavljene studije genetičke asocijacije koje su ispitivale povezanost ovih gena sa nekim osobinama/bolestima, zbog čega je bilo neophodno izabrati odgovarajući pristup za odabir tačkastih varijanti ovih gena. Odabran je pristup odabira maksimalno informativnog seta čestih tačkastih varijanti za dati gen/region, poznatih kao tag tačkaste varijante (eng. *tag single nucleotide variants*, tagSNVs) (Carlson et al., 2004).

Korišćenje i odabir tag varijanti zasnovani su na činjenici da postoji snažna korelacija između njihovih alela i alela drugih čestih varijanti u okolnom regionu genoma. Korelacija je posledica neravnotežne vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*, LD) koja označava da se dve ili više varijanti istog hromozoma češće zajednički nasleđuju nego što se očekuje, formirajući haploblokove. Ukoliko su opisane varijante haploblokova (haplotipovi), nije neophodno, niti efikasno, vršiti genotipizaciju svih čestih varijanti nekog haplobloka. Naime, ukoliko se postavi visoki prag za meru LD, genotipizacijom tag varijanti postiže se da se u regionu genoma od interesa ispitaju sve poznate varijante, bilo direktnom genotipizacijom (tag varijante), bilo zato što prelaze zadati visoki prag za neravnotežnu vezanost sa nekom od tag varijanti (Slika 3.1). Na primer, ukoliko se LD definiše vrednošću koeficijenta korelacije $r^2 > 0.8$, genotipizacijom odabranih tag varijanti detektuje se više od 80% prisutnih haplotipova u ispitivanom regionu genoma (Carlson et al., 2004).

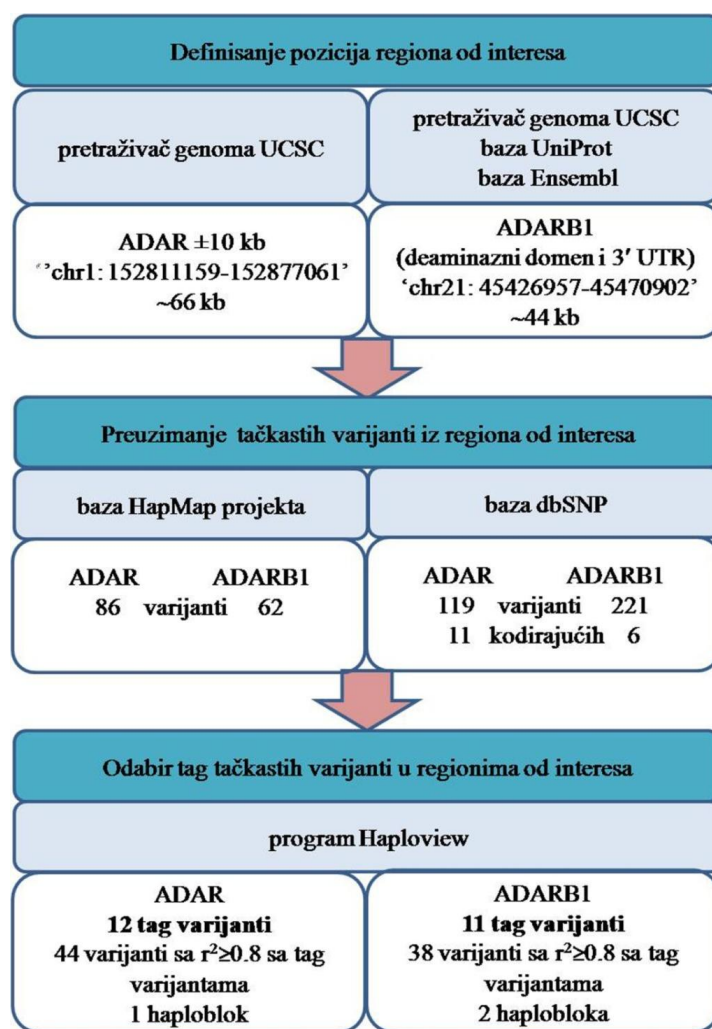
Da bi se setom odabranih tag varijanti sveobuhvatno ispitaio efekat čestih varijacija odabranog regiona genoma, koje utiču na neku osobinu/bolest, neophodno je poznavanje obrazaca varijacija haploblokova za region od interesa. Projekat HapMap bio je prvi veliki međunarodni projekat čiji je cilj bio da se utvrde česti obrasci varijacija u sekvenci celog genoma čoveka i da se ti podaci učine javno dostupnim (International HapMap Consortium, 2003). Međunarodni konzorcijum HapMap konstruisao je mape čestih obrazaca varijacija u sekvenci genoma čoveka određivanjem genotipova više od milion varijanti, njihovih učestalosti i njihovog stepena asocijacije u populacijama poreklom iz Evrope, Azije i Afrike. Naime, iako su česte tačkaste varijante zajedničke za različite populacije, njihova učestalost među njima se može razlikovati, zbog čega je set tag varijanti potrebno posebno

birati za populacije odgovarajućeg porekla (Carlson et al., 2004). Istovremeno, razvijeni su i intuitivni softveri, kao što je Haploview (Barrett et al., 2005), koji zajedno sa pretraživačima genoma, omogućavaju korišćenje podataka projekta HapMap za odabir tag varijanti u regionima od interesa.



Slika 3.1. Princip odabira tag tačkastih varijanti (SNV). a) U prikazanom regionu nekog hromozoma dužine 6 kb četiri osobe imaju najveći deo sekvence DNK identičan, dok se na tri prikazane pozicije uočava varijabilnost – prisustvo jednog ili drugog alela neke tačkaste varijante. b) Genotipizacijom, na primer, svih 20 tačkastih varijanti iz prikazanog regiona dobijaju se obrasci alela susednih varijanti koji predstavljaju haplotipove. Na prikazanom primeru, u ispitivanoj populaciji, detektovana su četiri različita česta haplotipa, označena brojevima 1-4. c) Genotipizacijom samo tri odabrane tag tačkaste varijante, od ukupno 20 u ovom primeru, moguća je nedvosmislena identifikacija sva četiri česta haplotipa. Na primer, ako određeni hromozom sadrži baze A-T-C na pozicijama ove tri tag varijante, taj obrazac odgovara obrascu haplotipa 1. Tag varijante nalaze se u niskoj neravnotežnoj vezanosti (LD), dok se sa okolnim varijantama koje nisu genotipizirane nalaze u visokoj neravnotežnoj vezanosti, zbog čega predstavljaju maksimalno informativni set čestih varijanti za dati region (modifikovano prema International HapMap Consortium, 2003).

Odabir tag tačkastih varijanti u regionima od interesa u ovoj studiji urađen je prema proceduri Pettersson et al. (2009) (Slika 3.2). Korišćene su: verzija genoma čoveka NCBI build 36.1 (UCSC hg18) iz marta 2006. godine (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), pretraživač genoma UCSC (eng. *University of California Santa Cruz*, <http://genome.ucsc.edu>, Kent et al., 2002), podaci projekta HapMap (<http://hapmap.org>, International HapMap Consortium, 2003), baza podataka dbSNP (eng. *Single Nucleotide Polymorphism database*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, Sayers et al., 2011) i program Haploview (www.broad.mit.edu/mpg/haploview, Barrett et al., 2005).



Slika 3.2. Dijagram toka procesa odabira tag tačkastih varijanti u *ADAR* i *ADARB1* regionima od interesa prema proceduri Petterssona i saradnika (2009). Prikazani su svi koraci pri odabiru tag tačkastih varijanti: korišćeni pretraživači, baze i programi, i rezultati nakon svakog koraka u procesu odabira tag varijanti. Detaljno objašnjenje u tekstu.

Definisanje pozicija *ADAR* i *ADARBI* regiona od interesa za odabir tag tačkastih varijanti

Korišćenjem pretraživača genoma UCSC (Kent et al., 2002) dobijene su informacije o veličini i poziciji gena *ADAR* i *ADARBI* na odgovarajućim hromozomima prema verziji genoma čoveka NCBI build 36.1: *ADAR* – veličina ~46 kilobaza (kb), ‘chr1: 152821159-152867061’; *ADARBI* – veličina ~152 kb, ‘chr21: 45318943-45470902’.

Prva procena broja tag tačkastih varijanti u genu *ADARBI* prema zadatim kriterijumima (videti niže) bila je oko 100. Zbog finansijskih nedostataka, odlučili smo da suzimo region od interesa tako da on obuhvati region koji kodira deaminazni domen i 3' UTR. Za određivanje pozicije ovako definisanog *ADARBI* regiona od interesa prvo je, na osnovu sekvence proteina ADARB1 P78563 iz baze UniProt (eng. *Universal Protein Resource*, <http://www.uniprot.org>, UniProt Consortium, 2009), očitano da deaminazni domen obuhvata aminokiseline od pozicije 370 do 737. Korišćenjem transkripta ENST00000539173 verzije genoma čoveka GRCh37 (UCSC hg19) iz baze Ensembl (<http://www.ensembl.org>, Flicek et al., 2012) određen je deo sekvence cDNK koja kodira aminokiseline od pozicije 370 do 737 u proteinu ADARB1. Početak ovog dela sekvence cDNK poravnat je sa preuzetom sekvencom gena *ADARBI* uc002zgr.1 (‘chr21: 45318943-45470902’) korišćenjem pretraživača USCS. Utvrđeno je da je početak *ADARBI* regiona od interesa na poziciji ‘chr21:45426957’. Na ovaj način utvrđena pozicija *ADARBI* regiona od interesa koji kodira deaminazni domen i 3' UTR bila je ‘chr21: 45426957-45470902’, prema verziji genoma NCBI build 36.1.

U cilju određivanja definitivnih pozicija regiona od interesa za koje će se odabrati tag tačkaste varijante, populacione haploblok strukture gena *ADAR* i *ADARBI* vizuelizovane su korišćenjem baze podataka HapMap, ver. 27 (International HapMap Consortium, 2003). LD plot gena *ADAR* sadržao je samo jedan haploblok koji je bio veći od samog gena. U skladu sa preporukom Petterssona i saradnika (2009), region od interesa za gen *ADAR* proširen je za po 10 kb uzvodno i nizvodno u odnosu na gen, kako bi studijom asocijacije bili obuhvaćeni i potencijalni regulatorni regioni gena. Definitivne pozicije *ADAR* regiona od interesa koji je obuhvatio kompletan gen *ADAR* i dodatnih 10 kb uzvodno i nizvodno od

gena, prema verziji genoma čoveka NCBI build 36.1, bile su ‘chr1: 152811159-152877061’. Njegova veličina iznosila je ~66 kb i sadržao je jedan haploblok. LD plot kompletnog gena *ADARBI* sadržao je 8 haploblokova, dok je prethodno određen sužen region od interesa sadržao dva haplobloka. Definitivne pozicije *ADARBI* regiona od interesa koji je obuhvatio deo koji kodira deaminazni domen i 3' UTR, prema verziji genoma čoveka NCBI build 36.1, bile su ‘chr21: 45426957-45470902’. Njegova veličina iznosila je ~44 kb i sadržao je, kao što je navedeno, dva haplobloka.

Preuzimanje datoteka tačkastih varijanti i učestalosti njihovih genotipova u *ADAR* i *ADARBI* regionima od interesa iz baze projekta HapMap

Iz baze podataka projekta HapMap, *release* #28 (Phases 1, 2 & 3 - merged genotypes & frequencies) (International HapMap Consortium, 2003), zasnovanoj na verziji genoma čoveka NCBI build 36.1 (UCSC hg18), za definisane *ADAR* i *ADARBI* regione od interesa (‘chr1: 152811159-152877061’ i ‘chr21: 45426957-45470902’), preuzete su liste tačkastih varijanti i učestalosti njihovih genotipova u beloj populaciji (CEU). Preuzete datoteke sačuvane su u tekstualnim fajlovima, pod nazivom ‘adarplusminus10kb.txt’ i ‘adarb1editaznidomen3utr.txt’.

Preuzimanje lista kodirajućih tačkastih varijanti u *ADAR* i *ADARBI* regionima od interesa iz baze dbSNP

Prilikom odabira tag tačkastih varijanti, cilj je bio favorizovati uključivanje svih kodirajućih varijanti koje su analizirane u projektu HapMap, *release* #28 (Phases 1, 2 & 3 - merged genotypes & frequencies). Lista tačkastih varijanti u *ADAR* i *ADARBI* regionima od interesa (‘chr1: 152811159-152877061’ i ‘chr21: 45426957-45470902’) preuzeta je iz baze podataka dbSNP, *release* 132 i 129, redom (Sherry et al., 2001) korišćenjem pretraživača UCSC (Kent et al., 2002). Liste su sačuvane kao tekstualni fajlovi ‘adarsnpAnnotation.txt’ i ‘adarb1snpAnnotation.txt’ i konvertovane su u excel fajlove. Preuzete tačkaste varijante sortirane su prema koloni ‘func’ koja je sadržala podatke o mogućem funkcionalnom značaju varijanti. Nakon sortiranja, u tekstualne fajlove kopirane su samo kodirajuće tačkaste varijante (kolona ‘func’ imala je oznaku ‘coding’ ili ‘cds’).

Liste kodirajućih tačkastih varijanti sačuvane su kao tekstualni fajlovi pod nazivom 'forceListadar.txt' i 'forceListadarb1.txt'. Lista za gen *ADAR* sadržala je 11, a lista za gen *ADARBI* 6 kodirajućih tačkastih varijanti.

Odabir tag tačkastih varijanti i vizuelizacija strukture haploblokova *ADAR* i *ADARBI* regiona od interesa korišćenjem programa Haploview

Korišćenjem programa Haploview, ver. 4.2 (Barrett et al., 2005) iz pripremljenih datoteka tačkastih varijanti 'adarplusminus10kb.txt' i 'adarb1editaznidomen3utr.txt', uz favorizovanje uključivanja kodirajućih varijanti iz lista 'forceListadar.txt' i 'forceListadarb1.txt' odabrane su tag tačkaste varijante koje su analizirane u ovom radu. Prilikom njihovog odabira u programu Haploview odabrani su sledeći parametri:

- Učestalost manje zastupljenog alela (eng. *minor allele frequency*, MAF) $\geq 5\%$ kao kriterijum za odabir čestih varijanti (Pettersson et al., 2009);
- Koeficijent korelacije $r^2 \geq 0.8$. Koeficijent korelacije r^2 jedan je od parametara koji opisuje neravnotežnu vezanost i predstavlja korelaciju zajedničkog nasleđivanja dva alela neke dve tačkaste varijante. Vrednosti r^2 su između 0 i 1, pri čemu se dva lokusa nasleđuju nezavisno kada je $r^2=0$, a zajedno kada je $r^2=1$;
- 'Load includes' kao parametar koji je omogućio favorizovanje funkcionalnih tačkastih varijanti. Imajući u vidu da baza projekta HapMap sadrži samo podgrupu tačkastih varijanti prisutnih u bazi podataka dbSNP, od 11 favorizovanih kodirajućih varijanti gena *ADAR*, samo 2 su bila genotipizirana u projektu HapMap i oni su odabrani kao tačkaste varijante čiji se odabir favorizuje. U slučaju gena *ADARBI*, nijedna od 6 kodirajućih varijanti nije genotipizirana u projektu HapMap, tako da za ovaj gen nije bilo moguće forsirati uključenje kodirajućih varijanti;
- 'Pairwise tagging only' kao algoritam za odabir tag tačkastih varijanti. Njegovim izborom izbegnuti su napredniji algoritmi čijom primenom je moguće smanjiti broj odabranih tag tačkastih varijanti, uz posledično opadanje statističke snage studije;
- 'Ignore pairwise comparison of markers > 500 kb apart';
- 'Exclude individuals with > 50% missing genotypes'.

Nakon izvršenog procesa odabira po opisanim kriterijumima dobijene su liste tag tačkastih varijanti, dok su strukture haploblokova *ADAR* i *ADARBI* regiona od interesa za belu populaciju vizuelizovane plotovima LD.

3.3.3. Prikupljanje karakteristika odabranih tačkastih varijanti i njihova funkcionalna anotacija

Za svaku odabranu tačkastu varijantu, prikupljeni su sledeći podaci: pozicija na hromozomu prema bazi podataka dbSNP (Sherry et al., 2001) i verziji genoma čoveka GRCh37 (UCSC hg19), pozicija u genu korišćenjem transkripata ENST00000368474 (*ADAR*), ENST00000360697 (*ADARBI*), ENST00000276198 (*HTR2C*) i ENST00000333850 (*TPH2*) iz baze podataka Ensembl (Flicek et al., 2013), učestalost ređeg alela za evropsku populaciju iz baze podataka 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>, 1000 Genomes Project Consortium et al., 2012), pretpostavljena funkcija (anotacija) tačkaste varijante prema bazi podataka Regulome (<http://regulome.stanford.edu/>, Boyle et al., 2012) i pretpostavljena funkcija kodirajućih tačkastih varijanti prema prediktorskim programima SIFT (<http://sift.jcvi.org/>, Kumar et al., 2009) i PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, Adzhubei et al., 2010).

3.4. Molekularno-genetičke metode

3.4.1. Izolovanje DNK, provera kvaliteta i kvantifikacija

Za izolovanje DNK iz biološkog materijala ispitanika korišćen je komercijalni kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen*, Nemačka), kojim se iz 200 µl periferne krvi izoluje oko 6 µg DNK.

Procedura za izolovanje DNK primenom kita QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen*, Nemačka), prema uputstvu proizvođača:

1. U mikrotube od 1.5 ml (*Eppendorf*, Nemačka) pipetirano je 200 µl pune periferne krvi, 200 µl pufera AL i 20 µl proteinaze K.
2. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i inkubirana 10 minuta na 56°C.

3. Smeša je kratko centrifugirana do dostizanja 8000 obrtaja u minuti (eng. *rotation per minute*, rpm) (Labofuge 400R, rotor 3324, *Heraeus instruments*, Nemačka) kako bi se oborile kapi sa unutrašnjosti poklopca mikrotube.
4. U smešu je dodato 200 μ l 96% etanola (*ZORKA Pharma*, Srbija).
5. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i centrifugirana 1 minut na 8000 rpm.
6. Pripremljene smeše nalivene su na kolonice sa silika membranom, koje su se nalazile u kolektorskim tubama, i urađeno je centrifugiranje 1 minut na 8000 rpm.
7. Kolonice su premeštane u nove kolektorske tube (odbačene su kolektorske tube sa filtratom), dodato je po 500 μ l pufera AW1, i urađeno je centrifugiranje 1 minut na 8000 rpm.
8. Kolonice su premeštane u nove kolektorske tube (odbačene su kolektorske tube sa filtratom), dodato je po 500 μ l pufera AW2, i urađeno je centrifugiranje 3 minuta na 8000 rpm.
9. Kolonice su premeštane u sterilne mikrotube od 1.5 ml i dodato je 200 μ l sterilne vode bez nukleaze (eng. *Nuclease-Free Water*, *Qiagen*, Nemačka) radi elucije DNK sa membrane kolonice.
10. Nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi, urađeno je centrifugiranje 1 minut na 13000 rpm.
11. Izolovana DNK čuvana je na 4°C do provere njenog kvaliteta i kvantiteta, kao i odgovarajućih analiza, a zatim na -20°C.

Provera kvaliteta i kvantifikacija izolovane DNK vršena je elektroforezom u 0.8% agaroznom gelu. Za pravljenje agaroznog gela korišćen je pufer 0.5xTBE (0.045M Tris-borat, 0.001M EDTA, pH=8.0) u kome je izvođena i elektroforeza. Pufer za nalivanje uzoraka sadržao je 0.25% (w/v) bromfenol-plavo, 0.25% (w/v) ksilencijanol i 30% (v/v) glicerol. Za vizuelizaciju DNK korišćen je etidijum bromid finalne koncentracije u gelu 0.5 μ g/ml. Etidijum bromid interkalira u molekul DNK tako da je intenzitet njegove fluorescencije na talasnoj dužini od 254 nm proporcionalan količini molekula DNK (Brunk and Simpson, 1977). Kvalitet DNK procenjivan je na osnovu izgleda izolovane DNK u

agaroznom gelu – diskretna traka ukazivala je da je izolovana DNK nativna, dok je prisustvo razmaza ukazivalo da je izolovana DNK parcijalno degradovana. Kvantifikacija izolovane genomske DNK vršena je poređenjem intenziteta fluorescencije uzoraka izolovane DNK i standarda za količinu DNK. Kao standard za količinu DNK korišćena je K562, humana genomska DNK koncentracije 10 ng/μl (*Promega, SAD*).

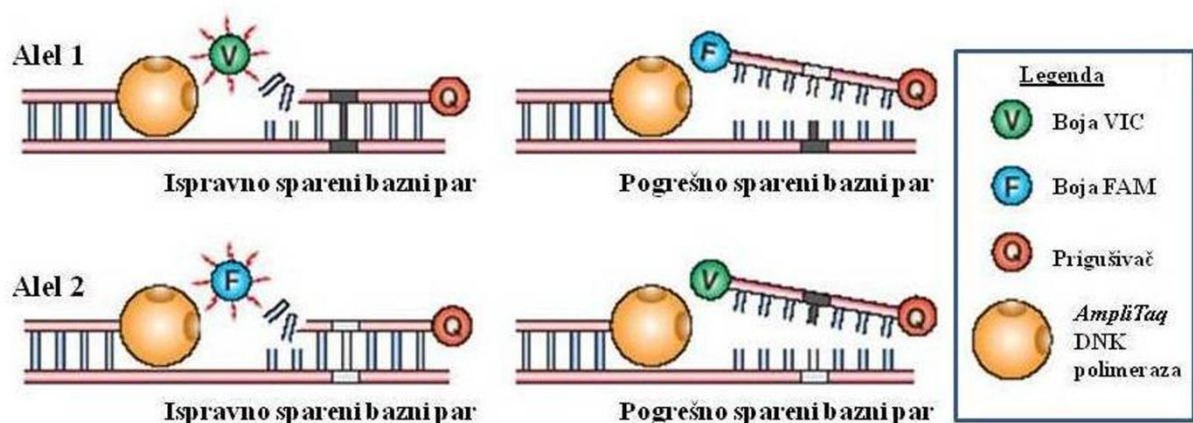
Procedura za pripremu agaroznog gela i agarozna gel elektroforeza:

1. 0.8% rastvor agaroze (w/v) (*Serva, Nemačka*) u puferu 0.5xTBE zagrevan je dok nije postao potpuno bistar.
2. Dodat je etidijum bromid (*Tokyo chemical industry co., ltd., Japan*) u finalnoj koncentraciji 0.5 μg/ml.
3. Rastvor agaroze ohlađen je do ~50°C i naliven je u kadicu za elektroforezu, gde je ostavljen da polimerizuje 30-45 minuta na sobnoj temperaturi.
4. Po 5 μl izolovanih uzoraka DNK izmešano je sa puferom za nalivanje uzoraka u odnosu 5:1, a zatim naliveno u bunariće agaroznog gela.
5. 1, 2 i 5 μl K562 DNK (*Promega, SAD*) izmešano je sa puferom za nalivanje uzoraka u odnosu 5:1 i naliveno je u bunariće agaroznog gela kako bi se dobili standardi količine DNK od 10, 20 i 50 ng.
6. Agarozna gel elektroforeza vršena je u puferu 0.5xTBE pri konstantnom naponu od 100 V, u trajanju 10-15 minuta u sistemu za horizontalnu elektroforezu (*Wide Mini-Sub Cell GT, BioRad, SAD*).
7. Po završetku elektroforeze, gel je izlagan UV svetlu talasne dužine 254 nm na transiluminatoru (*Mini-transilluminator, BioRad, SAD*), a zatim je fotografisan radi čuvanja u arhivi.

3.4.2. Genotipizacija tačkastih varijanti primenom eseja alelske diskriminacije

Genotipizacija svih odabranih tačkastih varijanti *ADAR* i *ADARBI* regiona od interesa, varijante rs6318 gena *HTR2C*, i varijante rs7305115 gena *TPH2*, urađena je korišćenjem komercijalnih eseja za alelsku diskriminaciju TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assay (*Life Technologies, SAD*). Svaki esej dizajniran je i validiran od strane proizvođača i

sadrži jedinstveni par prajmera i par proba Taqman od kojih je jedna potpuno komplementarna alelu 1 određene tačkaste varijante, dok je druga potpuno komplementarna alelu 2. Svaka proba Taqman na 5' kraju obeležena je fluorescentnom reporterskom bojom (zelenom bojom VIC ili plavom bojom FAM), dok je na 3' kraju obeležena prigušivačem (eng. *quencher*) koji na bliskoj udaljenosti od reporterske boje inhibira emitovanje njene fluorescencije. Samo one probe Taqman koje su u potpunosti hibridizovale sa matricom DNK, tokom koraka elongacije lančane reakcije polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR), podležu hidrolitičkoj degradaciji, koja je praćena emitovanjem fluorescencije reporterske boje usled prestanka inhibitornog dejstva prigušivača (Slika 3.3).



Slika 3.3. Mehanizam aktivacije proba Taqman hidrolitičkom degradacijom u esejima alelske diskriminacije. Hidrolitičkoj degradaciji podležu samo probe Taqman koje su u potpunosti hibridizovale sa matricom DNK, usled čega dolazi do emisije fluorescencije reporterske boje koja je vezana za nju. Proba obeležena zelenom bojom VIC u potpunosti je komplementarna sekvenci alela 1 i pojava njene fluorescencije ukazuje na prisustvo alela 1 u ispitivanom uzorku. Proba obeležena plavom bojom FAM u potpunosti je komplementarna sekvenci alela 2 i pojava njene fluorescencije ukazuje na prisustvo alela 2 u ispitivanom uzorku. Reporterska boja (VIC ili FAM) nehibridizovane probe Taqman ne emituje fluorescenciju usled inhibitornog efekta prigušivača (modifikovano prema *Applied Biosystems*, 2010).

Odabir eseja vršen je na sajtu <http://snp.appliedbiosystems.com>. Za tačkastu varijantu rs6318 gena HTR2C korišćen je esej C__2270166_10, dok je za tačkastu varijantu rs7305115 gena *TPH2* korišćen esej C__8376164_10 (*Applied Biosystems*, SAD). Identifikacioni brojevi eseja korišćenih za genotipizaciju tačkastih varijanti u *ADAR* i

ADARBI regionima od interesa navedeni su u Tabeli 4.4 i Tabeli 4.5, redom, u poglavlju Rezultati.

TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays korišćeni su prema uputstvu proizvođača (*Applied Biosystems* 2010, SAD). Reakcioni miks za 100 reakcija sadržao je 500 µl 2xTaqMan Universal PCR Master Mix-a (*Applied Biosystems*, SAD), 25 µl odgovarajućeg 40xTaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assay-a (*Applied Biosystems*, SAD) i 375 µl vode bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). Po 8.5 µl pripremljene reakcione smeše naneto je u svaki od 96 bunarića standardne reakcione ploče (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*, SAD). U bunariće A1 i B1 naneto je po 1 µl vode bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka) koja je poslužila kao negativna kontrola. U ostale bunariće naneto je po 1 µl odgovarajućeg uzorka DNK (1-20 ng). U slučajevima inhibicije PCR-a u nekom od uzoraka, kao aditiv korišćen je goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich, SAD) u finalnoj koncentraciji od 0.5 µg/µl po uzorku. Reakciona ploča prekrivana je optičkim adhezivnim filmom (MicroAmp™ Optical adhesive film, *Applied Biosystems*, SAD), centrifugirana je 1 minut/3000 rpm kako bi se uklonili mehurići iz bunarića, a potom je postavljena u sistem za PCR u realnom vremenu (7500 Real-Time PCR System, *Applied Biosystems*, SAD). PCR je izveden prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 95°C/10 minuta i 40 ciklusa sastavljenih iz denaturacije 92°C/15 sekundi i hibridizacije prajmera sa elongacijom 60°C/1 minut.

Za analizu rezultata eseja alelske diskriminacije korišćen je program SDS, ver. 1.2 (*Applied Biosystems*, SAD) koji pomoću složenog algoritma detektuje koliki je doprinos svakog alela iz pojedinačnog uzorka u ukupno detektovanoj vrednosti fluorescentnih signala. Analiza fluorescentnih signala odvijala se u tri koraka:

1. Tokom '*Pre-read run*' merena je osnovna fluorescencija proba unutar svakog bunarića pre početka PCR-a.
2. Tokom '*Amplification run*' snimani su podaci o fluorescenciji nastaloj usled hidrolize proba TaqMan tokom PCR-a u realnom vremenu.
3. Tokom '*Post-read run*' automatski je korigovan intenzitet fluorescencije u svakom bunariću tako što je nakon PCR-a od intenziteta fluorescencije nastale

usled hidrolize proba TaqMan oduzimana osnovna fluorescencija izmerena tokom koraka 'Pre-read run'. Na osnovu podataka o korigovanim fluorescencijama, program SDS određivao je koji su aleli prisutni u svakom analiziranom uzorku DNK.

Određivanje alela i genotipova analiziranih uzoraka vršeno je automatskom ili ručnom metodom. Za svaki korišćeni esej, 10% nasumično odabranih uzoraka DNK analizirano je u duplikatu. Dobijeni rezultati genotipizacije bili su identični, što je potvrdilo validnost metode.

3.4.3. Genotipizacija tačkastih varijanti metodom polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata

Genotipizacija varijante rs4290270 gena *TPH2* izvršena je na osnovu polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) dobijenih digestijom produkata PCR-a određenim restrikcionim enzimom koji ih diferencijalno seče u zavisnosti od tipa alela ispitivane tačkaste varijante.

Za odabir prajmera za PCR korišćena je sekvenca gena *TPH2* ENSG00000139287 ('chr 12: 72,332,626-72,580,398', verzija genoma čoveka GRCh37, preuzeta iz baze podataka Ensembl (Flicek et al., 2013). Prajmeri su dizajnirani pomoću programa Primer3web, ver. 4.0.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>, Rozen and Skaletsky, 1998). Odabran je uzvodni prajmer TPH2F 5'-TGGGTGCCATTTAATCCTAT-3', dužine 20 nukleotida, GC sastava 40% i temperature topljenja 56.9°C, i reverzni prajmer TPH2R 5'-GAGGTGCCAAATCCTCTATG-3', dužine 20 nukleotida, GC sastava 50% i temperature topljenja 57.2°C.

PCR je rađen u ukupnoj zapremini od 15 µl. Reakciona smeša sadržala je 20 ng genomske DNK, 1xKAPA Taq pufera A sa 1.5 mM MgCl₂ (Kapa Biosystems, SAD), 0.2mM svakog nukleotida (Thermo Scientific, Nemačka), 0.2 µM svakog prajmera (Life Technologies, SAD), 0.6 U KAPA Taq DNK polimeraze (Kapa Biosystems, SAD) i vodu bez nukleaza (Qiagen, Nemačka). PCR je vršen u mašini Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) prema sledećem temperaturnom profilu: inicijalna denaturacija 97°C/3

minuta, 27 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije 95°C/1 minut, hibridizacije prajmera 57°C/1 minut, i elongacije 72°C/1 minut, i finalna elongacija 72°C/10 minuta. Uspešnost i specifičnost PCR-a proveravani su u 1.5% agaroznom gelu (*Serva*, Nemačka) bojenom etidijum bromidom (0.5 µg/ml) i poređenjem sa standardom za dužinu DNK (GeneRuler™ 100bp DNA ladder, *Fermentas*, Litvanija).

Za digestiju produkata PCR-a korišćen je restrikcioni enzim *NdeI* (mesto prepoznavanja 5'...CA↓TATG...3'). Restrikciona digestija rađena je u ukupnoj zapremini od 10 µl. Reakciona smeša sadržala je 3 µl produkta PCR-a, 1xFast Digest pufera (*Fermentas*, Litvanija), 0.3 U enzima *NdeI* Fast Digest (*Fermentas*, Litvanija) i vodu bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka). Reakciona smeša inkubirana je 37°C/2 sata u mašini Veriti Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD). Po 5 µl produkata restrikcione digestije analizirani su u 3% agaroznom gelu (*Serva*, Nemačka), bojenom etidijum bromidom (0.5 µg/ml). Dužine produkata restrikcione digestije određivane su poređenjem sa standardom za dužinu DNK (GeneRuler™ 50bp DNA ladder, *Fermentas*, Litvanija).

3.5. Statistička obrada rezultata

Razlike u odnosu polova i psihijatrijskim dijagnozama između bolesnika sa i bez pokušaja samoubistva testirane su Pirsonovim χ^2 -testom, dok su razlike u prosečnoj starosti bolesnika testirane nesparenim t-testom. Navedeni testovi urađeni su u osnovnom statističkom paketu softverskog okruženja R, ver. 3.1.0 (R Core Team, 2014).

Asocijacija četiri domena stresnih događaja iz detinjstva (opšte traume, fizičko, emocionalno i seksualno zlostavljanje) i akutnih stresnih događaja sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika testirane su Pirsonovim χ^2 -testom u osnovnom statističkom paketu softverskog okruženja R, ver. 3.1.0 (R Core Team, 2014). Ispitivani stresni događaji testirani su ili kao kontinuirane varijable, ili kao kategorijske varijable kada su, na osnovu skorova ETI-SR i skora LTE-Q, bolesnici svrstani u grupu koja nije prijavila niti jedan stresni događaj (skor=0) ili je prijavila barem jedan (skor ≥1).

Za ispitivanje asocijacije alela i genotipova tačkastih varijanti, i haplotipova gena *ADARBI* sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika korišćeni su testovi integrisani u programu PLINK, ver. 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>, Purcell et al., 2007). Za testiranje asocijacije alela korišćen je Pirsonov χ^2 -test, dok je za testiranje asocijacije genotipova primenjena logistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama. Verovatnoća svih mogućih haplotipova u haplobloku 2 gena *ADARBI* izračunata je pomoću E-M algoritma, takođe integrisanog u programu PLINK, ver. 1.07. Asocijacija haplotipova sa učestalošću $\geq 5\%$ testirana je Pirsonovim χ^2 -testom i logističkom regresijom sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama. Mera jačine pojedinačne asocijacije izražena je odnosom verovatnoća (eng. *odds ratio*, OR) sa intervalom poverenja od 95% (eng. *confidence interval*, CI). OR predstavlja meru relativnog rizika prilikom poređenja dve grupe. Kao korekcija za istovremeno testiranje velikog broja varijabli (eng. *multiple testing*), za proveru asocijacije alela, genotipova i haplotipova, urađen je test sa milion permutacija prema maksimalnoj (T) permutacionoj proceduri programa PLINK. Hardy-Vajnbergova ravnoteža za ispitivane tačkaste varijante nije proveravana zato što je studija genetičke asocijacije u ovom radu uključila samo slučajevne (studija *case-only*), bez poređenja sa opštom kontrolnom populacijom.

Prosečna statistička snaga studije asocijacije tačkastih varijanti sa pokušajem samoubistva u ispitivanom uzorku psihijatrijskih bolesnika urađena je *post hoc* korišćenjem programa Quanto (<http://biostats.usc.edu/Quanto.html>, Gauderman and Morrison, 2006). Korišćeni su sledeći parametri: OR=1.556 (prosečan OR za sve tačkaste varijante koje su statistički značajno asociirane sa pokušajem samoubistva u ovoj studiji), MAF=0.276 (prosečan MAF za sve tačkaste varijante uključene u ovu studiju), aditivan genetički model (pretpostavljeni genetički model asocijacije statistički značajno asociiranih tačkastih varijanti sa pokušajem samoubistva), statistička greška tipa I $\alpha=0.05$, i učestalost pokušaja samoubistva=0.2%. Učestalost pokušaja samoubistva izračunata je na osnovu pretpostavke da je pokušaj 10 puta učestaliji (World Health Organization, 2014) u odnosu na procenjenu učestalost izvršenog samoubistva u Srbiji od 18.15/100000 (Dedic, 2014).

Nakon ispitivanja asocijacije individualnih genetičkih i sredinskih faktora rizika sa pokušajem samoubistva, pristupilo se ispitivanju da li dvostruke interakcije genetičkih i sredinskih faktora ($G \times E$) doprinose predispoziciji za pokušaj samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika. Dvostruke interakcije $G \times E$ testirane su logističkom regresijom sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama korišćenjem paketa SNPassoc 1.9-2 (González et al., 2014) u softverskom okruženju R, ver. 3.2.1 (R Core Team, 2015). Testirani genetički faktori uključili su odabrane tačkaste varijante gena *HTR2C* i *TPH2* i one varijante gena *ADARBI* za koje je dobijena statistički značajna asocijacija sa pokušajem samoubistva. Testirani sredinski faktori bili su uključeni kao kategorijske varijable. Mera jačine pojedinačne asocijacije izražena je kao OR sa CI od 95%.

Pojedinačni efekti i moguće interakcije odabranih genetičkih i sredinskih faktora (interakcije $G \times G$, $G \times E$, i $E \times E$), a u skladu sa rezultatima dobijenim prethodno opisanim statističkim testovima, dalje su ispitivani primenom generalizovanih linearnih modela (eng. *Generalized Linear Models*, GLMs) i selekcije unazad (eng. *backward selection*). Cilj primene naprednije statistike bio je da se, polazeći od velikog broja prediktorskih varijabli, odaberu najbolje fitovani minimalni modeli koji varijabilnost u riziku za pokušaj samoubistva u ispitivanom uzorku psihijatrijskih bolesnika objašnjavaju pomoću što manjeg broja prediktorskih varijabli. Na osnovu takvih modela moguće je napraviti razliku između psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili.

Polazeći od odgovarajućih početnih (eng. *null*) modela, koji su uključivali veliki broj prediktorskih varijabli i njihovih međusobnih interakcija, najbolji minimalni modeli dobijeni su fitovanjem generalizovanih linearnih modela sa binomnim odgovorom i logaritamskom vezivnom (eng. *logit linking*) funkcijom i selekcijom unazad. Selekcija unazad rađena je tako da su u ponavljajućim procesima testiranja eliminsane one prediktorske varijable čiji je nivo značajnosti bio >0.05 . Fitovanje generalizovanih linearnih modela i selekcija unazad urađene su u softverskom okruženju R, ver. 3.1.0 (R Core Team, 2014). Dodatna potvrda značajnosti modela urađena je obimnim istraživanjem svih potencijalnih generalizovanih linearnih modela korišćenjem paketa Glmulti, ver. 1.0.7.

(Calcagno, 2013), u okviru koga se poređenje modela i odabir najbolje fitovanog minimalnog modela vršilo je na osnovu kriterijuma AIC (Akaike informacijski kriterijum) i AICc (AIC sa korekcijom za veličinu uzorka i broj analiziranih parametara) tako da je najbolje fitovani minimalni model bio onaj sa najnižim vrednostima ovih kriterijuma. Kvalitet fitovanja (eng. *goodness of fit*) odabranog statističkog modela, sa ciljem da se proveriti do kojeg stepena se dobijeni podaci poklapaju sa teorijski očekivanim vrednostima, proveren je testom Hosmer-Lemeshow (Hosmer and Lemeshow, 2000) korišćenjem paketa ResourceSelection, ver. 0.2-5. (Lele et al., 2015).

Najbolje fitovani minimalni modeli dobijeni su prethodno opisanom procedurom polazeći od dva početna modela koji su uključivali različite prediktorske varijable i njihove interakcije u skladu sa rezultatima dobijenim prethodno opisanim statističkim analizama. Od genetičkih varijabli u prvom modelu bile su uključene varijante gena *HTR2C* i *ADARBI*, dok je drugi uključio varijante gena *TPH2* i *ADARBI*.

Prvi ispitivani početni model uključio je sledeće prediktorske varijable:

- Genotipove varijante rs6318 gena *HTR2C* za koju je prethodnim testiranjem pokazano da je statistički značajno asocirana sa pokušajem samoubistva prema aditivnom modelu nasleđivanja;
- Genotipove varijanti rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI* za koje je, takođe, prethodnim testiranjem pokazano da su statistički značajno asocirane sa pokušajem samoubistva prema aditivnom modelu nasleđivanja;
- Sva četiri domena stresnih događaja iz detinjstva (opšte traume, fizičko, emocionalno i seksualno zlostavljanje), kao kontinuirane varijable;
- Akutne stresne događaje, kao kontinuiranu varijablu;
- Psihijatrijske dijagnoze, pol i starost bolesnika;
- Dvostuke i trostruke interakcije svih prethodno navedenih faktora.

Drugi ispitivani početni model uključio je sledeće prediktorske varijable:

- Opšte traume, testirane kao kategorijska varijabla, koje su u prethodnim testiranjima bile statistički značajno asocirane sa pokušajem

samoubistva, bilo kao individualni faktor ili kroz interakciju sa varijantom rs4290270 gena *TPH2*;

- Genotipove varijante rs4290270 gena *TPH2* prema dominantnom modelu nasleđivanja, imajući u vidu da je u prethodnim testiranjima ova varijanta, prema dominantnom modelu nasleđivanja, bila statistički značajno asocirana sa pokušajem samoubistva kroz interakciju sa opštim traumama;
- Genotipove varijanti rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI* prema aditivnom modelu nasleđivanja, s obzirom da je prethodno pokazano da su obe varijante statistički značajno asocirane sa pokušajem samoubistva;
- Dvostuke i trostuke interakcije svih prethodno navedenih faktora;
- Psihijatrijske dijagnoze, pol i starost bolesnika kao faktore sa skrivenim efektom ili konfaundere (eng. *confoundres*);
- Sve relevantne dvostruke i trostruke interakcije konfaundera sa genetičkim faktorima i konfaundera sa sredinskim faktorima, kako bi se njihovi efekti na G x E interakcije kontrolisali na odgovarajući način (Keller, 2014).

Detektovane trostruke interakcije u drugom modelovanju dalje su analizirane parnim poređenjem populacionih srednjih vrednosti najmanjih kvadrata, dok je korekcija za višestruka testiranja urađena Tukey-evim poravnanjem P vrednosti u paketu *lsmeans* programa R (Lenth and Hervé, 2015).

U svim urađenim analizama, statistički značajan rezultat definisan je pragom $P < 0.05$.

4. Rezultati

4.1. Karakteristike ispitanika

Grupe bolesnika sa i bez pokušaja samoubistva nisu se statistički značajno razlikovale prema prosečnoj starosti ($P=0.629$, nespareni t -test) i prema odnosu polova ($P=0.376$, Pirsonov χ^2 -test) (Tabela 4.1). Poređenjem zastupljenosti pojedinačnih psihijatrijskih dijagnoza u grupama sa i bez pokušaja samoubistva uočeno je postojanje statističkog trenda ($P=0.066$, Pirsonov χ^2 -test), verovatno uslovljen raspodelom bolesnika sa shizofrenijom u ove dve grupe (Tabela 4.1). Iz ovog razloga psihijatrijska dijagnoza bila je uključena kao kovarijata u logističkim regresijama i testirana kao konfauder u generalizovanim linearnim modelima.

Tabela 4.1. Sociodemografske karakteristike i psihijatrijske dijagnoze u ukupnom ispitivanom uzorku bolesnika, uzorku bolesnika koji su pokušali samoubistvo i uzorku bolesnika koji nisu pokušali samoubistvo.

	Ukupan uzorak	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	P
Broj ispitanika (%)	353 (100.0)	165 (46.7)	188 (53.3)	
Prosečna starost (SD)	41.99 (11.6)	42.31 (11.7)	41.71 (11.6)	0.629 ^a
	Broj ispitanika (%)			
Pol				
Muškarci	124 (35.1)	54 (32.7)	70 (37.2)	0.376 ^b
Žene	229 (64.9)	111 (67.3)	118 (62.8)	
Psihijatrijska dijagnoza				
Depresivni poremećaj	142 (40.2)	75 (45.5)	67 (35.6)	0.066 ^b
Bipolarni afektivni poremećaj	80 (22.7)	39 (23.6)	41 (21.8)	
Shizofrenija	131 (37.1)	51 (30.9)	80 (42.6)	

SA: pokušaj samoubistva; standardna devijacija.

^aNespareni t -test;

^bPirsonov χ^2 -test.

4.2. Asocijacija stresnih životnih događaja sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Testiranjem stresnih životnih događaja kao kategorijskih varijabli pokazana je asocijacija opštih trauma iz detinjstva sa pokušajem samoubistva u ispitivanom uzorku psihijatrijskih bolesnika (Tabela 4.2). Distribucija učestalosti skora ETI-SR za opšte traume bila je statistički značajno različita između psihijatrijskih bolesnika sa i bez pokušaja samoubistva ($P=0.040$, Pirsonov χ^2 -test), dok se distribucije učestalosti skorova ETI-SR za emocionalno i fizičko zlostavljanje nisu statistički značajno razlikovale ($P>0.05$, Pirsonov χ^2 -test). Skorovi ETI-SR za seksualno zlostavljanje i LTE-Q za akutne stresne događaje nisu imali zadovoljavajuću raspodelu, tako da njihove asocijacije, kao kategorijskih varijabli, nisu testirane.

Testiranjem stresnih životnih događaja kao kontinuiranih varijabli pokazana je asocijacija opštih trauma i emocionalnog zlostavljanja tokom detinjstva, kao i akutnih stresnih događaja sa pokušajem samoubistva u ispitivanom uzorku psihijatrijskih bolesnika (Tabela 4.3). Distribucije učestalosti skorova ETI-SR za opšte traume i emocionalno zlostavljanje, kao i skora LTE-Q, statistički značajno su se razlikovale između bolesnika koji su pokušali samoubistvo i bolesnika koji to nikada nisu uradili ($P=0.006$, $P=0.040$ i $P=0.014$, redom, Pirsonov χ^2 -test). Distribucije učestalosti skorova ETI-SR za fizičko i seksualno zlostavljanje nisu pokazali statistički značajne razlike među ispitivanim grupama ($P>0.05$, Pirsonov χ^2 -test).

Tabela 4.2. Ispitivanje asocijacija stresnih događaja iz djetinjstva i akutnih stresnih događaja sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika.

Stresni životni događaji	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	χ^2	P ^a
				OR (95% CI)
Broj ispitanika (%)				
ETI-SR skor za opšte traume				
0	52 (32.1)	80 (42.8)	4.212	0.040^b
≥1	110 (67.9)	107 (57.2)		1.58 (1.02-2.45)
ETI-SR skor za fizičko zlostavljanje				
0	80 (49.4)	98 (52.4)	0.318	0.573
≥1	82 (50.6)	89 (47.6)		1.13 (0.74-1.72)
ETI-SR skor za emocionalno zlostavljanje				
0	70 (43.2)	82 (43.9)	0.014	0.904
≥1	92 (56.8)	105 (56.1)		1.03 (0.67-1.57)
ETI-SR skor za seksualno zlostavljanje				
0	154 (95.1)	183 (97.9)	-	-
≥1	8 (4.9)	4 (2.1)	-	-
LTE-Q skor za akutne stresne događaje				
0	4 (2.5)	4 (2.2)	-	-
≥1	158 (97.5)	182 (97.8)	-	-

SA: pokušaj samoubistva; χ^2 : statistički parametar Pirsonovog χ^2 -testa; OR: odnos verovatnoća; CI: interval poverenja; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory-Self Report*; LTE-Q: upitnik *List of Threatening Experiences Questionnaire*.

^aPirsonov χ^2 -test;

^bStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Tabela 4.3. Ispitivanje asocijacija stresnih događaja iz djetinjstva i akutnih stresnih događaja sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika.

Stresni životni događaji	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	df	χ^2	P ^a
	Broj ispitanika (%)				
0	52 (32.1)	80 (42.8)			
1	77 (47.5)	56 (29.9)			
2	30 (18.6)	39 (20.9)	4	14.379	0.006^b
3	2 (1.2)	10 (5.3)			
4	1 (0.6)	2 (1.1)			
ETI-SR skor za fizičko zlostavljanje					
0	80 (49.4)	98 (52.4)			
1	34 (21.0)	29 (15.5)			
2	30 (18.5)	38 (20.3)	4	3.491	0.479
3	18 (11.1)	20 (10.7)			
4	0 (0.00)	2 (1.1)			
ETI-SR skor za emocionalno zlostavljanje					
0	70 (43.2)	82 (43.9)			
1	10 (6.1)	7 (3.7)			
2	16 (9.9)	31 (16.5)			
3	39 (24.1)	45 (24.1)	5	11.637	0.040
4	16 (9.9)	20 (10.7)			
5	11 (6.8)	2 (1.1)			
ETI-SR skor za seksualno zlostavljanje					
0	154 (95.1)	183 (97.9)	1	2.049	0.152
1	8 (4.9)	4 (2.1)			
LTE-Q skor za akutne stresne događaje					
0	4 (2.5)	4 (2.2)			
1	20 (12.3)	39 (21.0)			
2	55 (34.0)	83 (44.6)			
3	62 (38.3)	47 (25.3)	5	14.19	0.014
4	19 (11.7)	12 (6.4)			
5	2 (1.2)	1 (0.5)			

SA: pokušaj samoubistva; df: broj stepeni slobode; χ^2 : statistički parametar Pirsonovog χ^2 -testa; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory-Self Report*; LTE-Q: upitnik *List of Threatening Experiences Questionnaire*.

^aPirsonov χ^2 -test;

^bStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

4.3. Odabrane tag tačkaste varijante u *ADAR* i *ADARBI* regionima od interesa

Prema podacima projekta HapMap za belu populaciju i zadatim kriterijumima ($MAF \geq 5\%$, $r^2 \geq 0.8$, favorizovanje kodirajućih tačkastih varijanti, 'Pairwise tagging only') u programu Haploview odabrane su tag tačkaste varijante. Za analizu *ADAR* regiona od interesa (kompletan gen *ADAR* i 10 kb uzvodno i nizvodno od gena), odabrano je 12 tag varijanti sa kojima je još 44 varijanti bilo u visokoj neravnotežnoj vezanosti (Tabela 4.4). Dve tag varijante bile su iz liste favorizovanih kodirajućih varijanti. Za analizu *ADARBI* regiona od interesa (region koji kodira deaminazni domen i 3' UTR), odabrano je 11 tag varijanti sa kojima je još 38 varijanti bilo u visokoj neravnotežnoj vezanosti (Tabela 4.5).

Tabela 4.4. Odabrane tag tačkaste varijante *ADAR* regiona od interesa, tačkaste varijante u visokoj neravnotežnoj vezanosti sa odabranim tag varijantama i oznake korišćenih komercijalnih eseja za alelsku diskriminaciju.

Gen (pozicija)	tagSNV	SNVs u neravnotežnoj vezanosti sa tagSNV ($r^2 \geq 0.8$)	Oznaka eseja (<i>Applied Biosystems, SAD</i>)
ADAR (chr1: 152811159-152877061, NCBI build 36.1)	rs2072659	rs2072659	C__15949654_10
	rs2072660	rs2072660	C__15949664_10
	rs3811450	rs3811450	C__27504568_10
	rs9427092	rs9427092, rs9427097	C__30240672_10
	rs9616	rs9616	C__8724401_10
	rs1127309	rs1127309	C__131814_1_
	rs3766924	rs2335230, rs3766924	C__25800598_10
	rs2229857	rs9426823, rs4845384, rs3738029, rs1127317, rs1994922, rs2131902, rs6656743, rs2229857, rs3766927, rs11264222, rs3766923, rs1127314, rs1127326	C__1235929_10
	rs6699729	rs6699825, rs10908419, rs6699729, rs3766922, rs12125166, rs1127313, rs9426830, rs7531982, rs1127311, rs903323, rs9427104, rs9427094	C__30114879_10
	rs962242	rs962242, rs7533471, rs4636449, rs3766925, rs3738032	C__11341961_10
	rs9427108	rs9427108, rs9426831, rs884618	C__30204881_10
	rs1552902	rs1552902, rs884617	C__11341160_20

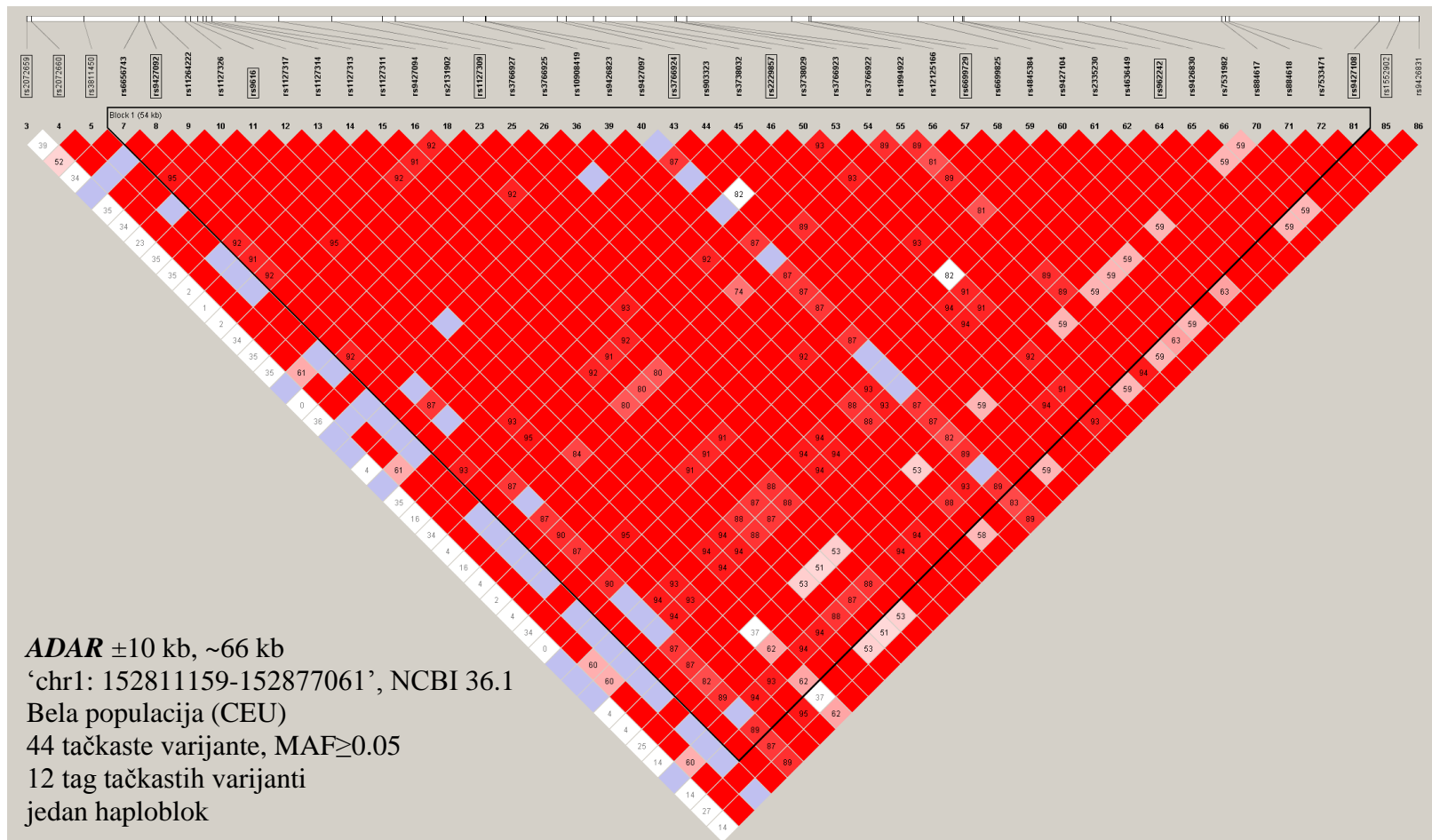
SNV: tačkasta varijanta; r^2 : koeficijent korelacije neravnotežne vezanosti između alela dve tačkaste varijante.

Tabela 4.5. Odabrane tag tačkaste varijante *ADARBI* regiona od interesa, tačkaste varijante u visokoj neravnotežnoj vezanosti sa odabranim tag varijantama i oznake korišćenih komercijalnih eseja za alelsku diskriminaciju.

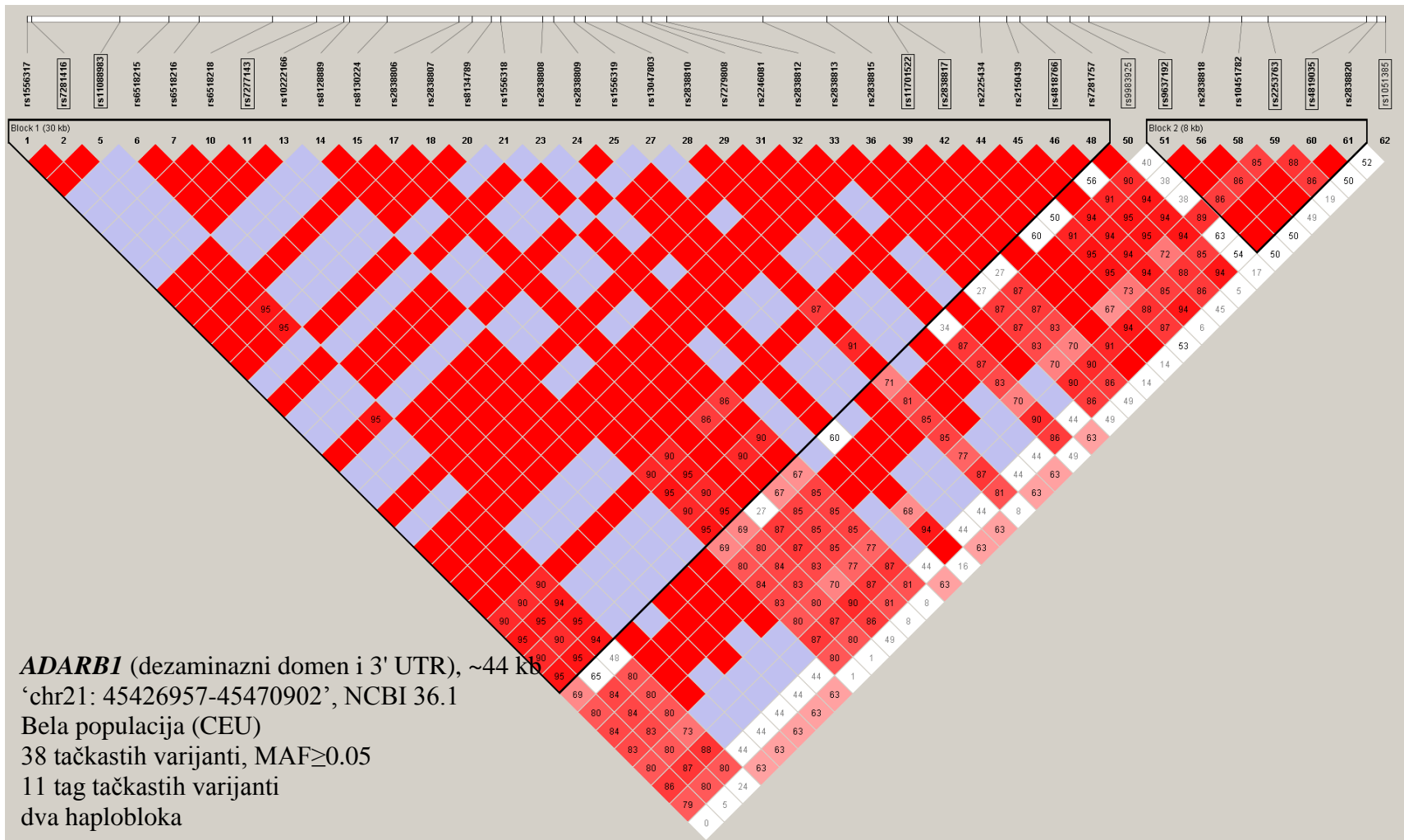
Gen (pozicija)	tagSNV	SNVs u neravnotežnoj vezanosti sa tagSNV ($r^2 \geq 0.8$)	Oznaka eseja (<i>Applied Biosystems</i> , SAD)
<i>ADARBI</i> ('chr21: 45426957-45470902', NCBI build 36.1)	rs7281416	rs7281757, rs1556317, rs2150439, rs2838807, rs13047803, rs8130224, rs7281416, rs8134789, rs8128889	C__29901837_10
	rs11088983	rs11088983, rs2838813, rs2246081, rs2838815, rs2838806	C__31335208_10
	rs7277143	rs6518216, rs1556319, rs10222166, rs7277143, rs2838809, rs1556318, rs6518218, rs2838812, rs2838810, rs6518215, rs7279808	C__31335183_10
	rs11701522	rs11701522	C__3002313_10
	rs2838817	rs2838808, rs2838817	C__3002314_1_
	rs4818766	rs2225434, rs4818766	C__26539691_10
	rs9983925	rs9983925	C__1211567_10
	rs9637192	rs2838818, rs9637192, rs1051367, rs2838820	C__1211568_1_
	rs2253763	rs2253763	C__15831797_10
	rs4819035	rs4819035	C__1211577_10
	rs1051385	rs1051385	C__9520036_20

SNV: tačkasta varijanta; r^2 : koeficijent korelacije neravnotežne vezanosti između alela dve tačkaste varijante.

Na osnovu šematskog prikaza populacione strukture neravnotežne vezanosti (LD plot) odabranih tag tačkastih varijanti u *ADAR* regionu od interesa, generisanom u programu Haploview, uočeno je da region sadrži jedan haploblok veličine ~54 kb (Slika 4.1). Tri tag tačkaste varijante (rs2072659, rs2072660 i rs3811450) nalaze se distalno u odnosu na haploblok, dok se jedna (rs1552902) nalazi proksimalno. One su u niskoj neravnotežnoj vezanosti sa tag varijantama iz haplobloka, što ukazuje da se nasleđuju nezavisno od varijanti u haplobloku. Na osnovu LD plota odabranih tag tačkastih varijanti u *ADARBI* regionu od interesa uočena su dva haplobloka, haploblok 1 veličine ~30 kb i haploblok 2 veličine ~8 kb (Slika 4.2). Tag varijanta rs9983925 nalazi se između haplobloka 1 i 2, dok se tag varijanta rs1051385 nalazi distalno od haplobloka 2. Obe navedene varijante nisu u neravnotežnoj vezanosti sa drugim tag varijantama analiziranog regiona, tako da se nasleđuju nezavisno od varijanti u haplobloku 1 i 2.



Slika 4.1. Šematski prikaz strukture neravnotežne vezanosti (LD plot) tag varijanti *ADAR* regiona od interesa u beloj populaciji, prema podacima projekta HapMap. Predstavljene su relativne pozicije odabranih tag tačkastih varijanti (uokvirene) i svih tačkastih varijanti koje su sa njima u visokoj neravnotežnoj vezanosti. Vrednosti neravnotežne vezanosti, označene parametrom D' za sve moguće parove tačkastih varijanti, predstavljene su kvadratićima: crveni predstavljaju visoku neravnotežnu vezanost dve varijante, rozi nižu, a beli veoma nisku. Brojevi u kvadratićima su vrednosti parametra D' . MAF: učestalost ređeg alela.



Slika 4.2. Šematski prikaz strukture neravnotežne vezanosti (LD plot) tag varijanti *ADARBI* regiona od interesa u beloj populaciji, prema podacima projekta HapMap. Predstavljene su relativne pozicije odabranih tag tačkastih varijanti (uokvirene) i svih tačkastih varijanti koje su sa njima u visokoj neravnotežnoj vezanosti. Vrednosti neravnotežene vezanosti, označene parametrom D' za sve moguće parove tačkastih varijanti, predstavljene su kvadratićima: crveni predstavljaju visoku neravnotežnu vezanost dve varijante, rozi nižu, a beli veoma nisku. Brojevi u kvadratićima su vrednosti parametra D' . MAF: učestalost ređeg alela.

4.4. Karakteristike i funkcionalna anotacija tačkastih varijanti *ADAR* i *ADAR1* regiona od interesa i gena *HTR2C* i *TPH2*

Karakteristike (pozicija u genomu prema GRCh37, aleli, učestalost redeg alela i lokacija u genu) i funkcionalna anotacija prema bazi Regulome (Boyle et al., 2012) svih tačkastih varijanti odabranih za analizu predstavljene su u Tabelama 4.6 i 4.7. Među tag varijantama gena *ADAR*, deset je bilo nekodirajućih (četiri iz 5' UTR-a, jedna intronska i pet iz 3' UTR-a), dok su dve bile kodirajuće, jedna sinonimna i jedna nesinonimna.

Tabela 4.6. Karakteristike i funkcionalna anotacija tag tačkastih varijanti *ADAR* regiona od interesa.

Gen i lokus	tagSNV	Pozicija na hromozomu ^a	Aleli	MAF ^b	Lokacija u genu ^c	Efekat na protein	Skor Regulome ^d
<i>ADAR</i> 1q21.3	rs2072659	154548521	<u>G</u> ^c /C	0.10	3' UTR	-	5
	rs2072660	154548721	<u>T</u> /C	0.26	3' UTR	-	2b
	rs3811450	154551032	<u>T</u> /C	0.07	3' UTR	-	5
	rs9427092	154553722	<u>C</u> /T	0.18	3' UTR	-	Nema
	rs9616	154555733	<u>T</u> /A	0.28	3' UTR	-	5
	rs1127309	154561925	<u>T</u> /C	0.33	egzon 9	p.Val894Val	Nema
	rs3766924	154571826	<u>T</u> /C	0.20	intron 2	-	5
	rs2229857	154573967	<u>T</u> /C	0.33	egzon 2	p.Lys384Arg	Nema
	rs6699729	154582896	<u>T</u> /A	0.46	5' UTR	-	5
	rs962242	154592140	<u>C</u> /T	0.26	5' UTR	-	5
rs9427108	154607914	<u>A</u> /G	0.41	5' UTR	-	5	
rs1552902	154608823	<u>G</u> /C	0.39	5' UTR	-	Nema	

SNV: tačkasta varijanta; MAF: učestalost redeg alela; UTR: netranslatirajući region; Val: aminokiselina valin; Lys: lizin; Arg: arginin.

^aPozicija tačkaste varijante prema bazi dbSNP, verzija genoma čoveka GRCh37 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, pristupljeno 02.10.2013);

^bUčestalost redeg alela u evropskoj populaciji iz baze podataka 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>, pristupljeno 02.10.2013);

^cLokacija tačkaste varijante u genu *ADAR* i efekat na proteinskom nivou prema bazi podataka Ensembl (<http://www.ensembl.org>, pristupljeno 10.10.2013), korišćeni transcript: ENST00000368474 (*ADAR*);

^dFunkcionalna anotacija tačkastih varijanti prema bazi podataka Regulome (<http://www.regulome.stanford.edu>, pristupljeno 13.12.2013);

^eRedi alel je podvučen.

Sve odabrane tag varijante gena *ADARBI* bile su nekodirajuće (osam intronskih i tri iz 3' UTR-a). Odabrana varijanta rs6318 gena *HTR2C* je kodirajuća nesinonimna varijanta, dok su odabrane varijante gena *TPH2*, rs7305115 i rs4290270, kodirajuće sinonimne varijante.

Tabela 4.7. Karakteristike i funkcionalna anotacija tag tačkastih varijanti *ADARBI* regiona od interesa i ispitvanih varijanti gena *HTR2C* i *TPH2*.

Gen i lokus	tagSNV	Pozicija na hromozomu ^a	Aleli	MAF ^b	Lokacija u genu ^c	Efekat na protein	Skor Regulome ^d
<i>ADARBI</i> 21q22.3	rs7281416	46605839	<u>T</u> /C	0.33	intron 7	-	6
	rs11088983	46608470	<u>C</u> /T	0.41	intron 7	-	6
	rs7277143	46614346	<u>G</u> /C	0.08	intron 7	-	Nema
	rs11701522	46631419	<u>G</u> /A	0.13	intron 8	-	6
	rs2838817	46631698	<u>T</u> /C	0.33	intron 8	-	4
	rs4818766	46635351	<u>A</u> /G	0.40	intron 8	-	5
	rs9983925	46636844	<u>T</u> /C	0.34	intron 8	-	Nema
	rs9637192	46637413	<u>T</u> /C	0.41	intron 8	-	Nema
	rs2253763	46642764	<u>T</u> /C	0.35	3' UTR-egzon 10	-	Nema
	rs4819035	46645715	<u>G</u> /T	0.29	3' UTR-egzon 10	-	1f
rs1051385	46646264	<u>C</u> /T	0.06	3' UTR-egzon 10	-	4	
<i>HTR2C</i> Xq24	rs6318	113965735	<u>C</u> /G	0.16	egzon 4	p.Cys23Ser	6
<i>TPH2</i> 12q21.1	rs7305115	71979082	<u>A</u> /G	0.43	egzon 7	p.Pro312Pro	5
	rs4290270	72022455	<u>A</u> /T	0.42	egzon 9	p.Ala375Ala	Nema

SNV: tačkasta varijanta; MAF: učestalost redeg alela; UTR: netranslatirajući region; Cys: aminokiselina cistein; Ser: serin; Pro: prolin; Ala: alanin.

^aPozicija tačkaste varijante prema bazi dbSNP, verzija genoma čoveka GRCh37 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, pristupljeno 02.10.2013);

^bUčestalost redeg alela u evropskoj populaciji iz baze podataka 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>, pristupljeno 02.10.2013);

^cLokacija tačkaste varijante u odgovarajućim genima i efekat na proteinskom nivou prema bazi podataka Ensembl (<http://www.ensembl.org>, pristupljeno 10.10.2013), korišćeni transkripti: ENST00000360697 (*ADARBI*), ENST00000276198 (*HTR2C*) i ENST00000333850 (*TPH2*);

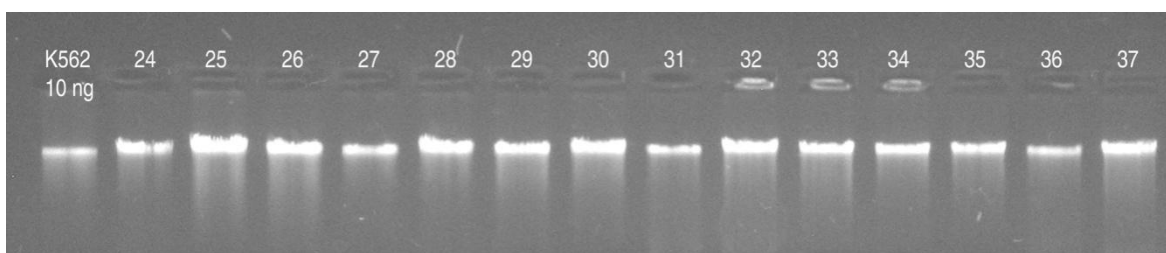
^dFunkcionalna anotacija tačkastih varijanti prema bazi podataka Regulome (<http://www.regulome.stanford.edu>, pristupljeno 13.12.2013);

^eRedi alel je podvučen.

Prema bazi Regulome, tag varijanta rs4819035 *ADARBI* regiona od interesa imala je skor 1f i identifikovana je kao *cis* lokus koji je u asocijaciji sa promenom u nivou ekspresije nekog gena (eng. *cis expression quantitative trait locus*, *cis* eQTL), što je indikacija za njen potencijalni funkcionalni značaj. Sedamnaest tag tačkastih varijanti imalo je visok skor prema bazi Regulome, te najverovatnije nemaju funkcionalni značaj, dok za devet tačkastih varijanti podaci nisu bili dostupni. Prema programima SIFT i PolyPhen, za predikciju efekta varijante na nivou proteina, nesinonimne varijante rs2229857 gena *ADAR* i rs6318 gena *HTR2C* se tolerišu, odnosno imaju benigni efekat.

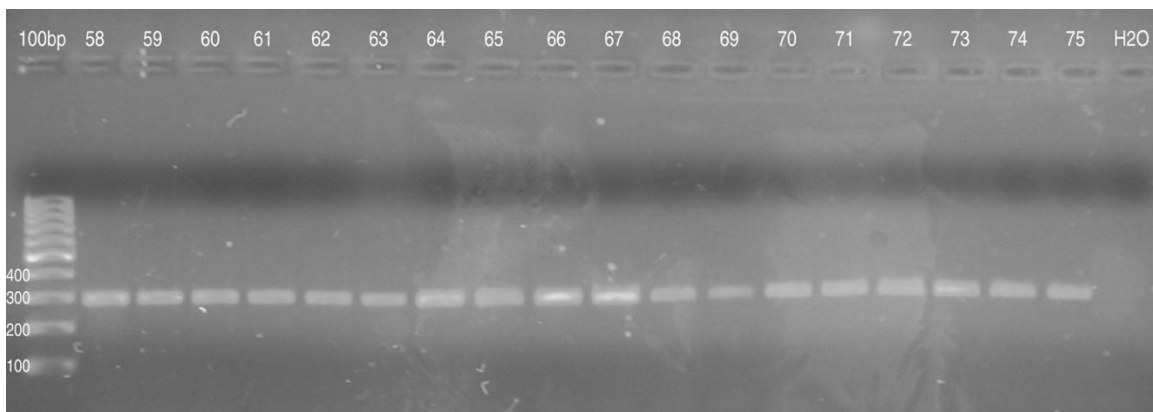
4.5. Rezultati molekularno-genetičkih metoda

DNK je uspešno izolovana iz uzoraka krvi svih ispitanika. Prisustvo diskretne trake na gelu ukazivalo je da je izolovana DNK nativna (Slika 4.3). U poređenju sa K562 DNK, standardom za količinu DNK, koncentracija izolovanih DNK bila je veća od 20 ng/μl, što je bilo zadovoljavajuće za primenu metoda genotipizacije tačkastih varijanti korišćenih u ovom radu.

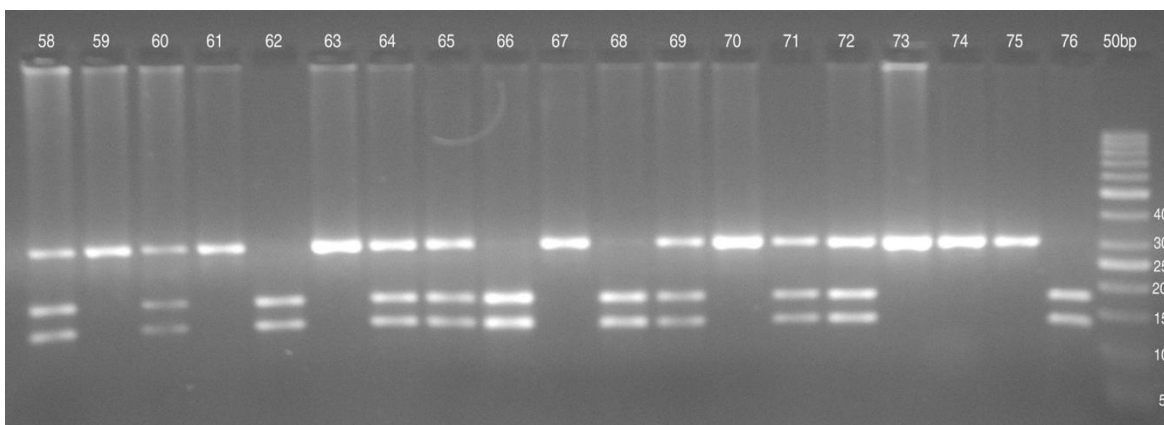


Slika 4.3. Vizuelizacija DNK izolovanih iz uzoraka krvi ispitanika u 0.8% agaroznom gelu bojenom etidijum bromidom (0.5 μg/ml) nakon izlaganja svetlu talasne dužine 254 nm. K562 DNK: standard za količinu DNK (*Promega*, SAD); redni brojevi 24-37: izolovane DNK koje pripadaju kolekciji uzoraka DNK bolesnika sa bipolarnim afektivnim poremećajem.

Genotipizacija varijante rs4290270 gena *TPH2* vršena je restrikcijom digestijom produkata PCR. Specifični segment gena *TPH2* uspešno je amplifikovan korišćenjem dizajniranih prajmera, TPH2F i TPH2R, i optimizovanih uslova za PCR. Nakon vizuelizacije produkata PCR uočene su diskretne trake očekivane veličine od 298 bp (Slika 4.4). Nakon restrikcione digestije produkata PCR-a enzimom *NdeI* i vizuelizacijom produkata restrikcione digestije uočene su diskretne trake veličina 298, 172 i 126 bp. Nedigerirani fragment dužine 298 bp odgovarao je umnoženoj sekvenci u kojoj je bio prisutan alel T, dok je prisustvo fragmenata dužine od 172 bp i 126 bp, nastalih restrikcijom digestijom, odgovaralo sekvenci u kojoj prisutan alel A (Slika 4.5).

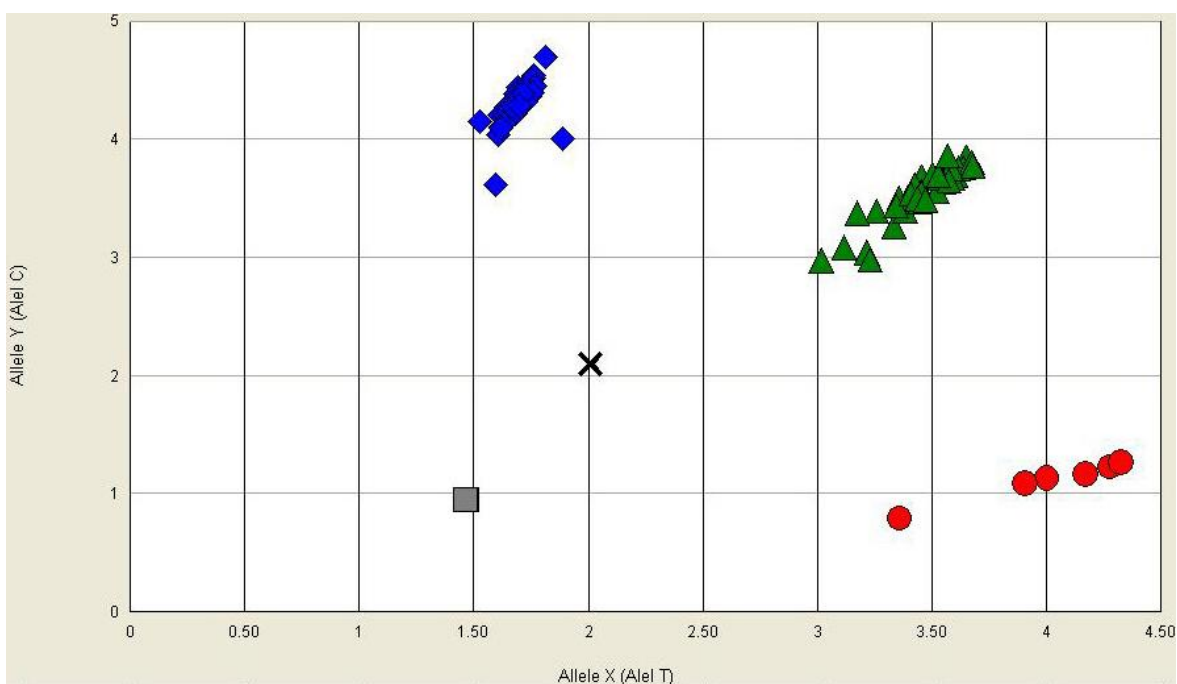


Slika 4.4. Vizuelizacija produkata PCR-a za fragment gena *TPH2* u 1.5% agaroznom gelu bojenom etidijum bromidom (0.5 $\mu\text{g/ml}$) nakon izlaganja svetlu talasne dužine 254 nm. Očekivana dužina specifičnog produkta je 298 bp. 100 bp: standard za veličinu DNK GeneRuler™ 100bp DNA ladder (*Fermentas*, Litvanija); redni brojevi 58-75: produkti PCR-a umnoženi iz kolekcije uzoraka DNK bolesnika sa depresivnim poremećajem; H2O: negativna kontrola u kojoj je umesto DNK korišćena voda bez nukleaza (*Qiagen*, Nemačka).



Slika 4.5. Vizuelizacija produkata restikcione digestije u cilju genotipizacije varijante rs4290270 gena *TPH2* u 3% agaroznom gelu bojenom etidijum bromidom (0.5 $\mu\text{g/ml}$) nakon izlaganja svetlu talasne dužine 254 nm. Osobe kod kojih je detektovan samo fragment dužine 298 bp bile su homozigoti za alel T, osobe kod kojih su detektovani fragmenti dužine 172 bp i 126 bp, nastali restrikcionom digestijom, bile su homozigoti za alel A, dok su osobe kod kojih su uočena sva tri fragmenta bile heterozigoti AT za varijantu rs4290270. 50 bp: standard za veličinu DNK GeneRuler™ 50bp DNA ladder (*Fermentas*, Litvanija); redni brojevi 58-76: produkti restikcione digestije *TPH2* PCR-a uzoraka koji pripadaju kolekciji DNK bolesnika sa depresivnim poremećajem.

Sve ostale tačkaste varijante (tag varijante *ADAR* i *ADARBI* regiona od interesa, varijanta rs6318 gena *HTR2C*, i varijanta rs7305115 gena *TPH2*) uspešno su genotipizirane metodom alelske diskriminacije korišćenjem komercijalno dostupnih eseja sa probama TaqMan (*Applied Biosystems*, SAD). Grafički prikaz obrađenih rezultata genotipizacije varijante rs3766924 gena *ADAR* prikazan je na Slici 4.6. Genotipovi homozigota za alel 1, odnosno alel 2, grupisali su se bliže osama X, odnosno Y, dok su se heterozigotni genotipovi grupisali duž dijagonale plota za alelsku diskriminaciju.



Slika 4.6. Grafički prikaz iz programa SDS nakon automatski obrađenih rezultata genotipizacije rs3766924 gena *ADAR* primenom metode alelske diskriminacije. U zavisnosti od fluorescencije reporterskih boja nakon hidrolize hibridizovanih proba TaqMan homozigotni genotipovi TT (●) su se grupisali duž X ose (alel T), homozigotni genotipovi CC (◆) duž Y ose (alel C), dok su se heterozigotni genotipovi CT (▲) grupisali duž dijagonale. ■ : negativne kontrole; ✕ : genotip koji nije određen.

4.6. Asocijacije alela i genotipova varijanti gena *ADAR*, *ADARBI*, *HTR2C* i *TPH2* sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Testiranjem asocijacije alela 26 tačkastih varijanti *ADAR* i *ADARBI* regiona od interesa i gena *HTR2C* i *TPH2* sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika iz Srbije statistički značajni rezultati asocijacije alela i genotipova dobijeni su za tri varijante – rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI* i rs6318 gena *HTR2C* (Tabela 4.8, Tabela 4.9 i Tabela 4.10). Statistička snaga ove *case-only* studije za detekciju asocijacije pojedinačnih tačkastih varijanti sa pokušajem samoubistva u ispitivanom uzorku kod psihijatrijskih bolesnika iz Srbije procenjena je na 77.8%.

Tabela 4.8. Učestalosti ređih alela varijanti gena *ADAR* u grupama psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili i njihova asocijacija sa pokušajem samoubistva.

Gen	SNV	Aleli	MAF bolesnika sa SA	MAF bolesnika bez SA	χ^2	P ^a	OR	95% CI	P ^b
<i>ADAR</i>	rs2072659	<u>G</u> ^c /C	0.091	0.096	0.059	0.808	0.939	0.564-1.562	0.852
	rs2072660	<u>T</u> /C	0.239	0.190	2.568	0.109	1.343	0.936-1.928	0.114
	rs3811450	<u>T</u> /C	0.091	0.064	1.770	0.183	1.458	0.834-2.549	0.220
	rs9427092	<u>C</u> /T	0.188	0.158	1.118	0.290	1.235	0.835-1.828	0.325
	rs9616	<u>T</u> /A	0.264	0.271	0.052	0.819	0.962	0.689-1.343	0.862
	rs1127309	<u>T</u> /C	0.279	0.269	0.091	0.762	1.053	0.755-1.466	0.796
	rs3766924	<u>T</u> /C	0.258	0.282	0.528	0.468	0.884	0.633-1.234	0.488
	rs2229857	<u>T</u> /C	0.282	0.274	0.054	0.815	1.040	0.748-1.447	0.863
	rs6699729	<u>T</u> /A	0.445	0.433	0.102	0.750	1.050	0.779-1.414	0.756
	rs962242	<u>C</u> /T	0.206	0.207	0.002	0.964	0.992	0.688-1.429	1.000
	rs9427108	<u>A</u> /G	0.403	0.399	0.012	0.912	1.017	0.752-1.375	0.938
	rs1552902	<u>G</u> /C	0.361	0.378	0.219	0.639	0.929	0.684-1.263	0.692

SNV: tačkasta varijanta; MAF: učestalost ređeg alela; SA: pokušaj samoubistva; χ^2 : statistički parametar Pirsonovog χ^2 -testa; OR: odnos verovatnoća; CI: interval poverenja.

^aPirsonov χ^2 -test;

^bTest sa milion permutacija;

^cRedi alel je podvučen.

Tabela 4.9. Učestalosti ređih alela varijanti gena *ADARBI*, *HTR2C* i *TPH2* u grupama psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili i njihova asocijacija sa pokušajem samoubistva.

Gen	SNV	Aleli	MAF bolesnika sa SA	MAF bolesnika bez SA	χ^2	P ^a	OR	95% CI	P ^b
<i>ADARBI</i>	rs7281416	<u>T</u> /C	0.361	0.330	0.739	0.390	1.146	0.840-1.564	0.434
	rs11088983	<u>C</u> /T	0.464	0.487	0.375	0.540	0.912	0.678-1.226	0.555
	rs7277143	<u>G</u> /C	0.121	0.144	0.764	0.382	0.822	0.530-1.275	0.468
	rs11701522	<u>G</u> /A	0.118	0.082	2.513	0.113	1.492	0.908-2.451	0.120
	rs2838817	<u>T</u> /C	0.301	0.251	2.034	0.154	1.280	0.911-1.796	0.164
	rs4818766	<u>A</u> /G	0.470	0.468	0.002	0.966	1.006	0.748-1.354	1.000
	rs9983925^d	<u>T</u>/C	0.309	0.388	4.839	0.028	0.705	0.516-0.963	0.037
	rs9637192	<u>T</u> /C	0.485	0.500	0.161	0.688	0.941	0.700-1.265	0.705
	rs2253763	<u>T</u> /C	0.406	0.356	1.842	0.175	1.235	0.910-1.674	0.183
	rs4819035	<u>G</u>/T	0.251	0.183	4.811	0.028	1.495	1.042-2.144	0.043
rs1051385	<u>C</u> /T	0.106	0.133	1.203	0.273	0.774	0.488-1.225	0.298	
<i>HTR2C</i>	rs6318	<u>C</u>/G	0.185	0.114	5.712	0.017	1.755	1.102-2.794	0.028
<i>TPH2</i>	rs7305115	<u>A</u> /G	0.406	0.431	0.444	0.505	0.903	0.669-1.219	0.542
	rs4290270	<u>A</u> /T	0.361	0.393	0.785	0.376	0.871	0.641-1.182	0.394

SNV: tačkasta varijanta; MAF: učestalost ređeg alela; SA: pokušaj samoubistva; χ^2 : statistički parametar Pirsonov χ^2 -testa; OR: odnos verovatnoća; CI: interval poverenja.

^aPirsonov χ^2 -test;

^bTest sa milion permutacija;

^cReđi alel je podvučen;

^dStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Ređi alel T varijante rs9983925 gena *ADARBI* smanjivao je rizik za pokušaj samoubistva (P=0.028, OR=0.705, 95%CI=0.516-0.963, Pirsonov χ^2 -test). Suprotno njemu, ređi alel G varijante rs4819035 gena *ADARBI* povećavao je rizik za pokušaj samoubistva (P=0.028, OR=1.495, 95%CI=1.042-2.144, Pirsonov χ^2 -test). Isti efekat uočen je i za ređi alel C varijante rs6318 gena *HTR2C* (P=0.017, OR=1.755, 95%CI=1.102-2.794, Pirsonov χ^2 -test). Asocijacija alela X-vezane varijante rs6318 sa pokušajem samoubistva nije bila statistički značajna kada su žene i muškarci nezavisno analizirani (podaci nisu prikazani). Svi rezultati testiranja asocijacija alela sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih bolesnika potvrđeni su testom sa milion permutacija (Tabela 4.8 i Tabela 4.9).

Za varijante rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI* i varijantu rs6318 gena *HTR2C* dalje je ispitivana asocijacija njihovih genotipova. Logističkom regresijom sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama utvrđeno je da sve tri tačkaste varijante modifikuju predispoziciju za pokušaj samoubistva u ispitivanom uzorku prema aditivnom modelu nasleđivanja (Tabela 4.10). Ovaj genetički model podrazumeva da svaka dodatna kopija rizičnog/protektivnog alela povećava/smanjuje rizik za pokušaj samoubistva. Prema aditivnom modelu varijanta rs9983925 gena *ADARBI* smanjuje rizik za pokušaj samoubistva ($P=0.032$, $OR=0.710$, $95\%CI=0.520-0.971$, logistička regresija), dok druga varijanta rs4819035 istog gena povećava rizik za pokušaj samoubistva ($P=0.042$, $OR=1.437$, $95\%CI=1.013-2.038$, logistička regresija). Za varijantu rs6318, koja se X-vezano nasleđuje, testirani su samo opšti i aditivan model, pri čemu su hemizigotni muški ispitanici bili kodirani kao homozigoti. Ova varijanta prema aditivnom modelu povećava rizik za pokušaj samoubistva ($P=0.027$, $OR=1.634$, $95\%CI=1.058-2.522$, logistička regresija). Statističke značajnosti asocijacija genotipova rs9983925, rs4819035 i rs6318 potvrđene su testom sa milion permutacija ($P<0.05$) (Tabela 4.10).

Prema strukturi neravnotežne vezanosti *ADARBI* regiona od interesa za belu populaciju, rs9983925 nalazi se između dva haplobloka, dok se rs4819035 nalazi unutar haplobloka 2 (Slika 4.2). Obe varijante nisu u visokoj neravnotežnoj vezanosti sa ostalim varijantama u ispitivanom regionu (Tabela 4.5), što ukazuje da su varijante rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI* direktno asocirane sa pokušajem samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika iz Srbije.

Varijanta rs4819035 nalazi se u 3' UTR-u gena *ADARBI*. Prema podacima baze Regulome ona je najverovatnije *cis* eQTL koji utiče na vezivanje transkripcionih faktora. Varijanta rs9983925 nalazi se u intronu 8 gena *ADARBI*, i u bazi Regulome ne postoje podaci o njenom funkcionalnom značaju. Varijanta rs6318 je nesinonimna kodirajuća varijanta u egzonu 4 gena *HTR2C*. Dovodi do zamene cisteina serinom na poziciji 23 (Cys23Ser) u proteinu HTR2C, i prema programima SIFT i PolyPhen izgleda da ne utiče na funkcionalnost proteina.

Tabela 4.10. Učestalosti genotipova varijanti rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI* i rs6318 gena *HTR2C* u grupama psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili i njihova asocijacija sa pokušajem samoubistva.

	SNV (aleli, gen)		
	rs9983925 (<u>T</u> ^b /C, <i>ADARBI</i>)	rs4819035 (<u>G</u> /T, <i>ADARBI</i>)	rs6318 ^a (<u>C</u> /G, <i>HTR2C</i>)
Frekvencije genotipova	TT/CT/CC	GG/TG/TT	CC/GC/GG
Bolesnici sa SA	0.097/0.424/0.479	0.079/0.345/0.576	0.115/0.152/0.733
Bolesnici bez SA	0.165/0.447/0.388	0.048/0.271/0.681	0.064/0.096/0.840
Genetički modeli			
Opšti (2df)	TT vs. CT vs. CC	GG vs. TG vs. TT	CC vs. GC vs. GG
t	4.749	4.138	4.98
p ^c	0.093	0.126	0.083
Aditivni (1df)	TT>CT>CC	GG>TG>TT	CC>GC>GG
t	-2.145	2.032	2.216
p ^c	0.032^e	0.042	0.027
OR (95% CI)	0.710 (0.520-0.971)	1.437 (1.013-2.038)	1.634 (1.058-2.522)
p ^d	0.031	0.044	0.025
Dominantni (1df)	TT+CT vs. CC	GG+TG vs. TT	-
t	-1.713	1.918	-
p ^c	0.087	0.055	-
OR (95% CI)	0.688 (0.449-1.055)	1.536 (0.991-2.381)	-
Recesivni (1df)	TT vs. CT+CC	GG vs. TG+TT	-
t	-1.852	1.296	-
p ^c	0.064	0.195	-
OR (95% CI)	0.540 (0.281-1.036)	1.796 (0.741-4.352)	-

SNV: tačkasta varijanta; SA: pokušaj samoubistva; df: broj stepeni slobode; t: statistički parametar logističke regresije; OR: odnos verovatnoća; CI: interval poverenja.

^aMuškarci, hemizigoti za X-vezanu varijantu rs6318, kodirani su kao homozigoti;

^bRedi alel je podvučen;

^cLogistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama;

^dTest sa milion permutacija;

^eStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

4.7. Asocijacija hablobloka 2 *ADARBI* regiona od interesa sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Prema strukturi neravnotežene vezanosti *ADARBI* regiona od interesa za belu populaciju, varijanta rs4819035 gena *ADARBI*, za koju je pokazano da je asocirana sa pokušajem samoubistva u ispitivanoj grupi bolesnika, mapira u haplobloku 2 (Slika 4.2). Iz navedenog razloga dalje je testirana asocijacija ovog haplobloka sa pokušajem samoubistva. Haploblok 2 nalazi se u 3' UTR-u i uključuje još dve tag varijante – rs9637192 i rs2253763. U haplobloku 2 identifikovana su četiri haplotipa rs9637192-rs2253763-rs4819035 sa učestalošću većom od 5%: CCG, TTT, TCT i CCT. Ukupan skor distribucije ovih haplotipova se statistički značajno razlikuje između psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili (P=0.014, Pirsonov χ^2 -test; P=0.023, logistička regresija) (Tabela 4.11).

Tabela 4.11. Učestalosti haplotipova haplobloka 2 (rs9637192-rs2253763-rs4819035) u *ADARBI* regionu od interesa u grupama psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo i onih koji to nikada nisu uradili i njihova asocijacija sa pokušajem samoubistva.

Haplotipovi haplobloka 2	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	χ^2	df	P ^a	t	P ^b	OR	P ^c
Ukupni skor	-	-	10.65	3	0.014^d	9.52	0.023	-	0.021
CCG	0.257	0.189	4.603	1	0.032	3.73	0.053	1.41	0.054
TTT	0.388	0.342	1.55	1	0.213	1.23	0.267	1.2	0.267
TCT	0.111	0.170	4.926	1	0.026	4.58	0.032	0.605	0.031
CCT	0.244	0.299	2.556	1	0.110	2.91	0.088	0.745	0.091

SA: pokušaj samoubistva; χ^2 : statistički parametar Pirsonovog χ^2 -testa; df: broj stepeni slobode; t: statistički parametar logističke regresije; OR: odnos verovatnoća.

^aPirsonov χ^2 -test;

^bLogistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama;

^cTest sa milion permutacija;

^dStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Rezultati dobijeni poređenjem učestalosti svakog haplotipa pojedinačno sa učestalošću svih ostalih haplotipova bili su konzistentni sa rezultatom dobijenim za asocijaciju varijante rs4819035 sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika u smislu da njen ređi alel G povećava rizik za pokušaj samoubistva (Tabela 4.11). Haplotip CCG bio je statistički značajno asociran sa pokušajem samoubistva na osnovu rezultata Pirsonovog χ^2 -testa ($P=0.032$). Testiranje logističkom regresijom poravnom po psihijatrijskim dijagnozama pokazalo je da ovaj haplotip povećava rizik za pokušaj samoubistva, ali sa marginalnom značajnošću ($P=0.053$, $OR=1.41$). Pomoću Pirsonovog χ^2 -testa pokazano je da je haplotip TCT, takođe, statistički značajno asociran sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika ($P=0.026$), dok je testiranjem logističkom regresijom poravnom po psihijatrijskim dijagnozama, takođe, pokazano da smanjuje rizik za pokušaj samoubistva ($P=0.032$, $OR=0.605$). Sve utvrđene asocijacije haplotipova haplobloka 2 *ADARBI* regiona od interesa potvrđene su testom sa milion permutacija.

4.8. Udruženi efekat gena *HTR2C*, gena *ADARBI*, stresnih životnih događaja i psihijatrijskih dijagnoza na rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Pojedinačni i interaktivni efekti ispitivanih stresnih životnih događaja i značajno asociranih varijanti gena *ADARBI* (rs9983925 i rs4819035) i *HTR2C* (rs6318) ispitivani su primenom generalizovanih linearnih modela i selekcije unazad, uzimajući u obzir starost, pol i psihijatrijsku dijagnozu bolesnika. Prema izvedenom najbolje fitovanom minimalnom modelu, identifikovane su četiri varijable koje su svoj efekat na pokušaj samoubistva ostvarivale nezavisno, dok su tri varijable svoj efekat ostvarivale kroz dvostruke interakcije (Tabela 4.12). Kao faktori sa nezavisnim efektom identifikovani su: varijanta rs6318 gena *HTR2C* ($P=0.010$), varijanta rs9983925 gena *ADARBI* ($P=0.033$), akutni stresni životni događaji ($P=0.003$) i emocionalno zlostavljane tokom detinjstva ($P=0.04$). Na ovaj način potvrđen je direktan efekat dve od tri značajno asocirane genetičke varijante iz prethodnih analiza, prema aditivnom modelu nasleđivanja, dok je na osnovu procena pozitivnih efekata (eng. *positive effects' estimators*) pokazano da se rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika povećava sa porastom skora ETI-SR za emocionalno zlostavljanje, kao i skora LTE-Q za akutne stresne događaje (podaci nisu prikazani). Kao faktori koji svoj efekat ispoljavaju kroz interakcije identifikovane su psihijatrijska dijagnoza i dva domena stresnih događaja iz detinjstva – opšte traume i emocionalno zlostavljanje. Utvrđeno je da su efekti psihijatrijske dijagnoze i emocionalnog zlostavljanja na predispoziciju za pokušaj samoubistva modifikovani opštim traumama ($P=0.001$ i $P=0.018$, redom). Bolesnici sa dijagnozom depresivnog poremećaja i bipolarnog afektivnog poremećaja imali su veći rizik za pokušaj samoubistva ukoliko su imali veći skor ETI-SR za opšte traume, dok su bolesnici sa shizofrenijom koji su pokušali samoubistvo i oni koji nisu, imali približno iste skorove ETI-SR za opšte traume, i zanimljivo, veće u odnosu na prethodno dve pomenute grupe bolesnika (Slika 4.7a). Dalje, bolesnici sa niskim (0-2) i visokim (5) skorom ETI-SR za emocionalno zlostavljanje imali su veći rizik za pokušaj samoubistva ukoliko su imali i veći ETI-SR skor za opšte traume. Suprotno, bolesnici sa srednjim vrednostima (3 i 4) skora ETI-SR za emocionalno zlostavljanje koji su pokušali samoubistvo imali su niži ili

jednak skor ETI-SR za opšte traume u odnosu na bolesnike koji nisu pokušali samoubistvo (Slika 4.7b). Pored navedenog, prema opisanom najbolje fitovanom minimalnom modelu psihijatrijska dijagnoza identifikovana je kao nezavisni faktori rizika za pokušaj samoubistva sa marginalnom značajnošću ($P=0.055$), dok pol i starost bolesnika, fizičko i seksualno zlostavljanje i sve druge interakcije između ispitivanih varijabli nisu identifikovane kao faktori rizika.

Tabela 4.12. Najbolje fitovani minimalni model faktora rizika sa nezavisnim i interaktivnim efektima na pokušaj samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika dobijen primenom generalizovanih linearnih modela i selekcije unazad. Početni model uključio je sledeće varijable: genotipove varijanti rs9983925 i rs4819035 gena *ADAR1* i rs6318 gena *HTR2C*, prema aditivnom modelu nasleđivanja, opšte traume, fizičko, emocionalno i seksualno zlostavljanje, akutne stresne događaje, psihijatrijske dijagnoze, pol i starost bolesnika, kao i interakcije navedenih faktora. Broj analiziranih psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo iznosio je 162, a broj onih koji nisu pokušali samoubistvo iznosio je 185.

	df	Devijansa	Rezidualni df	Rezidualna devijansa	P ^a
Početni model			347	480.77	
rs9983925 (ad)	1	4.531	346	476.24	0.033^b
Psihijatrijske dijagnoze	2	5.785	344	470.46	0.055
Emocionalno zlostavljanje	1	4.212	343	466.25	0.040
Akutni stresni životni događaji	1	8.957	342	457.29	0.003
rs6318 (ad)	1	6.648	341	450.64	0.010
‘Emocionalno zlostavljanje x opšte traume’	1	5.609	340	445.03	0.018
‘Psihijatrijske dijagnoze x opšte traume’	2	13.454	338	431.58	0.001

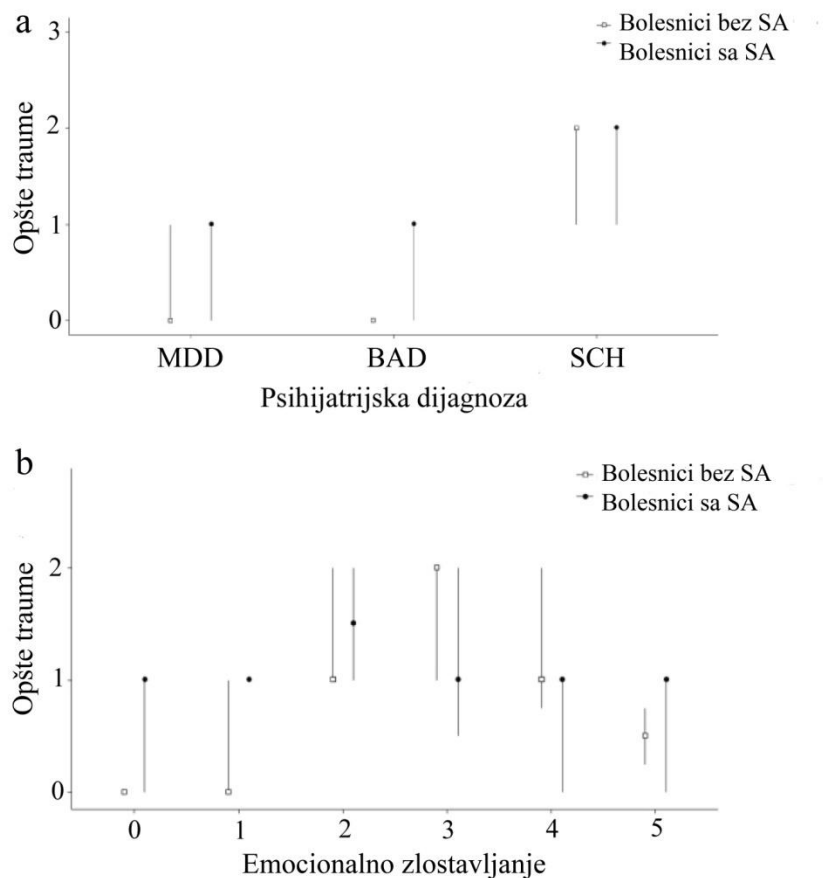
df: broj stepeni slobode; ad: aditivan model.

^aPirsonov χ^2 -test;

^bStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Udruženi efekat svih faktora rizika identifikovanih najbolje fitovanim minimalnim modelom objasnio je 10.23% ukupne varijanse pokušaja samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika. Od toga, genetički faktori objasnili su 2.32% (rs9983925 0.94% i rs6318 1.38%), nezavisni sredinski faktori 2.74% (akutni stresni životni događaji 1.86% i emocionalno zlostavljanje 0.88%), dok su psihijatrijske dijagnoze objasnile 1.20% navedene varijanse. Udruženi efekti sredinskih faktora i psihijatrijskih dijagnoza objasnili

su 3.97% ukupne varijanse ('psihijatrijske dijagnoze x opšte traume' 2.80% i 'emocionalno zlostavljanje x opšte traume' 1.17%). Ukupna varijansa u pokušaju samoubistva kojoj doprinose stresni događaji iz detinjstva, pojediničano ili kroz interakcije sa drugim faktorima, iznosila je 6.05% u testiranom uzorku.



Slika 4.7. Zavisnost efekata psihijatrijskih dijagnoza i emocionalnog zlostavljanja tokom detinjstva od opštih trauma tokom detinjstva na predispoziciju za pokušaj samoubistva (SA) u ispitivanom uzorku psihijatrijskih bolesnika. (a) Bolesnici sa dijagnozom depresivnog poremećaja (MDD) i bipolarnog afektivnog poremećaja (BAD) imali su veći rizik za pokušaj samoubistva ukoliko su imali veći skor ETI-SR za opšte traume, dok to nije bio slučaj kod bolesnika sa dijagnozom shizofrenije (SCH). (b) Bolesnici sa niskim i visokim skorom ETI-SR za emocionalno zlostavljanje imali su veći rizik za pokušaj samoubistva ukoliko su imali veći skor ETI-SR za opšte traume. Kružići i kvadratići predstavljaju medijane, dok linije predstavljaju kvartile. ETI-SR: *Early Trauma Inventory–Self Report*.

4.9. Asocijacija interakcije rs4290270 gena *TPH2* i opštih trauma iz detinjstva sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Testiranje asocijacije alela nije pokazalo da su varijante rs7305115 i rs4290270 gena *TPH2* direktno asociirane sa pokušajem samoubistva (Tabela 4.9). Dalje se pristupilo testiranju interakcija G x E. U ovim testiranjima stresni životni događaji razmatrani su kao kategorijske varijable, i kao što je već prikazano, seksualno zlostavljanje tokom detinjstva i akutni stresni događaji nisu mogli biti testirani (Tabela 4.2).

Rezultati testiranja G x E pokazali su da je interakcija varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema dominantnom modelu nasleđivanja, i opštih trauma iz detinjstva statistički značajno asociirana sa pokušajem samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika ($P=0.013$, logistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama) (Tabela 4.13). Učestalost pokušaja samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika, bez prijavljene istorije o doživljenim opštim traumama tokom detinjstva i onih koji su u istom periodu doživeli barem jednu opštu traumu, u zavisnosti od genotipova varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema dominantnom modelu nasleđivanja, prikazana je na Slici 4.8. Osobe koje su bile homozigoti TT za varijantu rs4290270 i koje su prijavile barem jednu opštu traumu tokom detinjstva, imale su povećan rizik za pokušaj samoubistva u poređenju sa homozigotima TT koji nisu zlostavljani na ovaj način ($OR=3.33$, $95\% CI=1.54-7.18$). Sa druge strane, nosioci alela A za varijantu rs4290270 imali su sličan rizik za pokušaj samoubistva bez obzira na prijavljenu istoriju o doživljenim opštim traumama tokom detinjstva ($OR=1.05$, $95\% CI=0.61-1.82$).

Rezultati testiranja interakcija G x E za rs4290270 gena *TPH2* prema drugim modelima nasleđivanja prikazani su u Prilogu 8.2, dok rezultati testiranja G x E interakcija za varijantu rs7305115 prema svim testiranim genetičkim modelima ($P>0.05$) nisu prikazani.

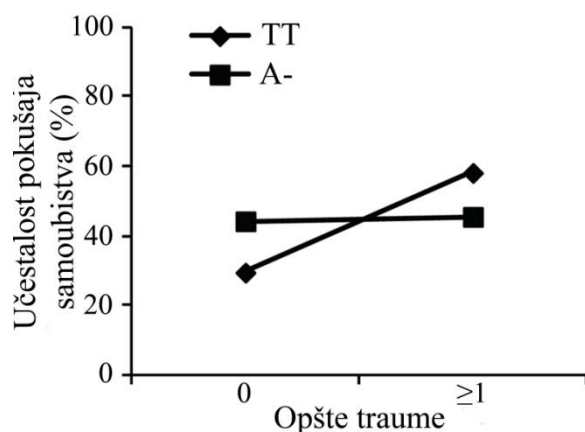
Tabela 4.13. Asocijacije interakcija varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema dominantnom modelu nasleđivanja, i tri domena stresnih događaja iz detinjstva (opštih trauma, fizičkog i emocionalnog zlostavljanja) sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika.

Varijabla	Ukupan uzorak	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	P ^a
'rs4290270 x ETI-SR skor za opšte traume'				
TT x 0	44 (12.6)	13 (8.0)	31 (16.7)	0.013^b
A- x 0	88 (25.3)	39 (24.1)	49 (26.3)	
TT x ≥1	91 (26.2)	53 (32.7)	38 (20.4)	
A- x ≥1	125 (35.9)	57 (35.2)	68 (36.6)	
'rs4290270 x ETI-SR skor za fizičko zlostavljenje'				
TT x 0	66 (19.0)	29 (17.9)	37 (19.9)	0.330
A- x 0	112 (32.2)	51 (31.5)	61 (32.8)	
TT x ≥1	69 (19.8)	37 (22.8)	32 (17.2)	
A- x ≥1	101 (29.0)	45 (27.8)	56 (30.1)	
'rs4290270 x ETI-SR skor za emocionalno zlostavljanje'				
TT x 0	57 (16.4)	28 (17.3)	29 (15.6)	0.900
A- x 0	95 (27.3)	42 (25.9)	53 (28.5)	
TT x ≥1	78 (22.4)	38 (23.5)	40 (21.5)	
A- x ≥1	118 (33.9)	54 (33.3)	64 (34.4)	

SA: pokušaj samoubistva; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory–Self Report*.

^aLogistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama;

^bStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.



Slika 4.8. Učestalost pokušaja samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika koji nisu doživeli opšte traume do 18. godine života i onih koji su u istom periodu doživeli barem jednu predstavljena u zavisnosti od genotipova varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema dominantnom modelu nasleđivanja (A- i TT). Efekat opštih trauma na rizik za pokušaj samoubistva bio je uočen kod psihijatrijskih bolesnika koji su bili homozigoti TT. Opšte traume procenjene su na osnovu upitnika *Early Trauma Inventory–Self Report*.

4.10. Udruženi efekat gena *TPH2*, gena *ADARBI* i opštih trauma iz detinjstva na rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Imajući u vidu da je rs4290270 gena *TPH2* potencijalno funkcionalna varijanta povezana sa alternativnim splajsovanjem i editovanjem transkripata *TPH2*, i da je prethodno pokazano da modifikuje efekat opštih trauma iz detinjstva na pokušaj samoubistva ($P=0.013$, Tabela 4.13), dalje su ispitivani pojedinačni efekti i dvostruki i trostruki interaktivni efekti ove varijante, opštih trauma iz detinjstva i statistički značajno asociranih varijanti rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI* ($P=0.028$ za obe varijante, Tabela 4.9) na predispoziciju za pokušaj samoubistva. Primenjeni su generalizovani linearni modeli i selekcija unazad, a početni model je pored prethodno navedenih faktora rizika i njihovih interakcija, uključio i sve dvostruke i trostruke interakcije konfaundera (psihijatrijskih dijagnoza, pola i starosti bolesnika) sa ispitivanim genetičkim i sredinskim faktorima, kako bi se na odgovarajući način ispitao njihov efekat kao skrivenih faktora na uočene interakcije ispitivanih faktora (Keller, 2014).

Prema izvedenom najbolje fitovanom minimalnom modelu, tri varijable identifikovane su kao faktori rizika za pokušaj samoubistva: opšte traume ($P=0.001$), dvostruka interakcija između opštih trauma i rs4290270 gena *TPH2*, prema dominantnom modelu nasleđivanja ($P=0.009$), i trostruka interakcija opštih trauma, rs4290270 gena *TPH2*, prema dominantnom modelu nasleđivanja, i rs4819035 gena *ADARBI*, prema aditivnom modelu nasleđivanja ($P=0.001$) (Tabela 4.14). Ovaj model je, dakle, potvrdio asocijaciju opštih trauma tokom detinjstva kao nezavisnog faktora rizika za pokušaj samoubistva i da je njihov efekat modifikovan varijantom rs4290270 gena *TPH2*, ali je dodatno ukazao da navedena dvostruka interakcija može biti modifikovana varijantom rs4819035 gena *ADARBI*. Učestalost pokušaja samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika, bez prijavljene istorije opštih trauma tokom detinjstva i onih koji su u istom periodu doživeli barem jednu opštu traumu, u zavisnosti od genotipova varijanti rs4290270 gena *TPH2* i rs4819035 gena *ADARBI*, prikazana je na Slici 4.9. Parnim poređenjem populacionih srednjih vrednosti najmanjih kvadrata praćenim *Tukey*-evim poravnanjem

vrednosti P pokazano je da je efekat opštih trauma na rizik za pokušaj samoubistva kod nosilaca genotipa TT varijante rs4290270 gena *TPH2* uočen ukoliko su one istovremeno nosioci genotipa TT (P=0.001) ili retkog genotipa GG (P=0.046) varijante rs4819035 gena *ADARBI*, dok nije uočen kod nosioca genotipa GT (P=0.150). Sa druge strane, varijanta rs4819035 gena *ADARBI* nije uticala na efekat opštih trauma kod nosilaca alela A varijante rs4290270 gena *TPH2* (P>0.05). Efekta opisane trostruke interakcije na rizik za pokušaj samoubistva trebalo bi donekle uzeti sa rezervom, usled malog broja bolesnika sa retkim alelom G varijante rs4819035 gena *ADARBI* (Prilog 8.3).

Tabela 4.14. Najbolje fitovani minimalni model značajnih faktora rizika sa nezavisnim efektima i dvostrukim i trostrukim interaktivnim efektima na pokušaj samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika dobijen primenom generalizovanih linearnih modela i selekcije unazad. Početni model uključio je sledeće varijable: opšte traume, genotipove varijanti rs4290270 gena *TPH2* i rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI*, i sve dvostruke i trostruke interakcije ovih varijabli. Početni model uključio je kao konfaundere: psihijatrijske dijagnoze, pol i starost bolesnika, i sve njihove dvostruke i trostruke interakcije sa ispitivanim faktorima. Broj analiziranih psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo iznosio je 162, a broj onih koji nisu pokušali samoubistvo iznosio je 186.

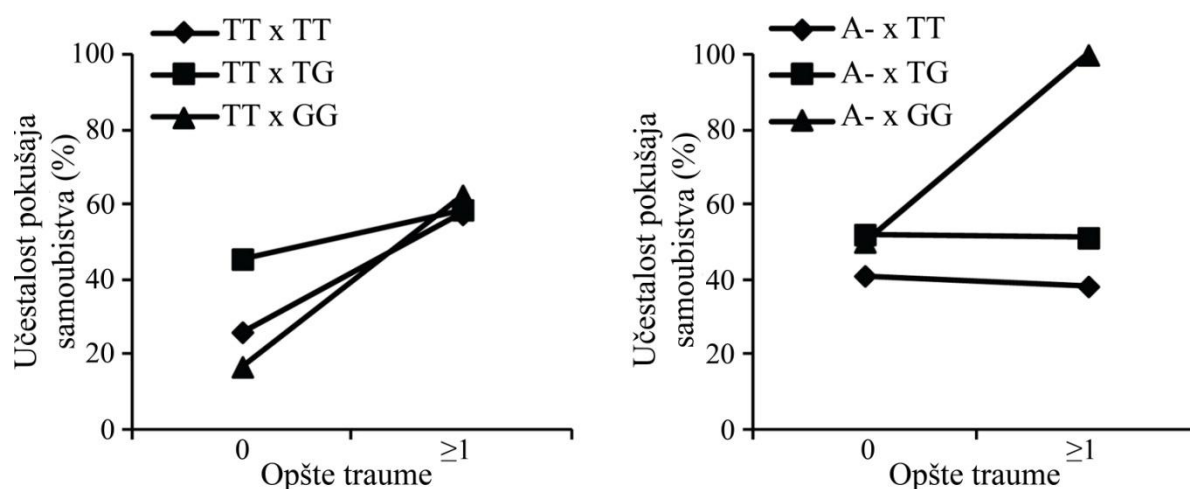
	df	Devijansa	Rezidualni df	Rezidualna devijansa	P ^a
Početni model			347	480.774	
Psihijatrijske dijagnoze	2	4.980	345	475.794	0.083
Starost bolesnika	1	1.483	344	474.311	0.223
rs4290270 (dom)	1	0.512	343	473.799	0.474
rs4819035 (ad)	2	3.880	341	469.919	0.144
Opšte traume	1	10.687	340	459.232	0.001^b
‘Opšte traume x psihijatrijske dijagnoze’	2	11.694	338	447.538	0.003
‘Opšte traume x rs4290270 (dom)’	1	6.808	337	440.730	0.009
‘Starost bolesnika x rs4819035 (ad)’	2	9.102	335	431.628	0.011
‘Opšte traume x rs4290270 (dom) x rs4819035 (ad)’	6	22.006	329	409.622	0.001

df: broj stepeni slobode; dom: dominantan model; ad: aditivan model.

^aPirsonov χ^2 -test;

^bStatistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Pored navedenog, prema opisanom najbolje fitovanom minimalnom modelu, psihijatrijska dijagnoza, ispitivana kao konfauder, pokazala je značajnu interakciju sa opštim traumama ($P=0.003$), dok je starost bolesnika, takođe ispitivana kao konfauder, pokazala interakciju sa varijantom rs4819035 gena *ADARBI* ($P=0.011$). U skladu sa prethodnim najbolje fitovanim minimalnim modelom, bolesnici sa depresivnim poremećajem i bipolarnim afektivnim poremećajem imali su povećan rizik za pokušaj samoubistva ukoliko su doživeli opšte traume tokom detinjstva u odnosu na one koji ih nisu doživeli. Kod bolesnika sa shizofrenijom rizik za pokušaj samoubistva nije zavisio od opštih trauma. Sa druge strane, identifikovana interakcija između starosti bolesnika i varijante rs4819035 gena *ADARBI*, verovatno je vezana za distribuciju veoma retkog genotipa GG, koji je bio vrlo redak kod starijih bolesnika.



Slika 4.9. Učestalost pokušaja samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika koji nisu prijavili da su doživeli opšte traume do 18. godine života i onih koji su u istom periodu doživeli barem jednu predstavljena u zavisnosti od genotipova varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema dominantnom modelu nasleđivanja (A- i TT), i genotipova varijante rs4819035 gena *ADARBI*, prema aditivnom modelu nasleđivanja (TT, TG i GG). Efekat opštih trauma na rizik za pokušaj samoubistva uočen je kod bolesnika koji su bili homozigoti TT za varijantu rs4290270 gena *TPH2* i homozigoti TT za varijantu rs4819035 gena *ADARBI*. Kod nosilaca alela A za varijantu rs4290270, varijanta rs4819035 nije imala uticaj na interakciju rs4290270 x opšte traume. Broj osoba sa genotipom GG za varijantu rs4819035 bio je nedovoljan za interpretaciju eventualnih interakcija koje se uočavaju na slici. Opšte traume procenjene su na osnovu upitnika *Early Trauma Inventory–Self Report*.

Prema opisanom najbolje fitovanom minimalnom modelu, identifikovani pojedinačni i interaktivni efekti zajedno su objasnili 14.8% ukupne varijanse pokušaja samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika. Efekat opštih trauma, pojedinačno ili kroz interakcije sa drugim faktorima, objasnio je čak 10.6% ukupne varijanse. Nezavisni efekat opštih trauma objasnio je 2.2% ukupne varijanse pokušaja samoubistva, njihov interaktivni efekat sa psihijatrijskim dijagnozama 2.4%, dok je interaktivni efekat sa ispitivanim genetičkim faktorima objasnio 6% (1.4% kroz dvostruku i 4.6% kroz trostruku interakciju).

5. Diskusija

Samoubilačko ponašanje je složeni fenotipski kontinuum čija se etiologija vezuje za brojne genetičke i sredinske faktore rizika i njihove međusobne interakcije. Iako predstavlja globalni zdravstveni problem, efikasne mere tretmana i prevencije samoubilačkog ponašanja ne postoje. Pokušaj samoubistva je povezan sa psihijatrijskim oboljenjima, stresnim životnim događajima i smanjenom funkcijom serotoninskog neurotransmiterskog sistema. Editovanje RNK deaminacijom adenozina u inozin, katalizovano enzimima ADAR i ADARB1, doprinosi održavanju optimalne serotoninske neurotransmisije kroz regulisanu ekspresiju funkcionalno različitih izoformi enzima TPH2, koji katalizuje sintezu serotonina u mozgu, i postsinaptičkog serotoninskog receptora HTR2C. U ovoj studiji ispitivane su tačkaste varijante u genima *TPH2*, *HTR2C*, *ADAR* i *ADARB1*, domeni stresnih životnih događaja tokom detinjstva i akutni stresni događaji, kao pojedinačni i interaktivni faktori rizika za pokušaj samoubistva koji bi mogli pomoći u pravovremenoj identifikaciji onih psihijatrijskih bolesnika koji imaju predispoziciju za ovaj oblik ponašanja. Genetički deteminisana povezanost editovanja RNK sa pokušajem samoubistva prvi put je ispitivana u ovoj studiji.

Rezultati ove studije vezani za testiranje asocijacije stresnih životnih događaja i pokušaja samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika predstavljaju samo još jedan u nizu dokaza koji ukazuju da su sredinski faktori veoma značajni u etiologiji samoubilačkog ponašanja (Mann, 2003; Turecki et al., 2012). Analizom stresnih događaja iz detinjstva pokazano je da opšte traume i emocionalno zlostavljanje predstavljaju nezavisne faktore rizika za pokušaj samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih studija koje ukazuju na veliki značaj stresnih događaja iz detinjstva u povećanju rizika za pokušaja samoubistva kasnije tokom života (Dube et al., 2001; Fergusson et al., 2000). Treba istaći da je upitnik ETI-SR, korišćen u ovoj studiji za procenu stresnih događaja iz detinjstva, jedini instrument koji procenjuje

domen opštih trauma, dok su prethodno navedene studije ispitivale samo nekoliko događaja iz domena opštih trauma (Dube et al., 2001; Fergusson et al., 2000).

Fizičko i seksualno zlostavljanje tokom detinjstva nisu detektovani kao nezavisni faktori rizika za pokušaj samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika, suprotno rezultatima prethodnih studija koje ove domene zlostavljanja tokom detinjstva ističu kao najznačajnije faktore rizika za pokušaj samoubistva (Brezo et al., 2008; Brodsky and Stanley, 2008). Tako seksualno zlostavljanje može objasniti čak 20% varijanse rizika za samoubilačko ponašanje (Brent and Melhem, 2008). Sa druge strane, rezultati ove studije vezani za fizičko i seksualno zlostavljanje tokom detinjstva u skladu su sa pretpostavkom da bi ovi domeni zlostavljanja pre mogli predstavljati opšte faktore rizika za psihijatrijske dijagnoze, nego specifične faktore rizika za pokušaj samoubistva (Klonsky and Moyer, 2008). Imajući u vidu da je samo oko 3% ispitanika ove studije prijavilo da je doživelo seksualno zlostavljanje tokom detinjstva, dobijeni rezultat treba prihvatiti sa rezervom. On bi delom mogao biti posledica kulturološke stigme.

Akutni stresni događaji predstavljaju faktore rizika koji su najkonzistentnije povezani sa samoubilačkim ponašanjem, što potvrđuju i rezultati ove studije. Upitnik LTE-Q, korišćen u ovoj studiji, sadrži pitanja vezana za negativne akutne stresne događaje, tako da su dobijeni rezultati u skladu sa studijom Liu i Millera (2014) koja je detektovala značajnu asocijaciju samo negativnih akutnih stresnih događaja i samoubilačkog ponašanja, dok asocijacija sa pozitivnim stresnim događajima u toj studiji nije utvrđena.

Među ispitanicima ove studije skoro 98% bolesnika koji nisu pokušali samoubistvo prijavilo je da je doživelo barem jedan akutni stresni događaj tokom poslednjih 12 meseci života. Sa druge strane, skoro 50% bolesnika koji su pokušali samoubistvo prijavilo je da je doživelo barem tri akutna stresna događaja tokom poslednjih 12 meseci, naspram nešto više od 30% bolesnika koji nisu pokušali samoubistvo. Može se pretpostaviti da je upravo kumulativni efekat većeg broja akutnih stresnih događaja neposredni povod za pokušaj samoubistva. Ovakvo shvatanje je u skladu sa modelom etiologije samoubilačkog ponašanja 'predispozicija-stres', po kome različiti psihosocijalni stresori mogu najpre

dovesti do akutnog pogoršanja postojećeg psihijatrijskog oboljenja, što bi za posledicu imalo pojavu samoubilačkih ideacija, a u kombinaciji sa crtama ličnosti kao što su beznadežnost ili pesimizam i agresivnost ili impulsivnost mogli bi dovesti i do pokušaja samoubistva (Mann et al., 1999). Pri tome, kod osoba sa istorijom pokušaja samoubistva, sve manji broj stresora-okidača je dovoljan za svaki sledeći pokušaj ili izvršeno samoubistvo, najverovatnije usled povećanja senzitivnosti na stres (Post, 1992). Takođe, efekat stresnih životnih događaja, bilo tokom detinjstva ili akutnih, vezan je i za postojanje individualnih razlika u odgovoru na stres koje su jednim delom genetički uslovljene.

U ovoj studiji kao nezavisni genetički faktori rizika za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika detektovane su česte varijante i haplotipovi gena *ADARBI* i česta varijanta gena *HTR2C*, što potvrđuje pretpostavku da genetički faktori imaju važnu ulogu u definisanju individualne predispozicije za samoubilačko ponašanje (Mann, 2003; Turecki et al., 2012).

Analizom pojedinačnih lokusa utvrđeno je da su dve varijante gena *ADARBI*, rs9983925 i rs4819035, nezavisno asocirane sa pokušajem samoubistva u ispitivanoj grupi psihijatrijskih bolesnika. Ređi alel T varijante rs9983925, iz introna 8, smanjuje rizik, dok ređi alel G varijante rs4819035, iz 3' UTR-a, povećava rizik za pokušaj samoubistva. Efekat obe varijante je aditivan, što implicira zavisnost od broja, odnosno doze rizičnog alela date varijante. Pored pojedinačnih tačkastih varijanti, haploblok rs9637192-rs2253763-rs4819035 gena *ADARBI* identifikovan je kao značajan genetički faktor povezan sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih bolesnika. Uočeno je da haplotip CCG povećava, dok haplotip TCT smanjuje rizik za pokušaj samoubistva, što je u saglasnosti sa rezultatima analize varijante rs4819035 kao nezavisnog faktora rizika. Haploblok rs9637192-rs2253763-rs4819035 nalazi se na 3' kraju gena *ADARBI*, tačnije obuhvata region od introna 8 do poslednjeg egzona sa 3' UTR-om.

Identifikovani faktori rizika gena *ADARBI* preklapaju se sa 3' regulatornim regionima koji kontrolišu složeno alternativno splajsovanje na 3' kraju transkripta *ADARBI* (Kawahara et al., 2005). Događaji alternativnog splajsovanja u ovom regionu regulišu

stvaranje različitih varijanti iRNK koje odlikuje različit stepen efikasnosti translacije i različita stabilnost. Izgleda da je za normalnu fiziološku aktivnost proteina *ADARBI* neophodno da postoji homeostaza u nivou ekspresije različitih varijanti iRNK *ADARBI*. Na primer, kod transgenog miša koji ima izmenjenu ekspresiju *Adarb1* uočena je pojava endogene depresije i anksioznosti (Singh et al., 2009), kao i izmenjeno editovanje transkripata *HTR2C* koje ne zavisi od nivoa prisutnog serotonina (Singh et al., 2011).

Na osnovu prethodno navedenog, moglo bi se pretpostaviti da bi varijante i haploblok gena *ADARBI*, identifikovani u ovoj studiji kao genetički faktori rizika za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika, mogli imati regulatorne funkcije koje utiču na promene u nivou ekspresije *ADARBI*. Ako se prihvati mišljenje da većina *cis* eQTL-ova nije tkivno specifična (van Nas et al., 2010), navedenu pretpostavku dodatno potkrepljuje podatak da je varijanta rs4819035 identifikovana kao *cis* eQTL koja je povezana sa promenama u ekspresiji iRNK *ADARBI* u jetri (Schadt et al., 2008).

Da genetičke razlike mogu doprineti procesu editovanja A-u-I ukazuje postojanje veoma finih razlika u obrascu editovanja transkripata *HTR2C* kod osam različitih sojeva miševa koje se upravo vezuju za razlike u genetičkoj osnovi između sojeva (Du et al., 2006). Genetički determinisane promene u ekspresiji *ADARBI* mogle bi doprineti i objašnjenju uočene izmenjene ekspresije varijanti iRNK *ADARBI* (Lyddon et al., 2013; Silberberg et al., 2012), izmenjenog editovanja transkripata *HTR2C* kod psihijatrijskih bolesnika koji su izvršili samoubistvo (Gurevich et al., 2002; Dracheva et al., 2008; Iwamoto et al., 2009; Lyddon et al., 2013), kao i izmenjenog editovanja transkripata *TPH2* kod osoba koje su izvršile samoubistvo (Grohmann et al., 2010). Ipak, ovu pretpostavku moguće je testirati samo na *postmortem* uzorcima mozga.

Ispitivanje asocijacije varijanti gena *ADAR* i pokušaja samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika ukazuje da gen *ADAR* verovatno nije povezan sa ovim fenotipom, imajući u vidu da je odabir tag varijanti bio takav da je omogućio ispitivanje kompletnog regiona genoma u kome mapira ovaj gen. Smatra se da je *ADAR* pre svega odgovoran za hipereditovanje invertovanih sekvenci *Alu* i razlikovanje sopstvenih ćelijskih dvolančanih RNK od

virusnih, dok je ADARB1 predominantno uključen u mesto-specifično editovanje (Mannion et al., 2014; Wahlstedt and Öhman, 2011). Međutim, treba napomenuti da postoji komunikacija između proteina ADAR i ADARB1, jer relativni nivo ekspresije jednog enzima može uticati na funkciju drugog (Werry et al., 2008).

Osim efekta na modulisanje funkcije HTR2C i TPH2, editovanje A-u-I može imati mnogo širi značaj u etiologiji samoubilačkog ponašanja i psihijatrijskih poremećaja uopšte. Naime, ovaj proces je najzastupljeniji u centralnom nervnom sistemu i odgovoran je za prevođenje sredinskih signala u fino podešavanje funkcionalnih svojstava proteina koji su ključni za neurotransmisiju, plastičnost i razvoj mozga (Hoopengardner et al., 2003; Rosenthal and Seeburg, 2012; Tariq and Jantsch, 2012). Kao glavni posrednik između genoma i sredinskih signala, smatra se da je editovanje A-u-I moglo biti neophodno za razvoj složenih osobina čoveka poput ponašanja specifičnog za kontekst, dugotrajnog pamćenja i drugih sofisticiranih kognitivnih kapaciteta (Mattick and Mehler, 2008).

Izučavanje procesa editovanja A-u-I u samoubilačkom ponašanju i psihijatrijskim poremećajima može biti od značaja i za primenu i razvoj efikasnijih terapija. Stepeditovanja transkripata *HTR2C* dinamično se menja u odgovoru na promene nivoa serotonina u sinaptičkoj pukotini koje su posledica ne samo izmenjenih fizioloških uslova, već i delovanja farmakoloških supstanci (Werry et al., 2008). Zanimljivo je da je primena antidepressiva fluoksetina, inhibitora selektivnog preuzimanja serotonina, poništavala efekat akutnog i hroničnog stresa na obrazac editovanja transkripata *Htr2C* kod soja miša BALB/c (Englander et al., 2005), i to na način koji je bio suprotan opisanom izmenjenom obrascu editovanja transkripata *HTR2C* kod depresivnih žrtava samoubistva (Gurevich et al., 2002). Smatra se da bi ispitivanje neželjenih efekata terapeutika, među koje spadaju i samoubilačke ideacije i samoubilačko ponašanje uopšte, moglo biti efikasnije kvantifikacijom promena editovanja RNK određenih transkripata nakon aplikacije terapeutika u *in vitro* modelima ćelija čoveka u odnosu na standardna ispitivanja u kojima se vrši detaljna analiza ponašanja glodara nakon primene terapeutika (van der Laan et al., 2017).

Prema podacima baze podataka, ver 4.1, tekućeg projekta GTEx (eng. *Genotype-Tissue Expression*) (www.gtexportal.org, GTEx Consortium, 2016), koji ispituje korelacije između genotipova tačkastih varijanti, kao *cis* i *trans* eQTL-ova, i nivoa ekspresije transkripata ekspimiranih u 53 vrste tkiva čoveka, varijanta rs4819035 gena *ADARBI* utiče na ekspresiju dve duge nekodirajuće RNK, *LINC00205* i *BX322557.10*. Obe ove RNK mapiraju nizvodno u odnosu na gen *ADARBI* i nalaze se na istom lancu DNK kao i gen *ADARBI*. *LINC00205* i *BX322557.10* ekspimiraju se u bazalnim ganglijama, korteksu i cerebelumu, dok se *LINC00205* ekspimiraju i u hipokampusu, hipotalamusu i hipofizi. Poznato je da su duge nekodirajuće RNK uključene u procese razvića mozga, sinaptičke plastičnosti i razvoja mnogih bolesti (Qureshi and Mehler, 2012), a smatra se da su bile izuzetno važne u evoluciji mozga čoveka, što se posebno odnosi na one koje predstavljaju evolucione novine (Mattick, 2011). Zanimljivo je da *LINC00205* i *BX322557.10* nisu identifikovane u genomu miša. One su prisutne u genomima različitih vrsta majmuna, što bi moglo ukazivati da predstavljaju evolucione novine genoma primata.

Prema predikciji baze podataka LNCipedia, ver 4.0 (<http://www.lncipedia.org>, Volders et al., 2012; 2014), transkript 17 gena *LINC00205* ima vezivna mesta za pet različitih miRNK (hsa-miR-5688, hsa-miR-5582-3p, hsa-miR-495, hsa-miR-4540 i hsa-miR-5481) sa visokim skorom (>80), što predviđene interakcije čini vrlo verovatnim. Prema podacima baze podataka miRDB (<http://http://mirdb.org/miRDB>, Wang, 2016) svaka od navedenih miRNK ima veliki broj ciljnih transkripata, uključujući i transkripte nekih gena serotoninskog sistema. Transkript *HTR2C*, prema ovoj predikciji ima vezivno mesto za hsa-miR-5582-3p, što ukazuje da bi RNK *LINC00205* i iRNK *HTR2C* mogle međusobno kompetirati za vezivanje hsa-miR-5582-3p. S obzirom da su mikroRNK ključni regulatori translacije i stabilnosti iRNK u eukariotskim ćelijama (Fabian et al., 2010), u navedenom scenariju, varijanta rs4819035 gena *ADARBI* mogla bi i posredno, preko regulacije ekspresije duge nekodirajuće RNK *LINC00205*, biti uključena u regulaciju ekspresije *HTR2C*.

U ovoj studiji utvrđena je asocijacija varijante rs6318 (Cys23Ser) sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika iz Srbije. Ređi alel C rs6318 povećava rizik za ispoljavanje ovog fenotipa. Kod bolesnika sa dijagnozama depresivnog poremećaja i bipolarnog afektivnog poremećaja iz devet evropskih zemalja nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti alela varijante rs6318 sa pokušajem samoubistva u odnosu na kontrolni uzorak (Lerer et al., 2001). U grupi psihijatrijskih bolesnika iz Italije i Nemačke sa dijagnozom iz afektivnog spektra, kao i bolesnika iz Nemačke sa dijagnozom iz shizofrenog spektra i graničnih poremećaja ličnosti, takođe nije utvrđena asocijacija rs6318 sa pokušajem samoubistva u odnosu na kontrolnu populaciju (Serretti et al., 2007). Studija genetičke asocijacije u populaciji Kine, koja je, kao i ova studija, ispitivala asocijaciju rs6318 kod psihijatrijskih bolesnika koji su pokušali samoubistvo u odnosu na psihijatrijske bolesnike koji to nikada nisu uradili, takođe je dala negativan rezultat (Zhang et al., 2008). Pored navedenog, u studiji slučajeva i kontrola iz populacije Meksika, varijanta rs6318 nije bila asocirana sa pokušajem samoubistva, iako je utvrđeno da neke druge varijante gena *HTR2C* mogu povećavati ili smanjivati rizik za pokušaj samoubistva u ovoj populaciji (Molina-Guzman et al., 2017).

Jedina asocijacija varijante rs6318 gena *HTR2C* i samoubilačkog ponašanja, osim u ovoj studiji, prijavljena je kod žrtava samoubistva iz slovenačke populacije (Videtic et al., 2009). Populacija Slovenije ima zajedničko, slovensko poreklo sa populacijom Srbije, kao i visoku stopu samoubistva koja se uklapa u „krivu J“, koja povezuje najviše stope samoubistva u Evropi, počevši od Finske na severu, do Slovenije na jugu (Marusic, 2005). Poređenjem uzoraka iz devet evropskih zemalja, uočene su značajne razlike u učestalostima alela varijante rs6318 među populacijama (Lerer et al., 2001), što delom može objasniti zašto je varijanta rs6318 za sada detektovana kao faktor rizika za samoubilačko ponašanje samo u dve južnoslovenske populacije. Sa druge strane, varijanta rs6318 nije pokazala asocijaciju sa izvršenjem samoubistva u populaciji Hrvatske (Stefulj et al., 2004) koja je, takođe, slovenskog porekla. Navedeni rezultati nameću potrebu za dodatnim ispitivanjima ove varijante u drugim slovenskim populacijama, a koja bi uključila različite tipove samoubilačkog ponašanja. Dalju potrebu za ispitivanjem asocijacije ove varijante sa

različitim tipovima samoubilačkog ponašanja nameće i podatak da su njeni različiti aleli povezani sa izvršenjem i pokušajem samoubistva. U populaciji Slovenije učestaliji alel G povezan je sa izvršenjem samoubistva (Videtic et al., 2009). Takođe, imajući u vidu da gen *HTR2C* mapira na hromozomu X, asocijacija je utvrđena kako kod osoba ženskog pola, tako i kod oba pola zajedno (Videtic et al., 2009). Sa druge strane, u ovoj studiji manje učestali alel C povezan je sa pokušajem samoubistva i to samo kada su analizirana oba pola zajedno. Dodatno, u studiji Lerer i saradnika (2001), alel C varijante rs6318 povezan je sa rizikom za razvoj depresivnog poremećaja i bipolarnog afektivnog poremećaja, oboljenjima koja su najčešća psihijatrijska dijagnoza kod osoba sa samoubilačkim ponašanjem (Holma et al., 2014; Kutcher and Chehil, 2011). Navedeno ukazuje da bi ova varijanta mogla biti deo genetičke osnove koji je zajednički za samoubilačko ponašanje i poremećaje raspoloženja, što zaslužuje dalje ispitivanje.

Povezanost gena *HTR2C* sa samoubilačkim ponašanjem bi, pored značaja za etiologiju, mogla biti važna i za potencijalni tretman osoba sa povećanim rizikom za ovaj fenotip. Receptor *HTR2C* ostvaruje inhibitorni uticaj na funkciju dopaminskih neurona (Berg et al., 2008), dok je izoforma receptora Ser23, koja je konstitutivno aktivnija od izoforme Cys23 (Okada et al., 2004), kod zdravih osoba asocirana sa povećanim otpuštanjem dopamina u stresnim uslovima u mezo-akumbalnom putu (Mickey et al., 2012). Iako disfunkcija dopaminskog sistema još uvek nije u potpunosti definisana u samoubilačkom ponašanju (Ryding et al., 2008), receptor *HTR2C* se kao meta za delovanje efikasnijih terapeutika upravo ispituje kod neuropsihijatrijskih poremećaja povezanih sa disfunkcijom dopaminskog sistema (Berg et al., 2008). Takođe, poznato je da receptor *HTR2C* posreduje u efektima antidepresanata (Martin et al., 2014) i atipičnih antipsihotika (Meltzer and Massey, 2011).

Ispitivane sinonimne kodirajuće varijante gena *TPH2*, rs7305115 i rs4290270, koje se međusobno nalaze u visokoj neravnotežnoj vezanosti, nisu identifikovane kao pojedinačni faktori rizika za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika u ovoj studiji. Dosadašnje studije uključile su ispitanike iz različitih populacija sa različitim komorbidnim

psihijatrijskim dijagnozama, kao i sa različitim tipovima samoubilačkog ponašanja i dale su kontradiktorne rezultate.

Varijanta rs7305115 gena *TPH2* nije asociirana, ni kao pojedinačana, ni kao deo haplobloka, sa izvršenim samoubistvom kod osoba nepoznate prethodne psihopatologije iz populacije Japana (Mouri et al., 2009). Nasuprot negativnim rezultatima, manje učestali alel A i genotip AA varijante rs7305115 povezani su sa povećanim rizikom za pokušaj samoubistva u meksičkoj populaciji bolesnika sa shizofrenijom, psihozom, poremećajima raspoloženja, poremećajima vezanim za odgovor na stres ili zloupotrebu supstanci i organskim poremećajima (López-Narváez et al., 2015). U istoj studiji, haplotip koji je sadržao alel A ove varijante smanjivao je rizik, dok je haplotip sa alelom G povećavao rizik za pokušaj samoubistva (López-Narváez et al., 2015). Kod finskih belaca i afričkih Amerikanaca, identifikovani haplotip gena *TPH2*, koji je povećavao rizik za pokušaj samoubistva, takođe je sadržao alel G, dok analiza pojedinačnog lokusa rs7305115 nije pokazala asocijaciju sa pokušajem samoubistva (Zhou et al., 2005). Haplotip gena *TPH2*, koji je povećavao rizik za samoubilačko i parasamoubilačko (samopovređujuće ponašanje koje nema za cilj oduzimanje sopstvenog života, iako ga akter tako predstavlja) ponašanje u beloj evropskoj populaciji sa graničnim poremećajima ličnosti, sadržao je, takođe, alel G varijante rs7305115 (Perez-Rodriguez et al., 2010). Dodatno, alel A i genotip AA varijante rs7305115 identifikovani su kao protektivni faktori za pokušaj samoubistva kod depresivnih bolesnika kineskog porekla (Ke et al., 2006; Zhang et al., 2010).

U odnosu na rs7305115, varijanta rs4290270 gena *TPH2* manje je ispitivana u studijama asocijacije sa samoubilačkim ponašanjem. Kao i u ovoj studiji, nezavisan efekat ove varijante na rizik za pokušaj samoubistva nije detektovan kod klinički heterogene populacije bolesnika iz Meksika (López-Narváez et al., 2015). Sa druge strane, haplotip *TPH2*, koji je sadržao češći alel T ove varijante, smanjivao je rizik, dok je haplotip sa manje učestalim alelom A povećavao rizik kod iste grupe ispitanika (López-Narváez et al., 2015). Statistički značajno veća učestalost genotipa AA varijante rs4290270 opisana je kod osoba koje su izvršile samoubistvo i čija je psihopatologija bila nepoznata u poređenju sa

bolesnicima sa depresivnim poremećajem i kontrolnom populacijom iz Nemačke (Grohmann et al., 2010).

U genu *TPH2* identifikovano je pet čestih tačkastih varijanti u visokoj neravnotežnoj vezanosti, uključujući varijante rs7305115 i rs4290270, čija heterozigotnost koreliše sa povećanjem nivoa ekspresije iRNK *TPH2* u moždanom stablu zdravih osoba (Lim et al., 2007). Sa povećanim nivoom ekspresije iRNK *TPH2* od 94% i 59% povezani su manje učestali alel A varijante rs7305115 i učestaliji alel T varijante rs4290270, redom (Lim et al., 2007). Varijanta rs4290270 je nepoznatim mehanizmom povezana sa alternativnim splajsovanjem i editovanjem transkripata *TPH2*. Naime, događaj alternativnog splajsovanja koje omogućava stvaranje iRNK *TPH2b* i editovanje transkripata *TPH2a* i *TPH2b* u kulturi ćelija identifikovano je samo u prisutvu alela T (Grohmann et al., 2010). Navedeni rezultati funkcionalnih analiza ukazuju da bi alel A varijante rs7305115 i alel T varijante rs4290270 mogli ostvarivati protektivnu ulogu u ispoljavanju pokušaja samoubistva, putem povećanja ekspresije *TPH2* i povećane sinteze serotonina. Dodatno, alel T varijante rs4290270 bi mogao doprinositi održavanju optimalnog nivoa sinteze serotonina kroz regulaciju alternativnog splajsovanja i editovanja RNK, procesa koji su uključeni u regulaciju katalitičke aktivnosti TPH2 usklađenu sa trenutnim potrebama ćelije.

Rezultati studija koje su ispitivale kompletan region genoma u kome mapira gen *TPH2* genotipizacijom čestih tag varijanti, nisu utvrdili povezanost ovog gena sa pokušajem samoubistva kod bolesnika sa bipolarnim afektivnim poremećajem iz bele brazilske populacije (Campos et al., 2010) i zavisnika od alkohola iz Nemačke (Zill et al., 2007b), kao ni sa izvršenim samoubistvom kod muškaraca iz Estonije (Must et al., 2009). Negativne rezultate za asocijaciju gena *TPH2* sa pokušajem samoubistva dala je i meta-analiza u koju su bile uključene i varijante rs7305115 i rs4290270 (Choong et al., 2014). Nominalna značajnost asocijacije varijante rs7305115 sa samoubilačkim ponašanjem po modelu fiksiranih efekata nije se održala u modelu nasumičnih efekata, usled velike heterogenosti ispitivanih grupa (Choong et al., 2014).

Suprotno genu *TPH2*, kao jedan od najkonzistentnijih faktora rizika za samoubilačko ponašanje je gen *TPH1*. Gen *TPH1* se dominantno eksprimira van centralnog nervnog sistema, a u mozgu je njegova ekspresija opisana u hipotalamusu, amigdali (Zill et al., 2007a) i prednjem režnju hipofize (Zill et al., 2009), u kojima je izoforma *TPH1* zastupljenija u odnosu na *TPH2*. Nekoliko čestih varijanti gena *TPH1* povezane su sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika i izvršenjem samoubistva u populacijama širom sveta (Mirkovic et al., 2016). Najčešće asocirana varijanta gena *TPH1*, rs1800532 (A218C), povezana je sa pokušajem samoubistva i u grupi psihijatrijskih bolesnika ispitivanih u ovoj studiji (Karanović et al., 2016). Prema navedenim rezultatima genetičkih studija asocijacije, varijante gena *TPH1* mogle bi imati ulogu u etiologiji pokušaja samoubistva i samoubilačkog ponašanja uopšte, dok bi varijante gena *TPH2* pre mogle imati opštiji efekat na psihopatologije. Na primer, varijanta rs7305115 povezana je sa depresivnim poremećajem u ženskoj populaciji iz Kine (Shen et al., 2011) i bipolarnim afektivnim poremećajem u francuskoj populaciji iz Kanade (Harvey et al., 2007). Ili, varijanta rs4290270 koja je povezana sa kognitivnim funkcijama kod psihijatrijskih bolesnika, dok je efekat varijante rs7305115 na kognitivne funkcije u istoj studiji detektovan samo kod podgrupe koja je imala tešku depresiju (Wang et al., 2015).

Prethodno diskutovani rezultati ove studije vezani su za asocijaciju pojedinačnih faktora rizika na pokušaj samoubistva i podržavaju hipotezu prema kojoj sredinski faktori mogu u većoj meri doprineti riziku za ovaj fenotip u odnosu na česte genetičke varijante (Brezo et al., 2008). Međutim, nijedan od identifikovanih pojedinačnih faktora rizika niti je neophodan niti dovoljan da bi neka osoba pokušala samoubistvo. Na primer, više od polovine bolesnika koji nisu pokušali samoubistvo doživelo je opšte traume tokom detinjstva, dok je nešto više od 30% njih prijavilo da je doživelo veći broj stresnih događaja tokom poslednjih 12 meseci života. Imajući u vidu da, prema modelu 'predispozicija-stres', individualni rizik za razvoj samoubilačkog ponašanja zavisi od udruženog efekta različitih faktora (Mann, 2003), kao i da se efekat pojedinačnih faktora rizika može modulirati kroz interakcije sa drugim faktorima rizika (Cordell, 2009; McGowan et al., 2008), u ovoj tezi ispitivani su i udruženi i interaktivni efekti ispitivanih genetičkih i sredinskih faktora rizika.

Testiranjem pojedinačnih i interaktivnih efekata svih statistički značajno asociranih genetičkih faktora rizika (rs4819035 i rs9983925 gena *ADARBI* i rs6318 gena *HTR2C*), svih ispitivanih sredinskih faktora rizika, uključujući kao varijable i psihijatrijske dijagnoze, pol i starost bolesnika, prema najbolje fitovanom minimalnom modelu udruženi efekat na pokušaj samoubistva kod ispitivane grupe psihijatrijskih bolesnika ostvaruju: varijanta rs9983925 gena *ADARBI*, varijanta rs6318 gena *HTR2C*, emocionalno zlostavljanje tokom detinjstva i akutni stresni događaji, kao nezavisni faktori rizika, kao i interakcija opštih trauma i psihijatrijske dijagnoze i interakcija opštih trauma i emocionalnog zlostavljanja.

Detektovane interakcije ukazuju da efekat doživljenih opštih trauma na pokušaj samoubistva zavisi od psihijatrijske dijagnoze i emocionalnog zlostavljanja, što delom može objasniti zašto svi bolesnici koji su prijavili da su doživeli opšte traume nisu pokušali samoubistvo. Tako, veći broja doživljenih opštih trauma tokom detinjstva povećava rizik za pokušaj samoubistva kod bolesnika sa dijagnozom depresivnog poremećaja i bipolarnog afektivnog poremećaja. Suprotno, doživljene opšte traume ne povećavaju rizik za pokušaj samoubistva kod bolesnika sa dijagnozom shizofrenije, iako su oni prijavili veći broj opštih trauma u odnosu na dve prethodno pomenute grupe bolesnika. Moglo bi se pretpostaviti da bi opšte traume iz detinjstva mogle biti faktor rizika za razvoj same shizofrenije ili neke druge aspekte njene patologije koji nisu povezani sa samoubilačkim ponašanjem. Sa druge strane, interakcija između opštih trauma i emocionalnog zlostavljanja znatno je složenija. Bolesnici koji su doživeli veći broj opštih trauma tokom detinjstva, i koji su prijavili mali ili veliki broj događaja iz domena emocionalnog zlostavljanja u istom periodu života, imali su povećan rizik za pokušaj samoubistva. Iako ovaj rezultat nije jednostavan za interpretaciju, on potvrđuje da određene kombinacije sredinskih faktora, kao što je kombinacija fizičkog i seksualnog zlostavljanja (Leverich et al., 2003), povećavaju rizik za pokušaj samoubistva kasnije tokom života.

Najveći deo varijanse pokušaja samoubistva koju opisuje navedeni model vezan je za stresne događaje tokom detinjstva, bilo kao nezavisnih faktora rizika ili kroz međusobne interakcije ili interakcije sa psihijatrijskim dijagnozama. Ovaj rezultat je u skladu sa već

navedenim podacima da najveći doprinos predispoziciji za pokušaj samoubistva imaju stresni događaji doživljeni tokom detinjstva (Dube et al., 2001; Fergusson et al., 2000), kao i da većina osoba koje su pokušale samoubistvo najčešće imaju dijagnostikovan neki od poremećaja raspoloženja (Beautrais et al., 1996). Ovi rezultati, takođe, ukazuju da bi mnogi kontradiktorni rezultati vezani za ispitivanje efekata potencijalnih faktora rizika mogli biti vezani za dizajn studije, u smislu da se najčešće ispituju samo nezavisni efekti.

Varijante rs7305115 i rs4290270 gena *TPH2* nisu bile razmatrane u prethodnoj analizi udruženih efekata faktora rizika, koja je od genetičkih varijanti uključila samo one koje su identifikovane kao nezavisni faktori rizika za pokušaj samoubistva. Međutim, imajući u vidu potencijalan uticaj ovih varijanti na funkcionalnost enzima TPH2, koji je faktor ograničenja sinteze serotonina u mozgu, testirane su njihove interakcije sa stresnim događajima tokom detinjstva. Nije identifikovano da postoji interakcija varijante rs7305115 sa ispitivanim stresnim životnim događajima. Slično, Murphy i saradnici (2011) nisu detektovali da interakcija ove varijante i fizičkog i/ili seksualnog zlostavljanja pre 16. godine života predstavlja rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika. Zanimljiv je podatak da interakcija varijante rs7305115 i težine novorođenčeta može uticati na formiranje osobina u detinjstvu, na osnovu čega je pretpostavljeno da bi serotoninski sistem mogao biti uključen u mehanizme plastičnosti koji definišu individualni odgovor na uticaje iz spoljašnje sredine tokom razvića (Broekman et al., 2011).

U ispitanim interakcijama G x E, detektovana je statistički značajna interakcija između varijante rs4290270, prema dominantnom modelu nasleđivanja, i opštih trauma doživljenih pre 18. godine života. Interakcija je takva da se efekat opštih trauma na rizik za pokušaj samoubistva ispoljava samo kod onih psihijatrijskih bolesnika koji su bili homozigoti TT za rs4290270. Interakcija rs4290270 gena *TPH2* sa stresnim životnim događajima do sada nije ispitivana, a posebno je bila od interesa u ovoj studiji, imajući u vidu njenu potencijalnu funkcionalnu povezanost sa alternativnim splajsovanjem i editovanjem transkripata *TPH2*. Iz ovog razloga testirani su i udruženi efekti pojedinačnih i interaktivnih efekata varijante rs4290270 gena *TPH2*, statistički značajno asociiranih varijanti rs4819035 i rs9983925 gena *ADARBI* i opštih trauma tokom detinjstva kao

statistički značajno asociranih nezavisnih i interaktivnih sredinskih faktora rizika, uključujući kao konfaundere psihijatrijske dijagnoze, pol i starost bolesnika. Prema najbolje fitovanom minimalnom modelu identifikovan je udruženi efekat opštih trauma kao nezavisnih faktora rizika, dvostuke interakcije opštih trauma i psihijatrijske dijagnoze, dvostuke interakcije opštih trauma i varijante rs4290270 gena *TPH2*, i vrlo zanimljivo, trostruke interakcije opštih trauma, i varijanti rs4290270 gena *TPH2* i rs4819035 gena *ADARBI*.

Identifikovana trostruka interakcija ukazuje da se efekat interakcije opštih trauma i varijante rs4290270 gena *TPH2* dodatno modifikuje varijantom rs4819035 gena *ADARBI*, tako da se kod osoba koje su doživele opšte traume i nosioci su genotipa TT varijante rs4290270 rizik za pokušaj samoubistva dodatno povećava ako su one i nosioci genotipa TT varijante rs4819035. Efekat varijante rs4290270 na pokušaj samoubistva, dakle, zavisi od izlaganja bolesnika stresnim događajima tokom detinjstva, kao i od genotipa varijante rs4819035 gena *ADARBI*. Za razliku od nje, varijanta rs4819035 je sa pokušajem samoubistva povezana nezavisno, kao i putem navedene trostruke interakcije, što ukazuje da genetički faktori rizika mogu ostvarivati složeni efekat na pokušaj samoubistva. Ovaj najbolje fitovani model još jednom je potvrdio da opšte traume predstavljaju nezavisne faktore rizika za pokušaj samoubistva, kao i da njihov efekat zavisi od psihijatrijske dijagnoze. Interakcija 'opšte traume x psihijatrijske dijagnoze' u ovom modelu ukazuje da su identifikovana dvostruka i trostruka interakcija 'G x E' uglavnom povezane da depresivnim poremećajem i bipolarnim afektivnim poremećajem. Slično prvom modelu, i prema ovom modelu najveći deo varijanse u pokušaju samoubistva vezan je za efekat opštih trauma, nezavisno ili kroz interakcije sa drugim faktorima.

Sa identifikacijom varijante rs4290270 gena *TPH2*, kao faktora rizika, dobijeni rezultati idu u prilog hipotezi da bi izmenjen nivo i obrazac editovanja transkripata *TPH2*, slično editovanju transkripata *HTR2C*, mogao biti uključen u etiologiju samoubilačkog ponašanja (Grohmann et al., 2010). Ova hipoteza postavljena je na osnovu nalaza da je u *postmortem* uzorcima amigdala samoubica detektovan 20% povišen nivo editovanja

transkripata *TPH2a* na mestima 1, 2, 3 i 4 u odnosu na kontrole, dok editovanje ovih transkripata nije opisano kod bolesnika sa shizofrenijom (Grohmann et al., 2010).

Na osnovu rezultata funkcionalnih studija varijante rs4290270 gena *TPH2* očekuje se da nosioci genotipa TT ove varijante ekspimiraju gen *TPH2* na nešto višem nivou u odnosu na nosioce genotipova TA ili AA (Lim et al. 2007), što ukazuje da bi povećan nivo ekspresije *TPH2*, opisan u *postmortem* uzorcima mozga žrtava samoubistva sa depresivnim poremećajem (Bach-Mizrachi et al., 2006; 2008; Boldrini et al., 2005), delom mogao biti genetički determinisan. Iako se smatra da bi povećan nivo ekspresije *TPH2* mogao predstavljati mehanizam kompenzacije na sniženi nivo serotonina kod osoba sa samoubilačkim ponašanjem (Bach-Mizrachi et al., 2008), treba imati u vidu da sve izoforme *TPH2* nisu katalitički jednako aktivne usled složene post-transkripcione obrade. Prema rezultatima funkcionalne analize varijante rs4290270 gena *TPH2* očekuje se da nosioci genotipa TT ove varijante ekspimiraju obe izoforme *TPH2* (*TPH2a* i *TPH2b*) čija aktivnost može biti redukovana ili potpuno inhibirana usled, takođe, očekivanog editovanja iRNK *TPH2a* i *TPH2b* kod nosioca ovog genotipa (Grohmann et al., 2010). Genetički determinisano prisustvo katalitički manje aktivnih izoformi *TPH2* kod osoba sa samoubilačkim ponašanjem bilo bi u skladu sa nalazom povećanog nivoa editovanja transkripata *TPH2a* u *postmortem* uzorcima amigdala samoubica, i moglo bi barem delom doprineti hipofunkciji serotoninskog sistema opisanoj kod samoubilačkog ponašanja.

Identifikovane statističke interakcije G x E ukazuju da bi biološka posledica stresnih događaja tokom detinjstva mogla biti narušavanje plastičnosti u funkcionisanju serotoninskog sistema, koja je barem jednim delom genetički deteminisana. S obzirom da poligena osnova, određena čestim tačkastim varijantama i njihovim interakcijama, objašnjava mali procenat rizika za česte bolesti (Cordell, 2009), svakako je intrigantno pitanje biološke osnove „memorije“ stresnih događaja tokom detinjstva koji povećavaju rizik za samoubilačko ponašanje u adultnom periodu. Istraživanja u oblasti epigenetike ponašanja ukazuju da zlostavljanje tokom detinjstva menja epigenetičke oznake u genomu pomoću kojih geni „pamte“ doživljeno iskustvo. Prvi dokaz za ovu hipotezu bili su eksperimenti na pacovima u kojima je pokazano da majčinska briga utiče na aktivnost

hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose kroz epigenetičku regulaciju ekspresije glukokortikoidnog receptora (Weaver et al., 2004). Izmenjena aktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose povezana je i sa samoubilačkim ponašanjem (Mann, 2003). Kod samoubica, koji su bili žrtve zlostavljanja tokom detinjstva, opisana je snižena ekspresija gena neuron-specifičnog glukokortikoidnog receptora (*NR3C1*) u hipokampusu povezana sa epigenetičkim promenama (hipermetilacijom) promotora ovog gena u poređenju, kako sa samoubicama koji nisu bili žrtve zlostavljanja, tako i sa kontrolama (McGowan et al., 2009).

Studije asocijacije imaju brojna ograničenja koja treba imati u vidu prilikom njihovog dizajna, kako bi dobijeni rezultati bili relevantni, a ne rezultat statističke greške. Uopšteno, ograničenja studija asocijacija vezana su za kontrolu faktora koji utiču na statističku moć studije, kontrolu multiplih testiranja, kao i odabir što preciznijih kriterijuma i instrumenata koji doprinose što većoj fenotipskoj (i genetičkoj) homogenosti ispitanika (Evans and Purcell, 2012). Takođe, neophodna je i odgovarajuća kontrola konfaundera ili faktora sa potencijalno skrivenim efektima koje je potrebno uzeti u obzir kako detektovan efekat neke ispitivane varijable ne bi bio posledica efekta konfaundera (Keller, 2014).

Procenjena statistička moć studije asocijacije pojedinačnih genetičkih varijanti, koja je dizajnirana tako da detektuje česte genetičke varijante sa učestalošću ređeg alela od oko 0.25 i sa relativno niskim efektom na rizik za pojavu pokušaja samoubistva ($OR=1.5$), iznosila je 77.8%, što približno odgovara preporučenoj vrednosti od 80%. Sa ovolikom statističkom moći studije verovatnoća detekcije lažno negativnih rezultata, odnosno izostanka detekcije pravih efekata, odgovara koeficijentu greške tipa II i iznosi $\beta=1-0.778=0.222$, dok je mogućnost lažno pozitivnih rezultata, odnosno detekcije nepostojećih efekata, bila unapred definisana zadatim pragom značajnosti $P<0.05$ (koeficijent greške tipa I, $\alpha=0.05$) (Evans and Purcell, 2012). Delimično ograničenje vezano za veličinu ispitivanog uzorka u studiji asocijacije pojedinačnih genetičkih varijanti kompenzovano je dobrom kontrolom dodatnih faktora koji utiču na statističku moć studije. Naime, prilikom odabira tag tačkastih varijanti u *ADAR* i *ADARBI* regionima od interesa, mera neravnotežne vezanosti definisana je visokom vrednošću koeficijentom korelacije ($r^2 \geq 0.8$) kako bi se

obezbedila optimalna pokrivenost čestih varijanti u ispitivanim regionima (Pettersson et al., 2009). Takođe, obe ispitivane grupe sadržale su približno isti broj bolesnika, što je najoptimalniji odnos za poređenje grupa u studijama asocijacije (Evans and Purcell, 2012). Prilikom testiranja asocijacije genotipova pojedinačnih tačkastih varijanti, kao i asocijacije varijanti haplobloka 2 gena *ADARBI*, vršeno je poravnanje po psihijatrijskim dijagnozama. Korekcija za multipla testiranja asocijacije alela i genotipova pojedinačnih varijanti, kao i asocijacije haplotipova, kontrolisana je testom sa milion permutacija (Purcell et al., 2007).

Veličina uzorka je, verovatno, bila realno ograničenje za ispitivanje interakcija između faktora rizika korišćenjem generalizovanih modela i selekcije unazad, koja je, pored interakcija faktora rizika, u početni model uključila sve relevantne interakcije ‘konfauder x gen’ i ‘konfauder x sredina’ kako bi se na adekvatan način isključila mogućnost da su identifikovane interakcije posledica njihovih efekata kao skrivenih faktora (Keller, 2014). Naime, neodgovarajuća kontrola efekta konfaudera je jedna od najčešćih kritika upućena studijama u kojima su interakcije G x E ispitivane logističkom regresijom, a u kojima su faktori sa skrivenim efektom kontrolisani kao kovarijate (Keller, 2014). Ipak, mogućnost suvišnog fitovanja podataka (eng. *overfitting*) isključena je dodatnom proverom odnosa rezidualne devijanse i stepena slobode, kao i kritičkom proverom odabranog najbolje fitovanog modela pomoću Hosmer-Lemeshow-og testa (Hosmer and Lemeshow, 2000).

Statističku moć studije može poboljšati i kontrola fenotipizacije (Evans and Purcell, 2012). Grupisanjem obolelih prema određenim osobinama ili simptomima (endofenotipovima), nezavisno od kliničke dijagnoze, može se postići veća genetička homogenost uzorka koja istovremeno doprinosi povećanju veličina efekta koju određena genetička varijanta ima na razvoj date osobine ili simptoma (Burmeister et al., 2008). U ovoj studiji ispitanici su grupisani u odnosu na to da li su ili ne pokušali samoubistvo, bez obzira na primarnu psihijatrijsku dijagnozu. Sa druge strane, iako heterogenost psihijatrijskih dijagnoza u ispitivanom uzorku može predstavljati ograničenje studije, treba istaći da se predispozicija za samoubilačko ponašanje smatra nezavisnom od psihijatrijske dijagnoze (Bostwick and Pankratz, 2000), kao i da je, prema kriterijumima DSM-5,

samoubilačko ponašanje definisano kao pretpostavljena dijagnoza za sve osobe koje su pokušale da izvrše samoubistvo tokom poslednje dve godine života (American Psychiatric Association, 2013). Takođe, zbog velike fenotipske heterogenosti samoubilačkog ponašanja preporučuje se ispitivanje određenog tipa ovog ponašanja (Mann, 2003). U skladu sa navedenom preporukom, fenotipska homogenizacija uzorka poboljšana je upravo ispitivanjem samo pokušaja samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika, a ne samoubilačkog ponašanja uopšte koje bi uključilo i samoubilačke ideacije i izvršeno samoubistvo. Kliničku procenu bolesnika sistematski su vršila dva psihijatra nezavisno, prema definisanim kriterijumima DSM-IV. Svi bolesnici bili su poreklom iz Srbije, a ispitivane grupe nisu se statistički značajno razlikovale prema polu i prosečnoj starosti, dok je za razlike prema psihijatrijskim dijagnozama pokazano postojanje statističkog trenda, zbog čega su psihijatrijske dijagnoze bile kovarijate i konfounderi u statističkim analizama.

Potencijalna ograničenja ove studije vezana su i za dobijanje objektivnih informacija o stresnim životnim događajima, naročito onih doživljenih tokom detinjstva. Međutim, za upitnike ETI-SR i LTE-Q je utvrđeno da imaju odgovarajuću validnost i pouzdanost kao klinički instrumenti (Bremner et al., 2007; Brugha and Cragg, 1990), dok su dva psihijatra, nezavisno, dodatno procenjivala pouzdanost svakog prijavljenog stresnog događaja.

Najveći deo ove studije je po dizajnu originalan (*de novo*), jer su asocijacije gena *ADAR* i *ADARBI* sa pokušajem samoubistva, kao i asocijacije njihovih interakcija sa stresnim životnim događajima i genima *HTR2C* i *TPH2* prvi put testirane upravo u ovoj studiji. Uzimajući u obzir *de novo* dizajn i potencijalna ograničenja, potrebno je rezultate dobijene u ovoj studiji potvrditi u nezavisnoj replikativnoj studiji koja bi uključila veći broj ispitanika, kao i u studijama koje bi uključile ispitanike iz drugih populacija. Prezentovani rezultati, takođe, nameću potrebu za funkcionalnim analizama kojima bi se testirao regulatorni značaj varijante rs9983925 i varijanti haplobloka 2 gena *ADARBI*, koji uključuje varijantu rs4819035. Imajući u vidu da se gen *ADARBI* eksprimira u mnogim ćelijama (Nishikura, 2010), uključujući i limfocite, funkcionalni značaj identifikovanih varijanti bilo bi moguće ispitati metodom alel-specifičnog PCR-a u realnom vremenu iz uzorka krvi.

Bez obzira na potencijalna ograničenja, prezentovani rezultati ove studije mogli bi imati klinički značaj za prepoznavanje onih psihijatrijskih bolesnika koji imaju povećan rizik za pokušaj samoubistva, čak i u ranoj fazi bolesti, što je od posebnog značaja ako se zna da se pokušaj samoubistva smatra najvažnijim prediktivnim faktorom za izvršeno samoubistvo (Gunnell and Lewis, 2005). Genetički markeri su stabilni tokom života i mogu se nedvosmisleno i sve jednostavnije genotipizirati, dok su stresni događaji iz detinjstva objektivno procenjivi primenom pažljivo dizajniranih i validiranih upitnika, a njihove posledice se mogu ublažiti psihoterapijskim intervencijama. Ukoliko bi se procenio povećan rizik za pokušaj samoubistva, on bi se mogao smanjiti primenom odgovarajućeg i pravovremenog farmakološkog tretmana koji ne bi ublažavao samo simptome psihijatrijske bolesti, već bi mogao imati i reverzibilan efekat na izmenjeni obrazac editovanja. Navedeno bi moglo biti od posebnog značaja za primenu antidepresivnog tretmana kod bolesnika sa poremećajima raspoloženja. Ovakav pristup bi mogao dovesti do primene personalizovanog pristupa u lečenju i doprineti napretku u prevenciji pokušaja samoubistva.

Predispozicija za samoubilačko ponašanje kod psihijatrijskih bolesnika definisana je, barem jednim delom, genetički determinisanim individualnim razlikama u genima *HTR2C* i *TPH2*, genima za editovanje RNK deaminacijom adenzina u inozin (*ADAR* i *ADAR1*), dijagnostikovanim poremećajima raspoloženja, kumulativnim izlaganjem različitim stresnim događajima tokom detinjstva i akutnim stresnim događajima. Između identifikovanih faktora rizika postoje složene statističke interakcije, koje, barem delom, odražavaju biološku osnovu složenog fenotipa kao što je samoubilačko ponašanje. U tom smislu, prezentovani rezultati mogu pomoći u razumevanju mehanizama koji učestvuju u interakciji serotoninskog sistema i stresnih životnih događaja, uključujući, kao posrednika između genoma i sredine, epigenetički mehanizam na nivou RNK, kao što je editovanje RNK. Potencijalni klinički značaj ove studije je da identifikovani faktori rizika mogu pomoći u identifikaciji psihijatrijskih bolesnika koji imaju povećan rizik za samoubilačko ponašanje, čak i u ranoj fazi bolesti, kao i da mogu usmeriti ispitivanje novih biomarkera i terapeutika na proces editovanja RNK dezaminacijom adenzina u inozin.

6. Zaključci

1. Kao nezavisni faktori rizika za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika iz Srbije identifikovane su opšte traume i emocionalno zlostavljanje tokom detinjstva i akutni stresni događaji.
2. Za analizu *ADAR* regiona od interesa, koji je obuhvatio kompletan gen *ADAR* sa po okolnih 10 kb, odabrano je 12 tag tačkastih varijanti koje formiraju jedan haploblok i sa kojima je još 44 varijanti bilo u visokoj neravnotežnoj vezanosti.
3. Za analizu *ADARBI* regiona od interesa, koji kodira deaminazni domen i 3' UTR, odabrano je 11 tag tačkastih varijanti koje formiraju dva haplobloka i sa kojima je još 38 varijanti bilo u visokoj neravnotežnoj vezanosti.
4. Kao nezavisni genetički faktori rizika za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika identifikovane su varijante rs9983925 i rs4819035 gena *ADARBI*, haploblok rs9637192-rs2253763-rs4819035 na 3' kraju gena *ADARBI* i varijanta rs6318 gena *HTR2C*.
5. Ispitivanjem udruženog efekta nezavisnih genetičkih i sredinskih faktora rizika i njihovih međusobnih interakcija na rizik za pokušaj samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika identifikovana su dva najbolje fitovana minimalna modela.
6. Prvi model udruženih efekata uključio je varijantu rs9983925 gena *ADARBI*, varijantu rs6318 gena *HTR2C*, emocionalno zlostavljanje tokom detinjstva, akutne stresne događaje, interakciju 'opšte traume x emocionalno zlostavljanje' i interakciju 'opšte traume x psihijatrijske dijagnoze'.
7. Drugi model udruženih efekata uključio je opšte traume iz detinjstva, interakciju 'opšte traume x psihijatrijske dijagnoze', interakciju 'opšte traume x rs4290270 gena *TPH2*' i interakciju 'opšte traume x rs4290270 gena *TPH2* x rs4819035 gena *ADARBI*'.
8. Predispozicija za samoubilačko ponašanje kod psihijatrijskih bolesnika, barem jednim delom, definisana je genetički determinisanim individualnim razlikama u genima *HTR2C* i *TPH2*, i genima za editovanje RNK deaminacijom adenozina u inozin, što je prvi put pokazano u ovoj studiji, kao i dijagnostikovanim poremećajima raspoloženja, kumulativnim izlaganjem različitim stresnim događajima tokom detinjstva i akutnim stresnim događajima.

9. Potencijalni klinički značaj ove studije je da identifikovani faktori rizika mogu pomoći u identifikaciji psihijatrijskih bolesnika koji imaju povećan rizik za samoubilačko ponašanje, čak i u ranoj fazi bolesti, kao i da mogu usmeriti ispitivanje novih biomarkera i terapeutika na proces editovanja RNK.

7. Literatura

- aan het Rot, M., Mathew, S.J. and Charney, D.S. (2009). Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *Canadian Medical Association Journal*, 180(3), pp. 305-313.
- Abumaria, N., Ribic, A., Anacker, C., Fuchs, E. and Flugge, G. (2008). Stress upregulates TPH1 but not TPH2 mRNA in the rat dorsal raphe nucleus: identification of two TPH2 mRNA splice variants. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(3), pp. 331-342.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), pp. 248-249.
- Al-Chalabi, A. (2009). *Genome-wide association studies*. [online] Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009(12), pp. 1-13. doi: 10.1101/pdb.top66. Available at: www.cshprotocols.org [Accessed 20 June 2013].
- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4th ed. (text revision) Washington, DC: American Psychiatric Association.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Antypa, N., Serretti, A. and Rujescu, D. (2013). Serotonergic genes and suicide: a systematic review. *European Neuropsychopharmacology*, 23(10), pp. 1125-1142.
- Applied Biosystems. (2010). *Allelic Discrimination Getting Started Guide for 7300/7500/7500 Fast Systems*. Foster City, CA: Applied Biosystems. Part Number: 4347822 Rev. E. Available at: <http://appliedbiosystems.com> [Accessed 11 Apr. 2011].
- Åsberg, M., Nordström, P. and Träskman-Bendz, L. (1986). Cerebrospinal fluid studies in suicide. An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 487, pp. 243-255.
- Bach-Mizrachi, H., Underwood, M.D., Kassir, S.A., Bakalian, M.J., Sibille, E., Tamir, H., Mann, J.J. and Arango, V. (2006). Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology*, 31(4), pp. 814-824.
- Bach-Mizrachi, H., Underwood, M.D., Tin, A., Ellis, S.P., Mann, J.J. and Arango, V. (2008). Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. *Molecular Psychiatry*, 13(5), pp. 507-513.

- Barnes, N.M. and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), pp. 1083-1152.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. and Daly, M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21(2), pp. 263-265.
- Bass, B.L. (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 71, pp. 817-846.
- Bazak, L., Haviv, A., Barak, M., Jacob-Hirsch, J., Deng, P., Zhang, R., Isaacs, F.J., Rechavi, G., Li, J.B., Eisenberg, E. and Levanon, E.Y. (2014). A to I RNA editing occurs at over a hundred million genomic sites, located in a majority of human genes. *Genome Research*, 24(3), pp. 365-376.
- Beautrais, A.L., Joyce, P.R., Mulder, R.T., Fergusson, D.M., Deavoll, B.J. and Nightingale, S.K. (1996). Prevalence and comorbidity of mental disorders in persons making serious suicide attempts: a case-control study. *The American Journal of Psychiatry*, 153(8), pp. 1009-1014.
- Beghi, M., Rosenbaum, J.F., Cerri, C. and Cornaggia, C.M. (2013). Risk factors for fatal and nonfatal repetition of suicide attempts: a literature review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 9, pp. 1725-1736.
- Berg, K.A., Clarke, W.P., Cunningham, K.A. and Spampinato, U. (2008). Fine-tuning serotonin 2C receptor function in the brain: Molecular and functional implications. *Neuropharmacology*, 55(6), pp. 969-976.
- Bhansali, P., Dunning, J., Singer, S.E., David, L. and Schmauss, C. (2007). Early life stress alters adult serotonin 2C receptor pre-mRNA editing and expression of the alpha subunit of the heterotrimeric G-protein G q. *Journal of Neuroscience*, 27(6), pp. 1467-1473.
- Boldrini, M., Underwood, M.D., Mann, J.J. and Arango, V. (2005). More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain Research*, 1041(1), pp. 19-28.
- Bondy, B., Buettner, A. and Zill, P. (2006). Genetics of suicide. *Molecular Psychiatry*, 11(4), pp. 336-351.
- Bortolato, M., Pivac, N., Muck Seler, D., Nikolac Perkovic, M., Pessia, M. and Di Giovanni, G. (2013). The role of the serotonergic system at the interface of aggression and suicide. *Neuroscience*, 236, pp. 160-185.
- Bostwick, J.M. and Pankratz, V.S. (2000). Affective disorders and suicide risk: a reexamination. *The American Journal of Psychiatry*, 157(12), pp. 1925-1932.
- Boyle, A.P., Hong, E.L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M.A., Kasowski, M., Karczewski, K.J., Park, J., Hitz, B.C., Weng, S., Cherry, J.M. and Snyder, M. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, 22(9), pp. 1790-1797.

- Bremner, J.D., Bolus, R. and Mayer, E.A. (2007). Psychometric Properties of the Early Trauma Inventory–Self Report. *Journal of Nervous and Mental Disease*, 195(3), pp. 211-218.
- Brent, D.A. and Mann, J.J. (2005). Family genetic studies, suicide, and suicidal behavior. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 133C(1), pp. 13-24.
- Brent, D.A. and Melhem, N. (2008). Familial transmission of suicidal behavior. *Psychiatric Clinics of North America*, 31(2), pp. 157-177.
- Brezo, J., Paris, J., Vitaro, F., Hébert, M., Tremblay, R.E. and Turecki, G. (2008). Predicting suicide attempts in young adults with histories of childhood abuse. *British Journal of Psychiatry*, 193(2), pp. 134-139.
- Brezo, J., Bureau, A., Merette, C., Jomphe, V., Barker, E.D., Vitaro, F., Hébert, M., Carbonneau, R., Tremblay, R.E. and Turecki, G. (2010). Differences and similarities in the serotonergic diathesis for suicide attempts and mood disorders: a 22-year longitudinal gene-environment study. *Molecular Psychiatry*, 15(8), pp. 831-843.
- Brodsky, B.S. and Stanley, B. (2008). Adverse childhood experiences and suicidal behavior. *Psychiatric Clinics of North America*, 31(2), pp. 223-235.
- Broekman, B.F., Chan, Y.H., Goh, L., Fung, D., Gluckman, P.D., Saw, S.M. and Meaney, M.J. (2011). Influence of birth weight on internalizing traits modulated by serotonergic genes. *Pediatrics*, 128(5), pp. e1250-e1258. doi: 10.1542/peds.2010-3714.
- Brugha, T., Bebbington, P., Tennant, C. and Hurry, J. (1985). The list of threatening experiences: a subset of 12 life event categories with considerable long-term contextual threat. *Psychological Medicine*, 15(1), pp. 189-194.
- Brugha, T.S. and Cragg, D. (1990). The List of Threatening Experiences: the reliability and validity of a brief life events questionnaire. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 82(1), pp. 77-81.
- Brunk, C.F. and Simpson, L. (1977). Comparison of various ultraviolet sources for fluorescent detection of ethidium bromide-DNA complexes in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 82(2), pp. 455-462.
- Burmeister, M., McInnis, M.G. and Zöllner, S. (2008). Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nature Reviews Genetics*, 9(7), pp. 527-540.
- Burns, C.M., Chu, H., Rueter, S.M., Hutchinson, L.K., Canton, H., Sanders-Bush, E. and Emeson, R.B. (1997). Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*, 387(6630), pp. 303-308.
- Calcagno V. (2013). *glmulti: Model selection and multimodel inference made easy*. R package version 1.0.7. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed 2 Dec. 2014].

- Campos, S.B., Miranda, D.M., Souza, B.R., Pereira, P.A., Neves, F.S., Bicalho, M.A., Melillo, P.H., Tramontina, J., Kapczinski, F., Romano-Silva, M.A. and Correa, H. (2010). Association of polymorphisms of the tryptophan hydroxylase 2 gene with risk for bipolar disorder or suicidal behavior. *Journal of Psychiatric Research*, 44(5), pp. 271-274.
- Carlson, C.S., Eberle, M.A., Rieder, M.J., Yi, Q., Kruglyak, L. and Nickerson, D.A. (2004). Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *American Journal of Human Genetics*, 74(1), pp. 106-120.
- Cavanagh, J.T., Carson, A.J., Sharpe, M. and Lawrie, S.M. (2003). Psychological autopsy studies of suicide: a systematic review. *Psychological Medicine*. 33(3), pp. 395-405.
- Choong, M.Y., Tee, S.F. and Tang, P.Y. (2014). Meta-analysis of polymorphisms in TPH2 gene and suicidal behavior. *Psychiatry Research*, 220(3), pp. 1163-1166.
- Cordell, H.J. (2009). Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nature Reviews Genetics*, 10(6), pp. 392-404.
- Dedic, G. (2014). Gender differences in suicide in Serbia within the period 2006-2010. *Vojnosanitetski Pregled*, 71(3), pp. 265-270.
- Dracheva, S., Patel, N., Woo, D.A., Marcus, S.M., Siever, L.J. and Haroutunian, V. (2008). Increased serotonin 2C receptor mRNA editing: a possible risk factor for suicide. *Molecular Psychiatry*, 13(11), pp. 1001-1010.
- Du, Y., Davisson, M.T., Kafadar, K. and Gardiner, K. (2006). A-to-I pre-mRNA editing of the serotonin 2C receptor: comparisons among inbred mouse strains. *Gene*, 382, pp. 39-46.
- Dube, S.R., Anda, R.F., Felitti, V.J., Chapman, D.P., Williamson, D.F. and Giles, W.H. (2001). Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. *JAMA*, 286(24), pp. 3089-3096.
- Englander, M.T., Dulawa, S.C., Bhansali, P. and Schmauss, C. (2005). How stress and fluoxetine modulate serotonin 2C receptor pre-mRNA editing. *Journal of Neuroscience*, 25(3), pp. 648-651.
- Eran, A., Li, J.B., Vatalaro, K., McCarthy, J., Rahimov, F., Collins, C., Markianos, K., Margulies, D.M., Brown, E.N., Calvo, S.E., Kohane, I.S. and Kunkel, L.M. (2013). Comparative RNA editing in autistic and neurotypical cerebella. *Molecular Psychiatry*, 18(9), pp. 1041-1048.
- Evans, D.M. and Purcell, S. (2012). *Power calculations in genetic studies*. [online] Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012(6), pp. 664-674. doi: 10.1101/pdb.top069559. Available at: <http://cshprotocols.cshlp.org> [Accessed 17 June 2013].

- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp. 351-379.
- Fergusson, D.M., Woodward, L.J. and Horwood, L.J. (2000). Risk factors and life processes associated with the onset of suicidal behaviour during adolescence and early adulthood. *Psychological Medicine*, 30(1), pp. 23-39.
- First, M.B., Spitzer, R.L., Gibbon, M. and Williams, J.B.W. (1996). *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version (SCID-CV)*. Washington, DC: American Psychiatric Press Inc.
- Flicek, P., Ahmed, I., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., Gil, L., García-Girón, C., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S., Juettemann, T., Kähäri, A.K., Keenan, S., Komorowska, M., Kulesha, E., Longden, I., Maurel, T., McLaren, W.M., Muffato, M., Nag, R., Overduin, B., Pignatelli, M., Pritchard, B., Pritchard, E., Riat, H.S., Ritchie, G.R., Ruffier, M., Schuster, M., Sheppard, D., Sobral, D., Taylor, K., Thormann, A., Trevanion, S., White, S., Wilder, S.P., Aken, B.L., Birney, E., Cunningham, F., Dunham, I., Harrow, J., Herrero, J., Hubbard, T.J., Johnson, N., Kinsella, R., Parker, A., Spudich, G., Yates, A., Zadissa, A. and Searle, S.M. (2013). Ensembl 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), pp. D48-D55. doi: 10.1093/nar/gks1236.
- Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., Gil, L., Gordon, L., Hendrix, M., Hourlier, T., Johnson, N., Kähäri, A.K., Keefe, D., Keenan, S., Kinsella, R., Komorowska, M., Koscielny, G., Kulesha, E., Larsson, P., Longden, I., McLaren, W., Muffato, M., Overduin, B., Pignatelli, M., Pritchard, B., Riat, H.S., Ritchie, G.R., Ruffier, M., Schuster, M., Sobral, D., Tang, Y.A., Taylor, K., Trevanion, S., Vandrovcova, J., White, S., Wilson, M., Wilder, S.P., Aken, B.L., Birney, E., Cunningham, F., Dunham, I., Durbin, R., Fernández-Suarez, X.M., Harrow, J., Herrero, J., Hubbard, T.J., Parker, A., Proctor, G., Spudich, G., Vogel, J., Yates, A., Zadissa, A. and Searle, S.M. (2012). Ensembl 2012. *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), pp. D84-D90. doi: 10.1093/nar/gkr991.
- Gallego, J.A., Rachamalla, V., Yuen, E.Y., Fink, S., Duque, L.M. and Kane, J.M. (2015). Predictors of suicide attempts in 3.322 patients with affective disorders and schizophrenia spectrum disorders. *Psychiatry Research*, 228(3), pp. 791-796.
- Gallo, A., Keegan, L.P., Ring, G.M. and O'Connell, M.A. (2003). An ADAR that edits transcripts encoding ion channel subunits functions as a dimer. *The EMBO Journal*, 22(13), pp. 3421-3430.
- Gauderman, W.J. and Morrison, J.M. (2006). *Quanto 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies*. [online] Available at: <http://hydra.usc.edu/gxe> [Accessed 14 Dec. 2014].
- González, J.R., Armengol, L., Guinó, E., Solé, X. and Moreno, V. (2014). *SNPassoc: SNPs-based whole genome association studies*. R package version 1.9-2. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed 20 Apr. 2015].

- Gottesman, I.I. and Gould, T.D. (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *American Journal of Psychiatry*, 160(4), pp. 636-645.
- Grohmann, M., Hammer, P., Walther, M., Paulmann, N., Büttner, A., Eisenmenger, W., Baghai, T.C., Schüle, C., Rupprecht, R., Bader, M., Bondy, B., Zill, P., Priller, J. and Walther, D.J. (2010). Alternative splicing and extensive RNA editing of human TPH2 transcripts. *PLoS One*, 5(1), p. e8956. doi: 10.1371/journal.pone.0008956.
- Gunnell, D. and Lewis, G. (2005). Studying suicide from the life course perspective: Implications for prevention. *British Journal of Psychiatry*, 187, pp. 206-208.
- Gurevich, I., Tamir, H., Arango, V., Dwork, A.J., Mann, J.J. and Schmauss, C. (2002). Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron*, 34(3), pp. 349-356.
- Haghighi, F., Bach-Mizrachi, H., Huang, Y.Y., Arango, V., Shi, S., Dwork, A.J., Rosoklija, G., Sheng, H.T., Morozova, I., Ju, J., Russo, J.J. and Mann, J.J. (2008). Genetic architecture of the human tryptophan hydroxylase 2 Gene: existence of neural isoforms and relevance for major depression. *Molecular Psychiatry*, 13(8), pp. 813-820.
- Hale, M.W., Shekhar, A. and Lowry, C.A. (2011). Development by environment interactions controlling tryptophan hydroxylase expression. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41(4), pp. 219-226.
- Harvey, M., Gagné, B., Labbé, M. and Barden, N. (2007). Polymorphisms in the neuronal isoform of tryptophan hydroxylase 2 are associated with bipolar disorder in French Canadian pedigrees. *Psychiatric Genetics*, 17(1), pp. 17-22.
- Hawton, K. and van Heeringen, K. (2009). Suicide. *Lancet*, 373(9672), pp. 1372-1381.
- Holma, K.M., Haukka, J., Suominen, K., Valtonen, H.M., Mantere, O., Melartin, T.K., Sokero, T.P., Oquendo, M.A. and Isometsä, E.T. (2014). Differences in incidence of suicide attempts between bipolar I and II disorders and major depressive disorder. *Bipolar Disorders*, 16(6), pp. 652-661.
- Hoopengardner, B., Bhalla, T., Staber, C. and Reenan, R. (2003). Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science*, 301(5634), pp. 832-836.
- Hornung, J.P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26(4), pp. 331-343.
- Hosmer, D.W. and Lemeshow, S. (2000). *Applied Logistic Regression*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R. and Humphrey, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46(2), pp. 157-203.
- International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426(6968), pp. 789-796.

- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp. 860-921.
- Iwamoto, K., Bundo, M. and Kato, T. (2009). Serotonin receptor 2C and mental disorders: genetic, expression and RNA editing studies. *RNA Biology*, 6(3), pp. 248-253.
- Karanović, J., Ivković, M., Jovanović, V.M., Pantović, M., Pavlović-Janković, N., Damjanović, A., Brajušković, G., Romac, S. and Savić-Pavićević, D. (2016). Tryptophan Hydroxylase 1 Variant rs1800532 is Associated with Suicide Attempt in Serbian Psychiatric Patients but does not Moderate the Effect of Recent Stressful Life Events. *Suicide and Life-Threatening Behavior*, 46(6), pp. 664-668.
- Kawahara, Y., Ito, K., Ito, M., Tsuji, S. and Kwak, S. (2005). Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene*, 363, pp. 193-201.
- Ke, L., Qi, Z.Y., Ping, Y. and Ren, C.Y. (2006). Effect of SNP at position 40237 in exon 7 of the TPH2 gene on susceptibility to suicide. *Brain Research*, 1122(1), pp. 24-26.
- Keller, M.C. (2014). Gene \times environment interaction studies have not properly controlled for potential confounders: the problem and the (simple) solution. *Biological Psychiatry*, 75(1), pp. 18-24.
- Kendler, K.S. and Neale, M.C. (2010). Endophenotype: a conceptual analysis. *Molecular Psychiatry*, 15(8), pp. 789-797.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. and Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), pp. 996-1006.
- Khermesh, K., D'Erchia, A.M., Barak, M., Annese, A., Wachtel, C., Levanon, E.Y., Picardi, E. and Eisenberg, E. (2016). Reduced levels of protein recoding by A-to-I RNA editing in Alzheimer's disease. *RNA*, 22(2), pp. 290-302.
- Klonsky, E.D. and Moyer, A. (2008). Childhood sexual abuse and non-suicidal self-injury: Meta-analysis. *British Journal of Psychiatry*, 192(3), pp. 166-170.
- Kumar, P., Henikoff, S. and Ng, P.C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), pp. 1073-1081.
- Kutcher, S. P. and Chehil, S. (2011). *Suicide risk management: a manual for health professionals*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons.
- Lele, S.R., Keim, J.L. and Solymos, P. (2015). *ResourceSelection: Resource Selection (Probability) Functions for Use-Availability Data*. R package version 0.2-5. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed 2 Dec. 2014].
- Lenth, R.V. and Hervé, M. (2015). *lsmeans: Least-Squares Means*. R package version 2.19. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed 20 Apr. 2015].

- Lerer, B., Macciardi, F., Segman, R.H., Adolfsson, R., Blackwood, D., Blairy, S., Del Favero, J., Dikeos, D.G., Kaneva, R., Lilli, R., Massat, I., Milanova, V., Muir, W., Noethen, M., Oruc, L., Petrova, T., Papadimitriou, G.N., Rietschel, M., Serretti, A., Souery, D., Van Gestel, S., Van Broeckhoven, C. and Mendlewicz, J. (2001). Variability of 5-HT_{2C} receptor cys23ser polymorphism among European populations and vulnerability to affective disorder. *Molecular Psychiatry*, 6(5), pp. 579-585.
- Levanon, E.Y., Eisenberg, E., Yelin, R., Nemzer, S., Hallegger, M., Shemesh, R., Fligelman, Z.Y., Shoshan, A., Pollock, S.R., Sztybel, D., Olshansky, M., Rechavi, G. and Jantsch, M.F. (2004). Systematic identification of a bundant A to I editing sites in the human transcriptome. *Nature Biotechnology*, 22(8), pp. 1001-1005.
- Leverich, G.S., Altshuler, L.L., Frye, M.A., Suppes, T., Keck, P.E.Jr, McElroy, S.L., Denicoff, K.D., Obrocea, G., Nolen, W.A., Kupka, R., Walden, J., Grunze, H., Perez, S., Luckenbaugh, D.A. and Post, R.M. (2003). Factors associated with suicide attempts in 648 patients with bipolar disorder in the Stanley Foundation Bipolar Network. *Journal of Clinical Psychiatry*, 64(5), pp. 506-515.
- Levi, F., La Vecchia, C., Lucchini, F., Negri, E., Saxena, S., Maulik, P.K. and Saraceno, B. (2003). Trends in mortality from suicide, 1965-99. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 108(5), pp. 341-349.
- Lewis, C.M. and Knight, J. (2012). *Introduction to genetic association studies*. [online] Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012(3), pp. 297-306. doi: 10.1101/pdb.top068163. Available at: <http://cshprotocols.cshlp.org> [Accessed 17 June 2013].
- Lim, J.E., Pinsonneault, J., Sadee, W. and Saffen, D. (2007). Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) haplotypes predict levels of TPH2 mRNA expression in human pons. *Molecular Psychiatry*, 12(5), pp. 491-501.
- Liu, R.T. and Miller, I. (2014). Life events and suicidal ideation and behavior: a systematic review. *Clinical Psychology Review*, 34(3), pp. 181-192.
- López-Narváez, M.L., Tovilla-Zárate, C.A., González-Castro, T.B., Juárez-Rojop, I., Pool-García, S., Genis, A., Ble-Castillo, J.L. and Fresán, A. (2015). Association analysis of TPH-1 and TPH-2 genes with suicidal behavior in patients with attempted suicide in Mexican population. *Comprehensive Psychiatry*, 61, pp. 72-77.
- Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*, 44(3), pp. 151-162.
- Lyddon, R., Dwork, A.J., Keddache, M., Siever, L.J. and Dracheva, S. (2013). Serotonin 2c receptor RNA editing in major depression and suicide. *World Journal of Biological Psychiatry*, 14(8), pp. 590-601.
- Maas, S., Kawahara, Y., Tamburro, K.M. and Nishikura, K. (2006). A-to-I RNA editing and human disease. *RNA Biology*, 3(1), pp. 1-9.

- Malone, K.M., Corbitt, E.M., Li, S. and Mann, J.J. (1996). Prolactin response to fenfluramine and suicide attempt lethality in major depression. *British Journal of Psychiatry*, 168(3), pp. 324-329.
- Mandelli, L. and Serretti, A. (2013). Gene environment interaction studies in depression and suicidal behavior: An update. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(10 Pt 1), pp. 2375-2397.
- Mann, J.J., Arango, V., Marzuk, P.M., Theccanat, S. and Reis, D.J. (1989). Evidence for the 5-HT hypothesis of suicide. A review of post-mortem studies. *British journal of psychiatry. Supplement*, (8), pp. 7-14.
- Mann, J.J., McBride, P.A., Malone, K.M., DeMeo, M.D. and Keilp, J.G. (1995). Blunted serotonergic responsivity in depressed patients. *Neuropsychopharmacology*, 13(1), pp. 53-64.
- Mann, J.J., Waternaux, C., Haas, G.L. and Malone, K.M. (1999). Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients. *American Journal of Psychiatry*, 156(2), pp. 181-189.
- Mann, J.J. (2003). Neurobiology of suicidal behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(10), pp. 819-828.
- Mann, J.J., Currier, D., Murphy, L., Huang, Y.Y., Galfalvy, H., Brent, D., Greenhill, L. and Oquendo, M. (2008). No association between a TPH2 promoter polymorphism and mood disorders or monoamine turnover. *Journal of Affective Disorders*, 106(1-2), pp. 117-121.
- Mannion, N.M., Greenwood, S.M., Young, R., Cox, S., Brindle, J., Read, D., Nellåker, C., Vesely, C., Ponting, C.P., McLaughlin, P.J., Jantsch, M.F., Dorin, J., Adams, I.R., Scadden, A.D., Ohman, M., Keegan, L.P. and O'Connell, M.A. (2014). The RNA-editing enzyme ADAR1 controls innate immune responses to RNA. *Cell Reports*, 9(4), pp. 1482-1494.
- Marion, S., Weiner, D.M. and Caron, M.G. (2004). RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5-hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4), pp. 2945-2954.
- Martin, C.B., Hamon, M., Lanfumey, L. and Mongeau, R. (2014). Controversies on the role of 5-HT(2C) receptors in the mechanisms of action of antidepressant drugs. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 42, pp. 208-223.
- Marusic, A. (2005). History and geography of suicide: could genetic risk factors account for the variation in suicide rates? *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 133C(1), pp. 43-47.
- Mattick, J.S. and Mehler, M.F. (2008). RNA editing, DNA recoding and the evolution of human cognition. *Trends in Neurosciences*, 31(5), pp. 227-233.
- Mattick, J.S. (2011). The central role of RNA in human development and cognition. *FEBS Letters*, 585(11), 1600-1616.

- McGowan, P.O., Meaney, M.J. and Szyf, M. (2008). Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. *Brain Research*, 1237, pp. 12-24.
- McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., Turecki, G. and Meaney, M.J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience*, 12(3), pp. 342-348.
- Mehler, M.F. and Mattick, J.S. (2007). Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiological Reviews*, 87(3), pp. 799-823.
- Meltzer, H.Y. and Massey, B.W. (2011). The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(1), pp. 59-67.
- Mickey, B.J., Sanford, B.J., Love, T.M., Shen, P.H., Hodgkinson, C.A., Stohler, C.S., Goldman, D. and Zubieta, J.K. (2012). Striatal dopamine release and genetic variation of the serotonin 2C receptor in humans. *Journal of Neuroscience*, 32(27), pp. 9344-9350.
- Mirkovic, B., Laurent, C., Podlipski, M.A., Frebourg, T., Cohen, D. and Gerardin, P. (2016). Genetic Association Studies of Suicidal Behavior: A review of the past 10 years, progress, limitations, and future directions. *Frontiers in Psychiatry*, 7, p. 158.
- Molina-Guzman, G., González-Castro, T.B., Hernández Díaz, Y., Tovilla-Zárate, C.A., Juárez-Rojop, I.E., Guzmán-Priego, C.G., Genis, A., Pool García, S., López-Narvaez, M.L. and Rodriguez-Perez, J.M. (2017). Gender differences in the association between HTR2C gene variants and suicidal behavior in a Mexican population: a case-control study. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 13, pp. 559-566.
- Mościcki, E.K. (1994). Gender differences in completed and attempted suicides. *Annals of Epidemiology*, 4(2), pp. 152-158.
- Mosienko, V., Beis, D., Pasqualetti, M., Waider, J., Matthes, S., Qadri, F., Bader, M. and Alenina, N. (2015). Life without brain serotonin: reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis. *Behavioural Brain Research*, 277, pp. 78-88.
- Mouri, K., Hishimoto, A., Fukutake, M., Shiroyiwa, K., Asano, M., Nagasaki, Y., Ueno, Y., Shirakawa, O., Nishiguchi, N. and Maeda, K. (2009). TPH2 is not a susceptibility gene for suicide in Japanese population. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(8), pp. 1546-1550.
- Murphy, T.M., Ryan, M., Foster, T., Kelly, C., McClelland, R., O'Grady, J., Corcoran, E., Brady, J., Reilly, M., Jeffers, A., Brown, K., Maher, A., Bannan, N., Casement, A., Lynch, D., Bolger, S., Tewari, P., Buckley, A., Quinlivan, L., Daly, L., Kelleher, C. and Malone, K.M. (2011). Risk and protective genetic variants in suicidal behaviour: association with SLC1A2, SLC1A3, 5-HTR1B & NTRK2 polymorphisms. *Behavioral and Brain Functions*, 7, p. 22.

- Must, A., Tasa, G., Lang, A., Vasar, E., Kõks, S., Maron, E. and Väli, M. (2009). Variation in tryptophan hydroxylase-2 gene is not associated to male completed suicide in Estonian population. *Neuroscience Letters*, 453(2), pp. 112-114.
- Nishikura, K. (2010). Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp. 321-349.
- Niswender, C.M., Copeland, S.C., Herrik-Davis, K., Emeson, R.B. and Sanders-Bush, E. (1999). RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), pp. 9472-9478.
- Okada, M., Northup, J.K., Ozaki, N., Russell, J.T., Linnoila, M. and Goldman, D. (2004). Modification of human 5-HT(2C) receptor function by Cys23Ser, an abundant, naturally occurring amino-acid substitution. *Molecular Psychiatry*, 9(1), pp. 55-64.
- Pandey, G.N., Dwivedi, Y., Ren, X., Rizavi, H.S., Faludi, G., Sarosi, A. and Palkovits, M. (2006). Regional distribution and relative abundance of serotonin(2c) receptors in human brain: effect of suicide. *Neurochemical Research*, 31(2), pp. 167-176.
- Perez-Rodriguez, M.M., Weinstein, S., New, A.S., Bevilacqua, L., Yuan, Q., Zhou, Z., Hodgkinson, C., Goodman, M., Koenigsberg, H.W., Goldman, D. and Siever, L.J. (2010). Tryptophan-hydroxylase 2 haplotype association with borderline personality disorder and aggression in a sample of patients with personality disorders and healthy controls. *Journal of Psychiatric Research*, 44(15), pp. 1075-1081.
- Pettersson, F.H., Anderson, C.A., Clarke, G.M., Barrett, J.C., Cardon, L.R., Morris, A.P. and Zondervan, K.T. (2009). Marker selection for genetic case-control association studies. *Nature Protocols*, 4(5), pp. 743-752.
- Post, R.M. (1992). Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *American Journal of Psychiatry*, 149(8), pp. 999-1010.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J. and Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), pp. 559-575.
- Qureshi, I.A. and Mehler, M.F. (2012). Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(8), pp. 528-41.
- R Core Team. (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed 2 Dec. 2014].
- R Core Team. (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed 20 Apr. 2015].
- Risch, N. and Merikangas, K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273(5281), pp. 1516-1517.

- Rosenthal, J.J. and Seeburg, P.H. (2012). A-to-I RNA editing: effects on proteins key to neural excitability. *Neuron*, 74(3), pp. 432-439.
- Rozen, S. and Skaletsky, H.J. (1998). *Primer3*. Available at: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html [Accessed 10 Oct. 2013].
- Ryding, E., Lindström, M. and Träskman-Bendz, L. (2008). The role of dopamine and serotonin in suicidal behaviour and aggression. *Progress in Brain Research*, 172, pp. 307-315.
- Savva, Y.A., Rieder, L.E. and Reenan, R.A. (2012). The ADAR protein family. *Genome Biology*, 13(12), p. 252.
- Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bolton, E., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Federhen, S., Feolo, M., Fingerman, I.M., Geer, L.Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D.J., Lu, Z., Madden, T.L., Madej, T., Maglott, D.R., Marchler-Bauer, A., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Panchenko, A., Phan, L., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Sequeira, E., Sherry, S.T., Shumway, M., Sirotkin, K., Slotta, D., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Wagner, L., Wang, Y., Wilbur, W.J., Yaschenko, E. and Ye, J. (2011). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), pp. D38-D51. doi: 10.1093/nar/gkq1172.
- Schadt, E.E., Molony, C., Chudin, E., Hao, K., Yang, X., Lum, P.Y., Kasarskis, A., Zhang, B., Wang, S., Suver, C., Zhu, J., Millstein, J., Sieberts, S., Lamb, J., GuhaThakurta, D., Derry, J., Storey, J.D., Avila-Campillo, I., Kruger, M.J., Johnson, J.M., Rohl, C.A., van Nas, A., Mehrabian, M., Drake, T.A., Lusk, A.J., Smith, R.C., Guengerich, F.P., Strom, S.C., Schuetz, E., Rushmore, T.H. and Ulrich, R. (2008). Mapping the genetic architecture of gene expression in human liver. *PLoS Biology*, 6(5), p. e107. doi: 10.1371/journal.pbio.0060107.
- Schork, N.J., Murray, S.S., Frazer, K.A. and Topol, E.J. (2009). Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(3), pp. 212-219.
- Schwartz S. (2006). Modern epidemiology approaches to interaction: application to the study of genetic interactions. In: L.M. Hernandez and D.G. Blazer, eds., *Genes, Behavior, and the Social Environment: Moving Beyond the Nature/Nurture Debate*. National Academy of Sciences and Institute of Medicine, Washington, DC: National Academy Press, pp. 310-336.
- Séjourné, J., Llaneza, D., Kuti, O.J. and Page, D.T. (2015). Social Behavioral Deficits Coincide with the Onset of Seizure Susceptibility in Mice Lacking Serotonin Receptor 2c. *PLoS One*, 10(8), e. 0136494.
- Serretti, A., Mandelli, L., Giegling, I., Schneider, B., Hartmann, A.M., Schnabel, A., Maurer, K., Möller, H.J. and Rujescu, D. (2007). HTR2C and HTR1A gene variants in German and Italian suicide attempters and completers. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 144B(3), pp. 291-299.

- Shen, X., Wu, Y., Qian, M., Wang, X., Hou, Z., Liu, Y., Sun, J., Zhong, H., Yang, J., Lin, M., Li, L., Guan, T., Shen, Z. and Yuan, Y. (2011). Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depressive disorder in a female Chinese population. *Journal of Affective Disorders*, 133(3), pp. 619-624.
- Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M. and Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29(1), pp. 308-311.
- Silberberg, G., Lundin, D., Navon, R. and Öhman, M. (2012). Dereglulation of the A-to-I RNA editing mechanism in psychiatric disorders. *Human Molecular Genetics*, 21(2), pp. 311-321.
- Simmons, M., Meador-Woodruff, J.H. and Sodhi, M.S. (2010). Increased cortical expression of an RNA editing enzyme occurs in major depressive suicide victims. *NeuroReport*, 21(15), pp. 993-997.
- Singh, M., Zimmerman, M.B., Beltz, T.G. and Johnson, A.K. (2009). Affect-related behaviors in mice misexpressing the RNA editing enzyme ADAR2. *Physiology & Behavior*, 97(3-4), pp. 446-454.
- Singh, M., Singh, M.M., Na, E., Agassandian, K., Zimmerman, M.B. and Johnson, A.K. (2011). Altered ADAR 2 equilibrium and 5HT(2C) R editing in the prefrontal cortex of ADAR 2 transgenic mice. *Genes, Brain and Behavior*, 10(6), pp. 637-647.
- Slotkin, W. and Nishikura, K. (2013). Adenosine-to-inosine RNA editing and human disease. *Genome Medicine*, 5(11), p. 105.
- Stefulj, J., Büttner, A., Kubat, M., Zill, P., Balijsa, M., Eisenmenger, W., Bondy, B. and Jernej, B. (2004). 5HT-2C receptor polymorphism in suicide victims. Association studies in German and Slavic populations. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 254(4), pp. 224-227.
- Suicide watch. (2014). *Nature*, 506(7487), p.131.
- Tariq, A. and Jantsch, M.F. (2012). Transcript diversification in the nervous system: A to I RNA editing in CNS function and disease development. *Frontiers in Neuroscience*, 6, p. 99.
- Turecki, G., Ernst, C., Jollant, F., Labonté, B. and Mechawar, N. (2012). The neurodevelopmental origins of suicidal behavior. *Trends in Neurosciences*, 35(1), pp. 14-23.
- Underwood, M.D., Khaibulina, A.A., Ellis, S.P., Moran, A., Rice, P.M., Mann, J.J. and Arango, V. (1999). Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biological Psychiatry*, 46(4), pp. 473-483.
- UniProt Consortium. (2009). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), pp. D169-D174. doi: 10.1093/nar/gkn664.

- van der Auwera, S., Janowitz, D., Schulz, A., Homuth, G., Nauck, M., Völzke, H., Rose, M., Meyer zu Schwabedissen, H., Freyberger, H.J. and Grabe, H.J. (2014). Interaction among childhood trauma and functional polymorphisms in the serotonin pathway moderate the risk of depressive disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 264(Suppl 1), pp. S45-S54. doi: 10.1007/s00406-014-0536-2.
- van der Laan, S., Salvetat, N., Weissmann, D. and Molina, F. (2017). Emerging RNA editing biomarkers will foster drug development. *Drug Discovery Today*, doi: 10.1016/j.drudis.2017.01.017.
- van Nas, A., Ingram-Drake, L., Sinsheimer, J.S., Wang, S.S., Schadt, E.E., Drake, T. and Lusk, A.J. (2010). Expression quantitative trait loci: replication, tissue- and sex-specificity in mice. *Genetics*, 185(3), pp. 1059-1068.
- Videtic, A., Peternelj, T.T., Zupanc, T., Balazic, J. and Komel, R. (2009). Promoter and functional polymorphisms of HTR2C and suicide victims. *Genes, Brain and Behavior*, 8(5), pp. 541-545.
- Volders, P.-J., Helsens, K., Wang, X., Menten, B., Martens, L., Gevaert, K., Vandesompele, J. and Mestdagh, P. (2012). LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. D246-D251.
- Volders, P.-J., Verheggen, K., Menschaert, G., Vandepoele, K., Martens, L., Vandesompele, J. and Mestdagh, P. (2014). An update on LNCipedia: a database for annotated human lncRNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), pp. D174-D180.
- Voracek, M. and Loibl, L.M. (2007). Genetics of suicide: a systematic review of twin studies. *Wiener klinische Wochenschrift*, 119(15-16), 463-475.
- Wahlstedt, H., Daniel, C., Ensterö, M. and Öhman, M. (2009). Large-scale mRNA sequencing determines global regulation of RNA editing during brain development. *Genome Research*, 19(6), pp. 978-986.
- Wahlstedt, H. and Ohman, M. (2011). Site-selective versus promiscuous A-to-I editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(6), pp. 761-771.
- Walther, D.J. and Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*, 66(9), pp. 1673-1680.
- Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299(5603), p. 76.
- Wang, Q., O'Brien, P.J., Chen, C.X., Cho, D.S., Murray, J.M. and Nishikura, K. (2000). Altered G protein-coupling functions of RNA editing isoform and splicing variant serotonin 2C receptors. *Journal of Neurochemistry*, 74(3), pp. 1290-1300.
- Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., Hou, Z., Yuan, Y. and Hou, G. (2015). Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with cognition in late-onset depression in a Chinese Han population. *Neuroscience Letters*, 600, pp. 98-103.

- Wang, X. (2016). Improving microRNA target prediction by modeling with unambiguously identified microRNA-target pairs from CLIP-Ligation studies. *Bioinformatics*, 32(9), pp. 1316-1322.
- Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M. and Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7(8), pp. 847-854.
- Werry, T.D., Loiacono, R., Sexton, P.M. and Christopoulos, A. (2008). RNA editing of the serotonin 5HT_{2C} receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. *Pharmacology & Therapeutics*, 119(1), pp. 7-23.
- World Health Organization. (2012a). *Health Evidence Network (HEN) synthesis report: For which strategies of suicide prevention is there evidence of effectiveness?* Copenhagen, Denmark: Regional Office for Europe. Available at: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/data-and-statistics> [Accessed 5 Jan. 2013].
- World Health Organization. (2012b). *Fact sheet - Mental health (RC63 fact sheet on mental health)*. Regional Committee for Europe - 63rd session. Available at: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/215275/RC63-Fact-sheet-MNH-Eng.pdf [Accessed 5 Jan. 2013].
- World Health Organization. (2014). *Preventing suicide: A global imperative*. Geneva, Switzerland: WHO Press, Department of Mental Health and Substance Abuse. Available at: http://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/exe_summary_english.pdf?ua=1 [Accessed 10 Dec. 2014].
- Yang, W., Wang, Q., Kanes, S.J., Murray, J.M. and Nishikura, K. (2004). Altered RNA editing of serotonin 5-HT_{2C} receptor induced by interferon: implications for depression associated with cytokine therapy. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 124(1), pp. 70-78.
- Zhang, X., Beaulieu, J-M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R. and Caron, M.G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*, 305(5681), p. 217.
- Zhang, J., Shen, Y., He, G., Li, X., Meng, J., Guo, S., Li, H., Gu, N., Feng, G. and He, L. (2008). Lack of association between three serotonin genes and suicidal behavior in Chinese psychiatric patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(2), pp. 467-471.
- Zhang, Y., Zhang, C., Yuan, G., Yao, J., Cheng, Z., Liu, C., Liu, Q., Wan, G., Shi, G., Cheng, Y., Ling, Y. and Li, K. (2010). Effect of tryptophan hydroxylase-2 rs7305115 SNP on suicide attempts risk in major depression. *Behavioral and Brain Functions*, 6, p. 49.

- Zhou, Z., Roy, A., Lipsky, R., Kuchipudi, K., Zhu, G., Taubman, J., Enoch, M.A., Virkkunen, M. and Goldman, D. (2005). Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. *Archives of General Psychiatry*, 62(10), pp. 1109-1118.
- Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Möller, H.J., Ackenheil, M. and Bondy, B. (2007a). Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *Journal of Psychiatric Research*, 41(1-2), pp. 168-173.
- Zill, P., Preuss, U.W., Koller, G., Bondy, B. and Soyka, M. (2007b). SNP and haplotype analysis of the tryptophan hydroxylase 2 gene in alcohol-dependent patients and alcohol-related suicide. *Neuropsychopharmacology*, 32(8), pp. 1687-1694.
- Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Müller, J., Möller, H.J. and Bondy, B. (2009). Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: a postmortem study in human brain. *Neuroscience*, 159(4), pp. 1274-1282.
- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G.R., Auton, A., Brooks, L.D., DePristo, M.A., Durbin, R.M., Handsaker, R.E., Kang, H.M., Marth, G.T. and McVean, G.A. (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491(7422), pp. 56-65.

Elektronske baze podataka

- 1000 Genomes. Available at: <http://www.1000genomes.org> [Accessed 2 Oct. 2013].
- dbSNP/NCBI. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> [Accessed 2 Oct. 2013].
- Ensembl. Available at: <http://www.ensembl.org> [Accessed 10 Oct. 2013].
- GTEEx Consortium. (2016). Available at: http://www.gtexportal.org/static/misc/GTEEx_Consortium_Member_List_September_2016.pdf [Accessed 15 Jan. 2017].
- HapMap project. Available at: <http://www.hapmap.org> [Accessed 31 Oct. 2011].
- LNCipedia. Available at: <http://www.lncipedia.org> [Accessed 15 Jan. 2017].
- miRDB. Available at: <http://http://mirdb.org/miRDB> [Accessed 15 Jan. 2017].
- PolyPhen. Available at: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2> [Accessed 13 Dec. 2013].
- Regulome. Available at: <http://regulome.stanford.edu> [Accessed 13 Dec. 2013].
- SIFT Available at: <http://sift.jcvi.org> [Accessed 13 Dec. 2013].
- The Genotype-Tissue Expression (GTEEx) Project. Available at: <http://www.gtexportal.org> [Accessed 15 Jan. 2017].
- UniProt. Available at: <http://www.uniprot.org> [Accessed 31 Oct. 2011].
- University of California Santa Cruz (UCSC). Available at: <http://genome.ucsc.edu> [Accessed 31 Oct. 2011].

Programi

- Haploview. Available at: <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview> [Accessed 31 Oct. 2011].
- Plink. Available at: <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink> [Accessed 15 Nov. 2014].
- Primer3web. Available at: <http://bioinfo.ut.ee/primer3> [Accessed 10 Oct. 2013].
- R. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed 2 Dec. 2014] [Accessed 20 Apr. 2015].
- Quanto. Available at: <http://biostats.usc.edu/Quanto.html> [Accessed 14 Dec. 2014].

8. Prilozi

8.1. Upitnik LTE-Q za procenu akutnih stresnih događaja

LTE-Q ispituje sledećih 12 kategorija događaja koji mogu imati dugoročne posledice (Brugha et al., 1985):

1. Ozbiljno oboljenje ili povreda ispitanika lično
2. Ozbiljno oboljenje ili povreda bliskog rođaka
3. Smrt rođaka prvog stepena, uključujući dete ili supružnika
4. Smrt bliskog porodičnog prijatelja ili rođaka drugog stepena
5. Razvod usled problema u braku
6. Prekid stabilne veze
7. Ozbiljan problem sa bliskim prijateljem, komšijom ili rođakom
8. Nezaposlenost/trazenje posla u trajanju dužem od jednog meseca
9. Otpuštanje sa posla
10. Velika finansijska kriza
11. Problemi sa policijom i pojavljivanje na sudu
12. Izgubljeno ili ukradeno nešto vredno

8.2. Asocijacija interakcija varijante rs4290270 gena *TPH2* i domena zlostavljanja iz detinjstva sa pokušajem samoubistva kod psihijatrijskih bolesnika

Tabela 8.2.1. Asocijacija interakcija varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema kodominantnom modelu nasleđivanja, i tri domena stresnih događaja iz detinjstva (opšte traume, fizičko i emocionalno zlostavljanje) sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika.

Varijabla	Ukupan uzorak	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	P ^a
Broj ispitanika (%)				
‘rs4290270 x ETI-SR skor za opšte traume’				
TT x 0	44 (12.6)	13 (8.0)	31 (16.7)	0.029
AT x 0	65 (18.7)	28 (17.3)	37 (19.9)	
AA x 0	23 (6.6)	11 (6.8)	12 (6.4)	
TT x ≥1	91 (26.2)	53 (32.7)	38 (20.4)	
AT x ≥1	99 (28.4)	47 (29.0)	52 (28.0)	
AA x ≥1	26 (7.5)	10 (6.2)	16 (8.6)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za fizičko zlostavljanje’				
TT x 0	66 (19.0)	29 (17.9)	37 (19.9)	0.610
AT x 0	83 (23.9)	39 (24.1)	44 (23.7)	
AA x 0	29 (8.3)	12 (7.4)	17 (9.1)	
TT x ≥1	69 (19.8)	37 (22.8)	32 (17.2)	
AT x ≥1	81 (23.3)	36 (22.2)	45 (24.2)	
AA x ≥1	20 (5.7)	9 (5.6)	11 (5.9)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za emocionalno zlostavljanje’				
TT x 0	57 (16.4)	28 (17.3)	29 (15.6)	0.480
AT x 0	72 (20.7)	34 (21.0)	38 (20.4)	
AA x 0	23 (6.6)	8 (4.9)	15 (8.1)	
TT x ≥1	78 (22.4)	38 (23.5)	40 (21.5)	
AT x ≥1	92 (26.4)	41 (25.3)	51 (27.4)	
AA x ≥1	26 (7.5)	13 (8.0)	13 (7.0)	

SA: pokušaj samoubistva; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory–Self Report*.

^aLogistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama.

Tabela 8.2.2. Asocijacije interakcija varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema recesivnom modelu nasleđivanja, i tri domena stresnih događaja iz detinjstva (opšte traume, fizičko i emocionalno zlostavljanje) sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika.

Varijabla	Ukupan uzorak	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	P ^a
Broj ispitanika (%)				
‘rs4290270 x ETI-SR skor za opšte traume’				
T- x 0	109 (31.3)	41 (25.3)	68 (36.6)	0.093
AA x 0	23 (6.6)	11 (6.8)	12 (6.4)	
T- x ≥1	190 (54.6)	100 (61.7)	90 (48.4)	
AA x ≥1	26 (7.5)	10 (6.2)	16 (8.6)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za fizičko zlostavljanje’				
T- x 0	149 (42.8)	68 (42.0)	81 (43.6)	0.840
AA x 0	29 (8.3)	12 (7.4)	17 (9.1)	
T- x ≥1	150 (43.1)	73 (45.0)	77 (41.4)	
AA x ≥1	20 (5.8)	9 (5.6)	11 (5.9)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za emocionalno zlostavljanje’				
T- x 0	129 (37.1)	62 (38.3)	67 (36.0)	0.240
AA x 0	23 (6.6)	8 (4.9)	15 (8.0)	
T- x ≥1	170 (48.8)	79 (48.8)	91 (49.0)	
AA x ≥1	26 (7.5)	13 (8.0)	13 (7.0)	

SA: pokušaj samoubistva; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory–Self Report*.

^aLogistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama.

Tabela 8.2.3. Asocijacije interakcija varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema overdominantnom modelu nasleđivanja, i tri domena stresnih događaja iz detinjstva (opšte traume, fizičko i emocionalno zlostavljanje) sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika.

Varijabla	Ukupan uzorak	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	P ^a
Broj ispitanika (%)				
‘rs4290270 x ETI-SR skor za opšte traume’				
TT/AA x 0	67 (19.3)	24 (14.8)	43 (23.1)	0.220
AT x 0	65 (18.7)	28 (17.3)	37 (19.9)	
TT/AA x ≥1	117 (33.6)	63 (38.9)	54 (29.0)	
AT x ≥1	99 (28.4)	47 (29.0)	52 (28.0)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za fizičko zlostavljanje’				
TT/AA x 0	95 (27.3)	41 (25.3)	54 (29.0)	0.390
AT x 0	83 (23.8)	39 (24.1)	44 (23.7)	
TT/AA x ≥1	89 (25.6)	46 (28.4)	43 (23.1)	
AT x ≥1	81 (23.3)	36 (22.2)	45 (24.2)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za emocionalno zlostavljanje’				
TT/AA x 0	80 (23.0)	36 (22.2)	44 (23.7)	0.470
AT x 0	72 (20.7)	34 (21.0)	38 (20.4)	
TT/AA x ≥1	104 (29.9)	51 (31.5)	53 (28.5)	
AT x ≥1	92 (26.4)	41 (25.3)	51 (27.4)	

SA: pokušaj samoubistva; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory–Self Report*.

^aLogistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama.

Tabela 8.2.4. Asocijacije interakcija varijante rs4290270 gena *TPH2*, prema aditivnom modelu nasleđivanja, i tri domena stresnih događaja iz detinjstva (opšte traume, fizičko i emocionalno zlostavljanje) sa pokušajem samoubistva kod ispitivanih psihijatrijskih bolesnika.

Varijabla	Ukupan uzorak	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	P ^a
Broj ispitanika (%)				
‘rs4290270 x ETI-SR skor za opšte traume’				
TT x 0	44 (12.6)	13 (8.0)	31 (16.7)	0.029
AT x 0	65 (18.7)	28 (17.3)	37 (19.9)	
AA x 0	23 (6.6)	11 (6.8)	12 (6.4)	
TT x ≥1	91 (26.2)	53 (32.7)	38 (20.4)	
AT x ≥1	99 (28.4)	47 (29.0)	52 (28.0)	
AA x ≥1	26 (7.5)	10 (6.2)	16 (8.6)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za fizičko zlostavljanje’				
TT x 0	66 (19.0)	29 (17.9)	37 (19.9)	0.610
AT x 0	83 (23.9)	39 (24.1)	44 (23.7)	
AA x 0	29 (8.3)	12 (7.4)	17 (9.1)	
TT x ≥1	69 (19.8)	37 (22.8)	32 (17.2)	
AT x ≥1	81 (23.3)	36 (22.2)	45 (24.2)	
AA x ≥1	20 (5.7)	9 (5.6)	11 (5.9)	
‘rs4290270 x ETI-SR skor za emocionalno zlostavljanje’				
TT x 0	57 (16.4)	28 (17.3)	29 (15.6)	0.480
AT x 0	72 (20.7)	34 (21.0)	38 (20.4)	
AA x 0	23 (6.6)	8 (4.9)	15 (8.1)	
TT x ≥1	78 (22.4)	38 (23.5)	40 (21.5)	
AT x ≥1	92 (26.4)	41 (25.3)	51 (27.4)	
AA x ≥1	26 (7.5)	13 (8.0)	13 (7.0)	

SA: pokušaj samoubistva; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory–Self Report*.

^aLogistička regresija sa poravnanjem po psihijatrijskim dijagnozama.

8.3. Raspodela ispitanika prema genotipovima rs4290270 gena *TPH2* i rs4819035 gena *ADARBI* i opštim traumama iz detinjstva

Tabela 8.3.1. Raspodela ispitanika za svaku kombinaciju genotipa varijante rs4290270 gena *TPH2*, genotipa varijante rs4819035 gena *ADARBI* i skora ETI-SR za opšte traume.

ETI-SR skor za opšte traume	Bolesnici sa SA	Bolesnici bez SA	Genotipovi 'rs4290270 ^a x rs4819035 ^b '
0	7	20	'TT x TT'
≥1	31	23	
0	5	6	'TT x TG'
≥1	17	12	
0	1	5	'TT x GG'
≥1	5	3	
0	25	36	'A- x TT'
≥1	29	47	
0	13	12	'A- x TG'
≥1	22	21	
0	1	1	'A- x GG'
≥1	6	0	

SA: pokušaj samoubistva; ETI-SR: upitnik *Early Trauma Inventory–Self Report*.

^adominantan model;

^baditivan model.

Biografija autora

Jelena N. Karanović rođena je 2. januara 1984. godine u Negotinu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomске studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2003/2004. godine i završila ih u roku sa prosečnom ocenom 9.40. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota, upisala je 2009. godine. U periodu od maja do novembra 2009. godine bila je angažovana kao stručni saradnik za oblast medicinske dijagnostike naslednih bolesti i oblast utvrđivanja očinstva u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U periodu od novembra 2009. do decembra 2011. godine bila je angažovana kao saradnik u nastavi za užu naučnu oblast Biohemija i molekularna biologija na Katedri za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Tada je učestvovala u izvođenju praktične nastave na kursevima Osnovi molekularne biologije i Molekularna biologija eukariota. U decembru 2011. izabrana je u zvanje istraživač-pripravnik, a u julu 2013. godine unapređena u zvanje istraživač saradnik. U periodu od 2014. godine kao student doktorant učestvuje u teorijskoj nastavi na kursu Molekularna genetika humanih bolesti, a od 2017. godine ponovo je angažovana u praktičnoj nastavi na kursu Molekularna biologija eukariota. Bila je član komisije za odbranu četiri diplomatska rada i član komisije za ocenu i odbranu radova učenika srednjih škola na Republičkom takmičenju iz biologije. Učestvovala je na tri nacionalna projekta osnovnih istraživanja i jednom bilateralnom projektu sa Slovenijom. Koautor je dva rada kategorije M21 i M22, jednog poglavlja u knjizi kategorije M14 i dva rada van JCR liste. Koautor je i četiri saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M34) i šest saopštenja na nacionalnim naučnim skupovima štampanih u izvodu (M64). Radovi autora su do aprila 2017. godine citirani 19 puta u časopisima sa JCR liste i šest puta u časopisima van JCR liste (bez autocitata).

KLINIČKI CENTAR SRBIJE
ETIČKI ODBOR
Broj: 3672/10
Dana: 28.06.2012. godine
Beograd, Pasterova br. 2

Na osnovu odredaba Zakona zdravstvenoj zaštiti Republike Srbije („Službeni glasnik RS“ br. 107/05, 72/09, 88/10, 99/10 i 57/11), Zakona o proizvodnji i prometu lekova („Službeni glasnik RS“ br. 30/2010), Pravilnika o uslovima i načinu kliničkog ispitivanja leka, postupku i sadržaju dokumentacije za odobrenje kliničkog ispitivanja leka („Službeni glasnik RS“ br. 64/2011), Poslovnika o radu Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije br. 3098/39 od 26.04.2012. god., postupajući u skladu sa Načelima dobre kliničke prakse (GCP), Etički odbor Kliničkog centra Srbije u sastavu: Prof. dr Živan Maksimović, Prof. dr Ana Šijački, Doc. dr Radomir Naumović, Doc. dr Arsen Ristić, Doc. dr Tatjana Božanović, Dr Žikica Jovičić, Prof. dr Nadežda Čovičković-Šternić, Prof. dr Vesna Bumbaširević, Prof. dr Aleksandar Lešić, Biljana Spasić-dipl. pravnik, Protojerej stavrofor Stevo Vlačić-sveštenik SPC, odlučujući o zahtevu Dr Maje Ivković, na svojoj 11. sednici održanoj dana 28.06.2012. godine, doneo je sledeću

O D L U K U

Odobrava se sprovođenje ispitivanja u svrhu izrade doktorske disertacije pod nazivom: „Asocijacija genetičkih varijanti adenzin dezaminaza koje deluju na dvolančanu RNK sa depresivnim poremećajem, bipolarnim afektivnim poremećajem i shizofrenijom“.

Glavni istraživač i komentor rada je Dr Maja Ivković (Klinika za psihijatriju).

Članovi istraživačkog tima su: Jelena Miladinović, istraživač saradnik, Prof. dr Dušanka Savić-Pavićević-mentor doktorske disertacije i Miloš Brkušanin, istraživač saradnik.

Ispitivanje će biti sprovedeno na Klinici za psihijatriju Kliničkog centra Srbije, a eksperimentalni deo u laboratoriji Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Centar za humanu molekularnu genetiku) na osnovu sledeće dokumentacije:

- 1). Saglasnost Kolegijuma i direktora Klinike za psihijatriju KCS,
- 2). Sažetak Protokola ispitivanja (obrazloženje teme),
- 3). Informacija za pacijenta sa Obrascem za davanje pisanog pristanka,
- 4). Biografija Dr Maje Ivković,

5). Biografija Jelene Miladinović,

6). Izjava istraživača saradnika, mentora rada i dekana Biološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu



ZAMENIK PREDSEDNIKA
ETICKOG ODBORA
Prof. dr Ana Šijački



ORIGINAL INVESTIGATION

Joint effect of *ADARB1* gene, *HTR2C* gene and stressful life events on suicide attempt risk in patients with major psychiatric disorders

JELENA KARANović¹, SAŠA ŠVIKOVIĆ¹, MAJA PANTOVIĆ², SVETLANA DURICA¹, GORAN BRAJUŠKOVIĆ¹, ALEKSANDAR DAMJANOVIĆ^{2,3}, VLADIMIR JOVANOVIĆ⁴, MAJA IVKOVIĆ^{2,3}, STANKA ROMAC¹ & DUŠANKA SAVIĆ PAVIĆEVIĆ¹

¹Center for Human Molecular Genetics, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, ²Clinic for Psychiatry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia, ³Medical School, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, and ⁴Department of Genetic Research, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Abstract

Objectives. Adenosine to inosine RNA editing, serotonin 2C receptor (*HTR2C*), and stressful life events (SLEs) have all been implicated in suicidal behaviour. We examined the main and moderating effects of RNA editing (*ADAR*, *ADARB1*) and *HTR2C* genes, childhood trauma (CT), recent SLEs and psychiatric disorders as contributors to suicide attempt (SA) vulnerability. **Methods.** Study included 165 suicide attempters and 188 suicide non-attempters, all diagnosed with one of major psychiatric disorders. CT and recent SLEs were assessed using Early Trauma Inventory–Self Report and List of Threatening Experiences Questionnaire, respectively. Selected *ADAR* and *ADARB1* tag-variants, and *HTR2C* rs6318 were pre-screened for association with SA, while generalized linear models and backward selection were applied to identify individual and interacting SA risk factors. **Results.** *ADARB1* rs9983925 and rs4819035 and *HTR2C* rs6318 were associated with SA. The best minimal model found emotional abuse, recent SLEs, rs9983925 and rs6318 as independent SA risk factors, and general traumas as a factor moderating the effect of psychiatric disorders and emotional abuse. **Conclusions.** SA vulnerability in psychiatric patients is related to the joint effect of *ADARB1* and *HTR2C* variants, the existing mood disorder and the cumulative exposures to a various childhood and recent stressful experiences.

Key Words: suicide attempted, RNA editing, serotonin 2C receptor, stressful events, risk factors

Introduction

Suicidal behaviour is a growing public health problem without efficient prevention and treatment. Average prevalence rate of completed suicide is 13.9/100,000 people per year in Europe (WHO 2012), and 18.15/100,000 in Serbia (Dedic 2014). Suicide attempt (SA) is defined as the occurrence of self-directed injurious acts with at least some intent to end one’s own life (Mann 2003). It has 10–20 times greater rate than completed suicide (Mann 2003), and occurs about three times more likely in females (Moscicki 1994).

Suicidal behaviour is a complex phenotype caused by a numerous risk factors and their interactions. According to the “stress-diathe-sis” model, the diathesis (predisposition) of the suicidal behaviour determines vulnerability on stress conditions which

trigger the suicidal act (Mann 2003). The “diathesis” component is determined with the distal risk factors, including genetic and epigenetic factors, childhood trauma (CT) and personality traits, while the “stress” component comprises proximal risk factors, such as acute stressful life events (SLEs) and psychiatric disorders (Turecki et al. 2012). The vast majority of individuals have a psychiatric disorder at the time of the SA, mostly a mood disorder (Beautrais et al. 1996). All examined types of CT increase the risk for SA 2–5-fold throughout the life (Dube et al. 2001), and most evidences have been provided for physical and sexual abuse (Brezo et al. 2008; Brodsky and Stanley 2008). Recent SLEs are the most frequently implicated trigger for SA, even in individuals without psychiatric disorder (Liu and Miller 2014).

Estimated heritability of SA is 17–55% (Brent and Mann 2005), but the underlying genes are mostly unknown and partially independent of those responsible for psychiatric disorders (Brezo et al. 2010). Common variants in serotonergic system genes have been associated with suicidal behaviour and certain intermediate phenotypes (Antypa et al. 2013). These genetic studies were initiated with a numerous neurobiological findings relating the deficiency in the serotonergic system to the suicidal behaviour (Mann 2003; Ryding et al. 2008). Moreover, some of the serotonergic system genes can moderate the effects of CT on SA (Brezo et al. 2010).

The serotonin 2C receptor (HTR2C) is postsynaptic, G protein-coupled receptor with constitutive activity, involved in regulation of feeding, sleep and anxiety (Barnes and Sharp 1999). HTR2C mediates the effects of antidepressant (Martin et al. 2014) and atypical antipsychotics (Meltzer and Massey 2011). No association of HTR2C variants with SA has been observed in a few psychiatric samples (Lerer et al. 2001; Serretti et al. 2007; Zhang et al. 2008), and the significant association has only been reported for functional rs6318 (Cys23Ser) variant in Slovenian suicide victims (Videtic et al. 2009). Ser23 isoform was constitutively more active in an *in situ* reconstruction system, and displayed a lower serotonin affinity in cultured mammalian cells, likely due to higher desensitization (Okada et al. 2004).

HTR2C is the only serotonin receptor whose pre-mRNA undergoes to site-specific adenosine to inosine (A-to-I) editing (Burns et al. 1997). Depending on the pattern of edited sites, 24 receptor isoforms with different functional and pharmacological properties can be produced (Werry et al. 2008). HTR2C pre-mRNA editing, generally, reduces the cell response to serotonin and rapidly responses to the synaptic changes in the level of serotonin or pharmacological agents (Werry et al. 2008). Therefore, it represents a dynamic adaptive mechanism which keeps optimal receptor activity. Hyperediting of HTR2C pre-mRNA has been observed in the post-mortem brains of psychiatric suicide victims (Dracheva et al. 2008; Iwamoto et al. 2009; Lyddon et al. 2013), and in mice strains with lower forebrain serotonin level under the acute stress and the early-life (Englander et al. 2005; Bhansali et al. 2007).

A-to-I RNA editing is catalysed by adenosine deaminases acting on RNA, ADAR and ADARB1 (Nishikura 2010). Increased expression of deficient ADARB1 mRNA variant has been described in the postmortem brains of suicide victims with schizophrenia (SCH) and bipolar disorder (BD) (Silberberg et al. 2012). Decreased expression of ADARB1 mRNA (Lyddon et al. 2013) and increased expression of ADAR mRNA (Simmons et al. 2010) have

been observed in suicide victims with major depressive disorder (MDD). Transgenic mice misexpressing the catalytically active rat's ADARB1 isoform (Singh et al. 2007) is rodent model of endogenous behavioural despair and anxiety (Singh et al. 2009), indicating that genetically determined differences in ADARB1 expression level may be involved in the psychiatric pathologies. However, association of common variants in ADARs genes with suicidal behaviour and psychiatric disorders was not studied to date.

In this study, our initial focus was to screen for association of variants in ADAR, ADARB1 and HTR2C genes with SA in Serbian patients with major psychiatric disorders. Our next aim was to identify distal and proximal risk factors that may differentiate between psychiatric patients who attempted suicide and those who did not. For that reason, we considered the main and moderating effects of associated genetic factors, stressful life events experienced in the early-life or recently, and psychiatric disorders. The assessment of variants in ADARs genes as SA risk factors is novelty in our study, which enabled us to elucidate genetically determined involvement of A-to-I RNA editing in the suicidal behaviour.

Methods

Subjects

A case-only association study enrolled 353 unrelated patients diagnosed with MDD, BD and SCH. All patients were of Serbian origin (i.e., both their parents were Serbian). The demographic data on age and gender were recorded. The diagnosis was established by applying Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (First et al. 1996). All patients were recruited after a 5-week hospitalization at the Department of Psychiatry at Clinical Centre of Serbia between 2006 and 2012. The patients hospitalized immediately after SA were referred to as suicide attempters (SAs), while the patients hospitalized due to recurrence of the disease and who had never attempted suicide were referred to as suicide non-attempters (non-SAs). Written informed consent was obtained from all subjects after a detailed discussion on the study aims and requirements. All subjects were capable to give informed consent, as assessed independently by two psychiatrists. The study was approved by the Ethics Committee of the Clinical Centre of Serbia, according to the approval requirements and good clinical practice.

Assessment of CT and recent SLEs

CT was assessed in all patients by applying the Early Trauma Inventory–Self Report (ETI-SR), a 62-item self-report instrument evaluating four domains of

traumatic experiences before the age of 18: physical, emotional (EA) and sexual abuse, and general traumas (GTs; Bremner et al. 2007). GTs comprise a range of stressful and traumatic events that are mostly secondary to chance events, or events perpetrated by a stranger with a specific intent to harm the victim (Bremner et al. 2007).

Recent SLEs were assessed using the List of Threatening Experiences Questionnaire (LTE-Q), a 12-item instrument designed to detect events with long-term threat (Brugha et al. 1985). SLEs that occurred over 12 months prior the SA for all SAs, or over 12 months prior the recurrence of the disease for all non-SAs were evaluated independently by two psychiatrists. The assessment included questions whether patients experienced any of 12 items, confirmation that an experienced event occurred during the index period and additional information to evaluate that an endorsed event fulfilled LTE-Q item criterion.

Scoring for ETI-SR and LTE-Q was performed by counting the number of endorsed items.

Selection of ADAR and ADARB1 tagSNVs

For *ADAR* and *ADARB1* genes we selected tagSNVs (single nucleotide variants) as proxies for other nearby SNVs in high linkage disequilibrium (LD). The regions of interest included the entire *ADAR* gene extended by 10 kb both upstream and downstream, and *ADARB1* region coding deaminase domain and 3' untranslated region (UTR). Tagging method was performed according to Pettersson et al. (2009). In brief, locations of the regions of interest in the human genome NCBI B36 assembly (*ADAR* at Chr1:152821159-152867061, *ADARB1* at Chr21:45426957-45470902) and the list of functional SNVs were retrieved from the UCSC browser (<http://genome.ucsc.edu>). All SNVs in examined regions and their genotype frequencies in CEPH population were retrieved from the HapMap database, release 27 (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). TagSNVs selection was performed by the Haploview software, ver. 4.2 (www.broad.mit.edu/mpg/haploview) following the next parameters: minor allele frequency $MAF \geq 0.05$, correlation coefficient $r^2 \geq 0.8$, "Pairwise tagging only" to allow all tagSNVs to act as direct proxies to all other captured SNVs, and "Load includes" to force the inclusion of functional SNVs. A total of 12 tagSNVs capturing 44 SNVs were selected from *ADAR* region, while 11 tagSNVs capturing 38 SNVs were selected from *ADARB1* region (Supplementary Table I available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>). The chromosome position, the gene location, the MAF for European population (<http://www.1000genomes.org>), and the Regulome database

annotation (<http://regulome.stanford.edu/>) for all examined SNVs are presented in Supplementary Table II (available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>). LD structure of the regions of interest, obtained by the Haploview software, revealed that the entire *ADAR* gene was contained within a single haploblock (Supplementary Figure 1 available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>), while there were two haploblocks across the *ADARB1* region (Supplementary Figure 2 available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>).

Genotyping

Blood sample was taken from all subjects. DNA was isolated using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genotyping was performed by allelic discrimination assay using TaqMan[®] Pre-Designed SNP Genotyping Assay (Life Technologies, Grand Island, USA) for all examined SNVs. The assay IDs for all analysed SNVs are shown in Supplementary Table I available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>. The contribution of fluorescent signal from each allele in each sample was analyzed using SDS software, ver. 1.2 (Applied Biosystems, Warrington, UK). For each assay, ~10% randomly selected samples were genotyped in duplicate with 100% concordance.

Statistical analyses

The differences in gender, psychiatric diagnoses and ETI-SR and LTE-Q scores between SAs and non-SAs were tested using Pearson's χ^2 -test. The difference in the patients' mean age was tested using unpaired *t*-test. The tests were performed in R package, ver. 3.1.0 (R Core Team 2014).

In order to pre-select significantly associated SNVs, which will be included in subsequent haplotype analyses and generalized linear models fitting, we used tests implemented in PLINK, ver. 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). Pearson's χ^2 -test was applied to test allelic associations, while logistic regression adjusted by psychiatric diagnoses was used to test genotypic associations. The probability of all possible haplotypes in *ADARB1* haploblock 2 was assessed by the E-M algorithm. The haplotype analyses, concerning only common ones ($\geq 5\%$), were performed using Pearson's χ^2 -test and logistic regression adjusted by psychiatric diagnoses. To correct for multiple testing bias, 10^6 permutations test was applied in all association analyses using PLINK's max(T) permutation procedure. The

Table I. Demographic characteristics and psychiatric diagnoses of the examined psychiatric patients.

	Total sample (<i>n</i> = 353)	Suicide attempters (<i>n</i> = 165) (46.74%)	Suicide non-attempters (<i>n</i> = 188) (53.26%)	<i>P</i>
Mean age (SD)	41.99 (11.64)	42.31 (11.71)	41.71 (11.60)	0.629 ^a
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
Gender				
Males	124 (35.13)	54 (32.73)	70 (37.23)	0.376 ^b
Females	229 (64.87)	111 (67.27)	118 (62.77)	
Psychiatric diagnosis				
Major depressive disorder	142 (40.23)	75 (45.45)	67 (35.64)	0.066 ^b
Bipolar disorder	80 (22.66)	39 (23.64)	41 (21.81)	
Schizophrenia	131 (37.11)	51 (30.91)	80 (42.55)	

No statistically significant differences of the mean age and gender were found between suicide attempters and suicide-non attempters, while there was statistical trend in the difference of psychiatric diagnoses between two groups.

^aUnpaired *t*-test.

^bPearson's χ^2 -test.

n, number of subjects; SD, standard deviation.

significance level was set to 0.05 in all analyses. The odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) was used as a measure of the strength of an association. Since this is the case-only study, we did not consider Hardy–Weinberg equilibrium.

The average statistical power of the study for a single SNV association was estimated by QUANTO (<http://biostats.usc.edu/Quanto.html>), following the next parameters: OR = 1.556 (average OR for significantly associated SNVs in our study), MAF = 0.273 (average MAF for all SNVs included in the study), the additive model of inheritance, type I error $\alpha = 0.05$, and SA rate = 0.2% (calculated as completed suicide rate in Serbia (18.15/100000) multiplied with 10).

The best minimal model explaining the variation in SA risk with a small set of predictor variables was fitted by generalized linear models (GLM) with binomial response and logit linking function. Full model included the next predictor variables: patients' gender and age, three significantly associated SNVs following pre-screening, ETI-SR scores for all four domains of CT, LTE-Q score and psychiatric diagnoses, as well as interactions between those factors. The backward selection was performed with predictor variables being eliminated from the model in an iterative process if the significance level was > 0.05 . We used the Akaike information criterion (AIC) for model comparison and selection, and the chosen best fitting model was the one with the lowest AIC value. GLM fitting and backward selection were performed in R package, ver. 3.1.0 (R Core Team 2014).

Results

Patients' characteristics

Demographic characteristics and psychiatric diagnoses of patients are shown in Table I. The sample

included 142 (40.23%) MDD, 80 (22.66%) BD and 131 (37.11%) SCH subjects. Among them, 165 (46.74%) had attempted suicide, while 188 (53.26%) had never attempted suicide. SAs and non-SAs did not differed according to the mean age ($P = 0.629$) and gender ($P = 0.376$). Female to male ratio was ~2:1 in total sample (229:124), as well as in SAs and non-SAs (111:54 vs. 118:70). The difference in psychiatric diagnoses between two groups showed statistical trend ($P = 0.066$): MDD was somewhat more frequent in SAs (75 vs. 67), while SCH was less frequent (51 vs. 80). Therefore, psychiatric diagnoses were included as a covariate in subsequent logistic regression analyses.

Frequency distributions of ETI-SR scores for GTs and EA, and LTR-Q score for recent SLEs were significantly different between SAs and non-SAs ($P = 0.006$, $P = 0.040$ and $P = 0.014$, respectively) (Table II). ETI-SR scores for physical and sexual

Table II. Impact of childhood trauma and recent stressful life events on suicide attempt risk across psychiatric patients.

Stressful life events	df	χ^2	<i>P</i> ^a
<i>Childhood trauma</i>			
General traumas	4	14.379	0.006
Physical abuse	4	3.491	0.479
Emotional abuse	5	11.637	0.040
Sexual abuse	1	2.049	0.152
Recent stressful life events	5	14.19	0.014

Statistically significant differences of ETI-SR scores for general traumas and emotional abuse and LTR-Q score for recent stressful life events were found between suicide attempters (165 individuals) and suicide non-attempters (188 individuals). Significant *P*-values are shown in bold.

^aPearson's χ^2 -test.

df, degrees of freedom; χ^2 , test statistics.

abuse did not show significant differences ($P > 0.05$) (Table II).

Associations between single SNVs and SA

ADARB1 rs9983925 and rs4819035, and *HTR2C* rs6318 showed significant association with SA in Serbian psychiatric patients. The minor allele T of rs9983925 decreased the risk for SA ($P = 0.028$, OR = 0.705), while the minor allele G of rs4819035 and the minor allele C of rs6318 increased the risk ($P = 0.028$, OR = 1.495 and $P = 0.017$, OR = 1.755, respectively) (Table III). Allelic association for X-linked rs6318 was not significant when females and males were analyzed separately (data not shown). The observed allelic associations were confirmed by 10e6 permutations test ($P < 0.05$) (Table III). The results of allelic association tests for all 24 analyzed SNVs are shown in Supplementary Table III available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>.

As the significant association in an allelic test is indicative for increased risk with each additional copy of the risk allele, we assumed the additive model as the underlying one for significantly associated SNVs. In accordance with our assumption, the genotypic tests revealed the significant result only for the additive model (rs9983925: $P = 0.032$, OR = 0.710; rs4819035: $P = 0.042$, OR = 1.437; rs6318: $P = 0.027$, OR = 1.634) (Table IV). The adjustment for multiply testing by 10e6 permutations test supported the obtained results ($P < 0.05$) (Table IV). For X-linked rs6318, only general and additive models were assessed and hemizygous males were coded as homozygous. The estimated average power of our

study to detect an association of a single SNV with OR = 1.556 was 77.6%.

According to the LD structure of *ADARB1* region, rs9983925 resides between two haploblocks, while rs4819035 belongs to the haploblock 2 (Supplementary Figure 2 available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>). Haploview tagging output revealed that both of them do not serve as a proxy (tagSNV) for other nearby SNVs (Supplementary Table I available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>), implying their direct association with SA.

ADARB1 rs4819035 is the 3' UTR variant with 1f Regulome score (Supplementary Table II available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>), predicating that variant represents *cis* eQTL (expression quantitative trait locus) and likely affects transcriptional factor binding. *ADARB1* rs9983925 is located in the intron 8 and there is no data about its functional relevance.

Association between *ADARB1* haploblock 2 and SA

Four common haplotypes in *ADARB1* haploblock 2 (rs9637192-rs2253763-rs4819035), mapping to the 3' end of the gene (Supplementary Figure 2 available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15622975.2014.1000374>), were observed in SAs and non-SAs (Table V). Pearson's χ^2 -test and logistic regression adjusted by psychiatric diagnoses revealed significant difference in frequency distribution of haplotypes between SAs and non-SAs (global score, $P = 0.014$ and

Table III. Minor allele frequencies for *ADARB1* rs9983925 and rs4819035 and *HTR2C* rs6318 in suicide attempters (165 individuals) and suicide non-attempters (188 individuals), and their allelic association with suicide attempt.

	NCBI SNV ID (minor allele, gene)		
	rs9983925 (T, <i>ADARB1</i>)	rs4819035 (G, <i>ADARB1</i>)	rs6318 (C, <i>HTR2C</i>)
<i>Minor allele frequency</i>			
Suicide attempters	0.309	0.251	0.185
Suicide non-attempters	0.388	0.183	0.114
<i>Allelic association</i>			
χ^2	4.839	4.811	5.712
P^a	0.028	0.028	0.017
OR (95% CI)	0.705 (0.516–0.963)	1.495 (1.042–2.144)	1.755 (1.102–2.794)
P^b	0.037	0.043	0.028

The minor allele T of rs9983925 decreased the risk for suicide attempt, while the minor allele G of rs4819035 and the minor allele C of rs6318 increased the risk.

^aPearson's χ^2 -test.

^b10e6 permutations test.

χ^2 , test statistics; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table IV. Genotype frequencies for *ADARBI* rs9983925 and rs4819035 and *HTR2C* rs6318 in suicide attempters (165 individuals) and suicide non-attempters (188 individuals), and their genotypic association with suicide attempt.

	NCBI SNV ID (alleles, gene)		
	rs9983925 (T/C, <i>ADARBI</i>)	rs4819035 (G/T, <i>ADARBI</i>)	rs6318 (C/G, <i>HTR2C</i>) ^a
Genotype frequencies	TT/CT/CC	GG/TG/TT	CC/GC/GG
Suicide attempters	0.097/0.424/0.479	0.079/0.345/0.576	0.115/0.152/0.733
Suicide non-attempters	0.165/0.447/0.388	0.048/0.271/0.681	0.064/0.096/0.840
Genetic models			
General (2df)	TT vs. CT vs. CC	GG vs. TG vs. TT	CC vs. GC vs. GG
<i>t</i>	4.749	4.138	4.98
<i>P</i> ^b	0.093	0.126	0.083
Additive (1df)	TT>CT>CC	GG>TG>TT	CC>GC>GG
<i>t</i>	-2.145	2.032	2.216
<i>P</i> ^b	0.032	0.042	0.027
OR (95% CI)	0.710 (0.520–0.971)	1.437 (1.013–2.038)	1.634 (1.058–2.522)
<i>P</i> ^c	0.031	0.044	0.025
Dominant (1df)	TT+CT vs. CC	GG+TG vs. TT	–
<i>t</i>	-1.713	1.918	–
<i>P</i> ^b	0.087	0.055	–
OR (95% CI)	0.688 (0.449–1.055)	1.536 (0.991–2.381)	–
Recessive (1df)	TT vs. CT+CC	GG vs. TG+TT	–
<i>t</i>	-1.852	1.296	–
<i>P</i> ^b	0.064	0.195	–
OR (95% CI)	0.540 (0.281–1.036)	1.796 (0.741–4.352)	–

All three genetic variants contribute to suicide attempt risk through additive model of inheritance. Significant *P*-values are shown in bold.

^aHemizygous males for X-linked rs6318 were coded as homozygote.

^bLogistic regression analyses adjusted by psychiatric diagnoses.

^c10e6 permutations test.

Minor allele is underlined; df, degrees of freedom; *t*, test statistics; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

P = 0.023, respectively) (Table V). The results of comparison of each haplotype frequency *vs.* frequency of all others were consistent with the single-locus results for rs4819035. The haplotype TCT was associated with SA (*P* = 0.026, Pearson's χ^2 test) (Table V), and logistic regression adjusted

by the psychiatric diagnoses showed it decreased the risk (*P* = 0.032, OR = 0.605) (Table V). The haplotype CCG was associated with SA (*P* = 0.032, Pearson's χ^2 test), and although it increased the risk, logistic regression adjusted by the psychiatric diagnoses revealed marginal significance

Table V. Haplotype frequencies of *ADARBI* haploblock 2, rs9637192(T/C)-rs2253763(T/C)-rs4819035(G/T), in suicide attempters (165 individuals) and suicide non-attempters (188 individuals), and association with suicide attempt.

Haplotypes ^a	Suicide attempters	Suicide non-attempters	χ^2	df	<i>P</i> ^b	<i>t</i>	<i>P</i> ^c	OR	<i>P</i> ^d
Global score	–	–	10.65	3	0.014	9.52	0.023	–	0.021
CCG	0.257	0.189	4.603	1	0.032	3.73	0.053	1.41	0.054
TTT	0.388	0.342	1.55	1	0.213	1.23	0.267	1.2	0.267
TCT	0.111	0.170	4.926	1	0.026	4.58	0.032	0.605	0.031
CCT	0.244	0.299	2.556	1	0.110	2.91	0.088	0.745	0.091

Statistically significant difference of haplotype frequencies between suicide attempters and suicide non-attempters was found (global score). Among individual haplotypes, TCT decreased the risk for suicide attempt, while CCG increased the risk. Significant *P* values are shown in bold.

^a rs9637192(T/C)-rs2253763(T/C)-rs4819035(G/T).

^bPearson's χ^2 -test.

^cLogistic regression analysis adjusted by psychiatric diagnoses.

^d10e6 permutations test.

χ^2 , test statistics; df, degrees of freedom; *t*, test statistics; OR, odds ratio.

($P = 0.053$, OR = 1.41) (Table V). All obtained results were confirmed by 10e6 permutations test (Table V).

The best minimal model explaining the variation in SA vulnerability

The best minimal model, obtained using GLM and backward selection, identified four variables as independent SA risk factors: rs9983925 ($P = 0.033$), rs6318 ($P = 0.01$), EA ($P = 0.04$), and recent SLEs ($P = 0.003$) (Table VI). Therefore, the model confirmed the main effect of two out of three significantly associated SNVs in pre-screening, and revealed higher SA vulnerability with increased ETI-SR score for EA and LTE-Q score for recent SLEs (positive effects' estimators, data not shown). The model further revealed that GTs moderate the effects of psychiatric disorders ($P = 0.001$) and EA ($P = 0.018$) (Table VI). MDD and BD patients with higher GTs score were at increased risk for SA, while SCH patients, although endorsed more events, appeared to be resilient to GTs in relation to SA (Figure 1A). All patients with higher GTs score and both low and high EA scores were at increased risk for SA, while patients with higher GTs score and intermediate EA scores were at decreased risk (Figure 1B). Our model did not find patients' gender and age, physical and sexual abuse, nor any gene-gene or gene-environment interactions as SA risk factors, while psychiatric diagnoses were marginally significant as an independent variable.

The joint effect of all variables in the best minimal model accounted for 10.2% of total variance in SA across psychiatric patients. Variables including CT and psychiatric disorders explained 6 and 3.6% of total variance, respectively, while genetic factors accounted for 2%, and recent SLEs 1.2%.

Discussion

In this study, we showed that SA vulnerability across Serbian patients with major psychiatric disorders were related to the joint effect of *ADARB1* and *HTR2C* variants, early-life EA and GTs, recent SLEs and psychiatric disorders. To our knowledge, this is the first study identifying *ADARB1* variants as SA risk factors, implicating genetically determined involvement of A-to-I RNA editing in suicidal behaviour.

Two *ADARB1* variants were directly associated with SA in psychiatric patients. The minor allele T of intron 8 variant rs9983925 reduced the risk, while the minor allele G of the 3'UTR variant rs4819035 increased the risk, and both of them acted in dose-dependent manner. We also observed *ADARB1* haploblock rs9637192-rs2253763-rs4819035 as a genetic factor associated with SA, with haplotype CCG increasing and haplotype TCT decreasing the risk. This haploblock maps to the 3' end of *ADARB1* gene, spanning from the intron 8 and encompassing the 3'UTR.

The identified *ADARB1* risk factors overlap putative 3'regulatory regions of the gene, which control complex 3'end processing of *ADARB1* pre-mRNA, involving four splicing events and producing mRNA variants with different translation efficacy and stability (Kawahara et al. 2005). Homeostasis in the expression level of *ADARB1* mRNA variants seems to be essential for normal physiological activity of ADARB1 protein. For example, transgenic mice misexpressing ADARB1 present endogenous depression and anxiety (Singh et al. 2009) and display altered *HTR2C* pre-mRNA editing in serotonin-independent manner (Singh et al. 2011). Furthermore, subtle variations in *HTR2C* pre-mRNA editing patterns among eight mouse strains have been attributed to their genetic background (Du et al. 2006).

Table VI. The best fitting minimal model of significant risk factors for suicide attempt across psychiatric patients assuming their main and moderating effects.

	df	Deviance	Residual df	Residual deviance	P^a
Null model			347	480.77	
rs9983925(additive model)	1	4.531	346	476.24	0.033
Psychiatric disorders	2	5.785	344	470.46	0.055
Emotional abuse	1	4.212	343	466.25	0.040
Stressful life events	1	8.957	342	457.29	0.003
rs6318(additive model)	1	6.648	341	450.64	0.010
General traumas × Emotional abuse	1	5.609	340	445.03	0.018
General traumas × Psychiatric disorders	2	13.454	338	431.58	0.001

ADARB1 rs9983925, *HTR2C* rs6318, emotional abuse and recent stressful life events were involved through the main effect, while general traumas were involved as factor moderating the effect of psychiatric disorders and emotional abuse. Significant P values are shown in bold.

^aPearson's χ^2 -test.

df, degrees of freedom.

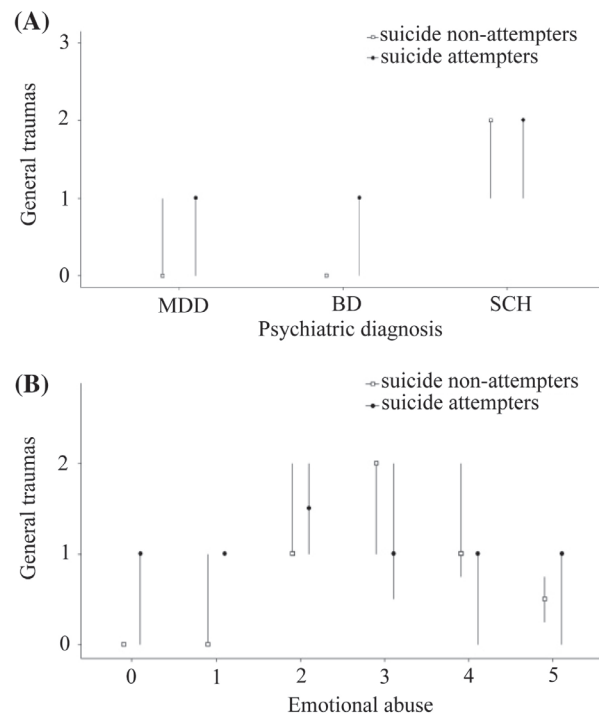


Figure 1. Childhood general traumas moderate the effect of psychiatric diagnoses and childhood emotional abuse on suicide attempt vulnerability across psychiatric patients. (A) Patients with major depressive disorder and bipolar disorder who experienced more general traumas were at increased risk for suicide attempt, while general traumas did not moderate the effect of schizophrenia on suicide attempt. (B) The patients who experienced more general traumas and endorsed either low or high numbers of emotional abuse events were at increased risk for SA. Circles and squares represent medians, while lines represent quartiles. MDD, individuals with major depressive disorders; BD, individuals with bipolar disorder; and SCH, individuals with schizophrenia.

Therefore, we may consider that *ADARB1* genetic factors, identified in this study, may have regulatory functions influencing the variations in *ADARB1* expression level. Indeed, rs4819035 has been identified as *cis* eQTL associated with the variation in *ADARB1* mRNA expression level in the liver (Schadt et al. 2008), and most *cis* eQTL are not tissue specific (van Nas et al. 2010). Furthermore, *ADARB1* is widely expressed (Nishikura 2010), including lymphocytes, and the functional significance of identified variants could be tested by allele specific real time PCR. Genetically determined variations in the *ADARB1* expression may contribute to described altered expression of *ADARB1* mRNA variants (Silberberg et al. 2012; Lyddon et al. 2013) and *HTR2C* pre-mRNA editing in the psychiatric suicide victims (Dracheva et al. 2008; Iwamoto et al. 2009; Lyddon et al. 2013). However, verification of this assumption is possible only in post mortem samples, which is the main limitation of the study.

We did not find associations of *ADAR* variants with SA in psychiatric patients. However, there is a cross-talk between *ADAR* and *ADARB1*, and relative expression level of one enzyme may influence the function of another one (Werry et al. 2008).

Apart from *HTR2C*, A-to-I RNA editing may express a more general influence on suicidal

behaviour and psychiatric disorders. This process is widely used to fine-tune the functional properties of proteins key to neurotransmission, network plasticity and brain development (Rosenthal and Seeburg 2012), and it is thought to be essential for memory, context-specific behaviour response and sophisticated cognitive capacities (Mattick and Mehler 2008). Finally, elucidation of A-to-I RNA editing involvement in psychiatric disorders may be relevant to the therapy, as the appropriate treatment with antidepressant drugs may revert altered editing pattern of *HTR2C* pre-mRNA in mice, caused by the acute stress and the early-life (Englander et al. 2005; Bhansali et al. 2007).

In contrast to previous results obtained in European and Han Chinese psychiatric samples (Lerer et al. 2001; Serretti et al. 2007; Zhang et al. 2008), we found association of *HTR2C* rs6318 (Cys23Ser) and SA in the Serbian psychiatric sample, with the minor allele C increasing the risk for SA. Interestingly, the only significant association of rs6318 and suicidal behaviour has been reported for Slovenian suicide victims (Videtic et al. 2009), who share the Slavic ethnicity with Serbs. Considering the significant inter-population variability in frequencies of rs6318 alleles among subjects from nine European countries (Lerer et al. 2001), our result may implicate

rs6318 as risk factor for suicidal behaviour which is specific for Slavic populations. However, our assumption requires replication studies on samples of Slavic ethnicity, including various types of suicidal behaviour, given that no association of rs6318 has been found in Slavic suicide victims from Croatia (Stefulj et al. 2004).

HTR2C exerts inhibitory control on dopamine neuron function (Berg et al. 2008), and Ser23 HTR2C isoform has been associated with greater stress-induced dopamine release in the meso-accumbal pathway in healthy humans (Mickey et al. 2012). Although dopamine dysfunction has yet to be confidently determined in suicidal behaviour (Ryding et al. 2008), this finding may be related not only to suicidal diathesis, but also to its treatment, as HTR2C is currently considered for improved therapies in neuropsychiatric disorders related to dopamine dysfunction (Berg et al. 2008).

Considering the main and moderating effects of SA risk factors examined in this study, the best minimal model revealed *ADARB1* rs9983925, *HTR2C* rs6318 and EA as independent distal risk factors, recent SLEs as an independent proximal risk factor, and interactions of GTs with psychiatric disorders and EA. In line with the previous studies (Fergusson et al. 2000; Dube et al. 2001), our model confirmed EA and GTs as SA risk factors. Noticeably, ETI-SR, used in this study, is the only instrument evaluating domain of GTs, and the cited studies (Fergusson et al. 2000; Dube et al. 2001) assessed only a few GTs items, as independent variables. According to our results, MDD and BD patients who experienced more GTs were at increased risk for SA (Figure 1A). On the contrary, GTs did not moderate the effect of SCH on SA (Figure 1A). Although SCH patients endorsed more GTs events, they might represent risk factors for other aspects of SCH pathology. The interaction of GTs and EA is rather more complex. The patients experienced more GTs and endorsed either low or high numbers of EA events were at increased risk for SA (Figure 1B). In contrast to the previous research (Brezo et al. 2008; Brodsky and Stanley 2008), neither physical nor sexual abuse were related to SA in our sample, supporting they may represent more general risk factors for psychiatric disorders than for SA specifically (Klonsky and Moyer 2008). However, our result related to the sexual abuse should be interpreted with caution, as only ~3% of all examined individuals endorsed a sexual abuse event, which may reflect cultural stigma. Recent SLEs represent the most consistently implicated risk factors for suicidal behaviour (Liu and Miller 2014), which is also confirmed in our study.

Our model explained 10.2% of total variance in SA across psychiatric patients. Variables including

CT accounted for 6% of total variance, confirming CT as one of the factors with the strongest effect to SA diathesis (Fergusson et al. 2000; Dube et al. 2001). Consistently with the evidence that SA is most commonly associated with mood disorders (Beautrais et al. 1996), variables including psychiatric diagnoses explained 3.6% of total variance. Recent SLEs can explain an important amount of causality in suicidal behaviour (Liu and Miller 2014), and in our model it accounted for 1.2% of total variance. Our results also support environmental factors (CT and recent SLEs) as stronger contributors to SA vulnerability compared to genetic factors (Brezo et al. 2008). Altogether, our model confirms that the joint effect of a strong diathesis and stressful life experiences may lead to the SA act (Mann 2003).

One limitation of our study is the accuracy of recall of past exposure to SLEs, especially during the early-life. However, ETI-SR and LTE-Q instruments were found to have good validity and reliability (Bremner et al. 2007; Brugha and Cragg 1990). Another limitation of our study is the limited sample size, but we controlled well other factors influencing the statistical power of an association study: correlation coefficient $r^2 \geq 0.8$ (sufficient for optimal coverage of common variants in an examined region) (Pettersson et al. 2009), and almost equal number of individuals in examined groups (the most powerful ratio for an association study) (Evans and Purcell 2012). We controlled for multiple testing bias by performing 10e6 permutations test, and used GLM and backward selection to identify the most significant risk factors. However, further studies with larger sample size are warranted in order to replicate our results.

In summary, SA vulnerability in patients with major psychiatric disorders is related to the joint effect of *ADARB1* and *HTR2C* variants, the existing mood disorder and the cumulative exposures to a various stressful events during the childhood and recently in the life. These factors may help to identify individuals being at higher risk for SA, even at early phases of the disorder. Genetic markers are stable throughout the life and can be easily genotyped. Childhood stressful life events are assessable and can be addressed by the psychotherapeutic interventions. Appropriate, on-time pharmacological treatment could reduce suicidal risk not only by ameliorating psychopathology, but possibly by reversing changes due to A-to-I RNA editing. This might be especially relevant for application of antidepressant therapy in mood disorders. This kind of approach would ultimately lead to individual tailored treatment, and could facilitate progress in the prevention of SA. Besides the clinical significance, our findings may have research impact, and A-to-I RNA editing genes

and early-life GTs should be more intensely studied as factors contributing to the pathology of the suicidal behaviour.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Ministry of Education, Science and Technological Development, Republic of Serbia (grant no. 173016).

Statement of interest

None to declare.

References

- Antypa N, Serretti A, Rujescu D. 2013. Serotonergic genes and suicide: a systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:1125–1142.
- Barnes NM, Sharp T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152.
- Beautrais AL, Joyce PR, Mulder RT, Fergusson DM, Deavoll BJ, Nightingale SK. 1996. Prevalence and comorbidity of mental disorders in persons making serious suicide attempts: a case-control study. *Am J Psychiatry* 153:1009–1014.
- Berg KA, Clarke WP, Cunningham KA, Spampinato U. 2008. Fine-tuning serotonin 2C receptor function in the brain: molecular and functional implications. *Neuropharmacology* 55:969–976.
- Bhansali P, Dunning J, Singer SE, David L, Schmauss C. 2007. Early life stress alters adult serotonin 2C receptor pre-mRNA editing and expression of the alpha subunit of the heterotrimeric G-protein G_q. *J Neurosci* 27:1467–1473.
- Bremner JD, Bolus R, Mayer EA. 2007. Psychometric properties of the early trauma inventory–self report. *J Nerv Ment Dis* 195:211–218.
- Brent DA, Mann JJ. 2005. Family genetic studies, suicide, and suicidal behavior. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 133:13–24.
- Brezo J, Bureau A, Merette C, Jomphe V, Barker ED, Vitaro F, et al. 2010. Differences and similarities in the serotonergic diathesis for suicide attempts and mood disorders: a 22-year longitudinal gene-environment study. *Mol Psychiatry* 15: 831–843.
- Brezo J, Paris J, Vitaro F, Hébert M, Tremblay RE, Turecki G. 2008. Predicting suicide attempts in young adults with histories of childhood abuse. *Br J Psychiatry* 193:134–139.
- Brodsky BS, Stanley B. 2008. Adverse childhood experiences and suicidal behavior. *Psychiatr Clin North Am* 31:223–235.
- Brugha T, Bebbington P, Tennant C, Hurry J. 1985. The list of threatening experiences: a subset of 12 life event categories with considerable long-term contextual threat. *Psychol Med* 15:189–194.
- Brugha TS, Cragg D. 1990. The List of Threatening Experiences: the reliability and validity of a brief life events questionnaire. *Acta Psychiatr Scand* 82:77–81.
- Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, et al. 1997. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 387: 303–308.
- Dedic G. 2014. Gender differences in suicide in Serbia within the period 2006–2010. *Vojnosanit Pregl* 71:265–270.
- Dracheva S, Patel N, Woo DA, Marcus SM, Siever LJ, Haroutunian V. 2008. Increased serotonin 2C receptor mRNA editing: a possible risk factor for suicide. *Mol Psychiatry* 13:1001–1010.
- Du Y, Davisson MT, Kafadar K, Gardiner K. 2006. A-to-I pre-mRNA editing of the serotonin 2C receptor: comparisons among inbred mouse strains. *Gene* 382:39–46.
- Dube SR, Anda RF, Felitti VJ, Chapman DP, Williamson DF, Giles WH. 2001. Childhood abuse, household dysfunction, and the risk of attempted suicide throughout the life span: findings from the Adverse Childhood Experiences Study. *JAMA* 286:3089–3096.
- Englander MT, Dulawa SC, Bhansali P, Schmauss C. 2005. How stress and fluoxetine modulate serotonin 2C receptor pre-mRNA editing. *J Neurosci* 25:648–651.
- Evans DM, Purcell S. 2012. Power calculations in genetic studies. *Cold Spring Harb Protoc* 2012:664–674.
- Fergusson DM, Woodward LJ, Horwood LJ. 2000. Risk factors and life processes associated with the onset of suicidal behaviour during adolescence and early adulthood. *Psychol Med* 30:23–39.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. 1996. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version (SCID-CV). Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Iwamoto K, Bundo M, Kato T. 2009. Serotonin receptor 2C and mental disorders: genetic, expression and RNA editing studies. *RNA Biol* 6:248–253.
- Kawahara Y, Ito K, Ito M, Tsuji S, Kwak S. 2005. Novel splice variants of human ADAR2 mRNA: skipping of the exon encoding the dsRNA-binding domains, and multiple C-terminal splice sites. *Gene* 363:193–201.
- Klonsky ED, Moyer A. 2008. Childhood sexual abuse and non-suicidal self-injury: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 192: 166–170.
- Lerer B, Macciardi F, Segman RH, Adolfsson R, Blackwood D, Blairy S, et al. 2001. Variability of 5-HT_{2C} receptor cys23ser polymorphism among European populations and vulnerability to affective disorder. *Mol Psychiatry* 6:579–585.
- Liu RT, Miller I. 2014. Life events and suicidal ideation and behavior: a systematic review. *Clin Psychol Rev* 34:181–192.
- Lyddon R, Dwork AJ, Keddache M, Siever LJ, Dracheva S. 2013. Serotonin 2c receptor RNA editing in major depression and suicide. *World J Biol Psychiatry* 14:590–601.
- Mann JJ. 2003. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4:819–828.
- Martin CB, Hamon M, Lanfumey L, Mongeau R. 2014. Controversies on the role of 5-HT(2C) receptors in the mechanisms of action of antidepressant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 42:208–223.
- Mattick JS, Mehler MF. 2008. RNA editing, DNA recoding and the evolution of human cognition. *Trends Neurosci* 31:227–233.
- Meltzer HY, Massey BW. 2011. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr Opin Pharmacol* 11:59–67.
- Mickey BJ, Sanford BJ, Love TM, Shen PH, Hodgkinson CA, Stohler CS, et al. 2012. Striatal dopamine release and genetic variation of the serotonin 2C receptor in humans. *J Neurosci* 32:9344–9350.
- Moscicki EK. 1994. Gender differences in completed and attempted suicides. *Ann Epidemiol* 152:152–158.
- Nishikura K. 2010. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem* 79:321–349.
- Okada M, Northup JK, Ozaki N, Russell JT, Linnola M, Goldman D. 2004. Modification of human 5-HT(2C) receptor function by Cys23Ser, an abundant, naturally occurring amino-acid substitution. *Mol Psychiatry* 9:55–64.

- Pettersson FH, Anderson CA, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. 2009. Marker selection for genetic case-control association studies. *Nat Protoc* 4:743–752.
- R Core Team. 2014. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rosenthal JJ, Seeburg PH. 2012. A-to-I RNA editing: effects on proteins key to neural excitability. *Neuron* 74:432–439.
- Ryding E, Lindström M, Träskman-Bendz L. 2008. The role of dopamine and serotonin in suicidal behaviour and aggression. *Prog Brain Res* 172:307–315.
- Schadt EE, Molony C, Chudin E, Hao K, Yang X, Lum PY, et al. 2008. Mapping the genetic architecture of gene expression in human liver. *PLoS Biol* 6:e107.
- Serretti A, Mandelli L, Giegling I, Schneider B, Hartmann AM, Schnabel A, et al. 2007. HTR2C and HTR1A gene variants in German and Italian suicide attempters and completers. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:291–299.
- Silberberg G, Lundin D, Navon R, Öhman M. 2012. Deregulation of the A-to-I RNA editing mechanism in psychiatric disorders. *Hum Mol Genet* 21:311–321.
- Simmons M, Meador-Woodruff JH, Sodhi MS. 2010. Increased cortical expression of an RNA editing enzyme occurs in major depressive suicide victims. *Neuroreport* 21:993–997.
- Singh M, Kesterson RA, Jacobs MM, Joers JM, Gore JC, Emeson RB. 2007. Hyperphagia-mediated obesity in transgenic mice misexpressing the RNA-editing enzyme ADAR2. *J Biol Chem* 282:22448–22459.
- Singh M, Singh MM, Na E, Agassandian K, Zimmerman MB, Johnson AK. 2011. Altered ADAR 2 equilibrium and 5HT(2C) R editing in the prefrontal cortex of ADAR 2 transgenic mice. *Genes Brain Behav* 10:637–647.
- Singh M, Zimmerman MB, Beltz TG, Johnson AK. 2009. Affect-related behaviors in mice misexpressing the RNA editing enzyme ADAR2. *Physiol Behav* 97:446–454.
- Stefulj J, Büttner A, Kubat M, Zill P, Balija M, Eisenmenger W, et al. 2004. 5HT-2C receptor polymorphism in suicide victims. Association studies in German and Slavic populations. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 254:224–227.
- Turecki G, Ernst C, Jollant F, Labonté B, Mechawar N. 2012. The neurodevelopmental origins of suicidal behavior. *Trends Neurosci* 35:14–23.
- van Nas A, Ingram-Drake L, Sinsheimer JS, Wang SS, Schadt EE, Drake T, et al. 2010. Expression quantitative trait loci: replication, tissue- and sex-specificity in mice. *Genetics* 185:1059–1068.
- Videtic A, Peternelj TT, Zupanc T, Balazic J, Komel R. 2009. Promoter and functional polymorphisms of HTR2C and suicide victims. *Genes Brain Behav* 8:541–545.
- Werry TD, Loiacono R, Sexton PM, Christopoulos A. 2008. RNA editing of the serotonin 5HT2C receptor and its effects on cell signalling, pharmacology and brain function. *Pharmacol Ther* 119:7–23.
- WHO (World Health Organization). 2012. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/data-and-statistics>.
- Zhang J, Shen Y, He G, Li X, Meng J, Guo S, et al. 2008. Lack of association between three serotonin genes and suicidal behavior in Chinese psychiatric patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:467–471.

Supplementary material available online

Supplementary Tables I–III and Figures 1–2.

Supplementary material for Karanović J. et al. Joint effect of *ADARB1* gene, *HTR2C* gene and stressful life events on suicide attempt risk in patients with major psychiatric disorders, *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2015, doi: 10.3109/15622975.2014.1000374.

Supplementary Table I. Selected tagSNVs, SNVs captured by an appropriate tagSNV and TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assay IDs (Life Technologies, Grand Island, USA).

Gene	tagSNV dbSNP ID	SNVs captured by tagSNVs ($r^2 \geq 0.8$) ^a	Assay ID	
<i>ADAR</i>	rs2072659	rs2072659	C__15949654_10	
	rs2072660	rs2072660	C__15949664_10	
	rs3811450	rs3811450	C__27504568_10	
	rs9427092	rs9427092,rs9427097	C__30240672_10	
	rs9616	rs9616	C__8724401_10	
	rs1127309	rs1127309	C__131814_1_	
	rs3766924	rs2335230,rs3766924	C__25800598_10	
	rs2229857	rs9426823,rs4845384,rs3738029,rs1127317,rs1994922,rs2131902,rs6656743,rs2229857,rs3766927,rs11264222, rs3766923,rs1127314,rs1127326	C__1235929_10	
	rs6699729	rs6699825,rs10908419,rs6699729,rs3766922,rs12125166,rs1127313,rs9426830,rs7531982,rs1127311,rs903323, rs9427104,rs9427094	C__30114879_10	
	rs962242	rs962242,rs7533471,rs4636449,rs3766925,rs3738032	C__11341961_10	
	rs9427108	rs9427108,rs9426831,rs884618	C__30204881_10	
	rs1552902	rs1552902,rs884617	C__11341160_20	
	<i>ADARB1</i>	rs7281416	rs7281757,rs1556317,rs2150439,rs2838807,rs13047803,rs8130224,rs7281416,rs8134789,rs8128889	C__29901837_10
		rs11088983	rs11088983,rs2838813,rs2246081,rs2838815,rs2838806	C__31335208_10
		rs7277143	rs6518216,rs1556319,rs10222166,rs7277143,rs2838809,rs1556318,rs6518218,rs2838812,rs2838810,rs6518215, rs7279808	C__31335183_10
		rs11701522	rs11701522	C__3002313_10
		rs2838817	rs2838808,rs2838817	C__3002314_1_
rs4818766		rs2225434,rs4818766	C__26539691_10	
rs9983925		rs9983925	C__1211567_10	
rs9637192		rs2838818,rs9637192,rs1051367,rs2838820	C__1211568_1_	
rs2253763		rs2253763	C__15831797_10	
rs4819035		rs4819035	C__1211577_10	
rs1051385		rs1051385	C__9520036_20	
<i>HTR2C</i>	rs6318	/	C__2270166_10	

^aTagging method was performed according Pettersson et al. (2009). Exact locations of the regions of interest (*ADAR* at Chr1:152821159-152867061 and *ADARB1* at Chr21:45426957-45470902) in the human genome NCBI B36 assembly, and the list of the functional SNVs were retrieved from the UCSC browser (Kent et al. 2002). The list of all SNVs and their genotype frequencies in CEPH population were retrieved from HapMap database, release 27 (International HapMap Consortium 2003). The selection of tagSNVs was performed by Haploview software, ver. 4.2 (Barrett et al. 2005), following the next parameters: the minor allele frequency $MAF \geq 0.05$, the correlation coefficient $r^2 \geq 0.8$, 'Pairwise tagging only' and 'Load includes' to force functional SNVs as tagSNVs.

Supplementary Table II. Characteristics of selected tagSNVs and their functional annotation.

Gene and locus	tagSNV dbSNP ID	Chromosome position ^a	Alleles	MAF in database ^b	Location in gene region ^c	Protein consequence ^c	Regulome database score ^d	
<i>ADAR</i> 1q21.3	rs2072659	154548521	G/C	0.10	3'UTR	–	5	
	rs2072660	154548721	T/C	0.26	3'UTR	–	2b	
	rs3811450	154551032	T/C	0.07	3'UTR	–	5	
	rs9427092	154553722	C/T	0.18	3'UTR	–	No data	
	rs9616	154555733	T/A	0.28	3'UTR	–	5	
	rs1127309	154561925	T/C	0.33	exon 9	p.Val894	No data	
	rs3766924	154571826	T/C	0.20	intron 2	–	5	
	rs2229857	154573967	T/C	0.33	exon 2	p.Lys384Arg	No data	
	rs6699729	154582896	T/A	0.46	5'UTR	–	5	
	rs962242	154592140	C/T	0.26	5'UTR	–	5	
	rs9427108	154607914	A/G	0.41	5'UTR	–	5	
	rs1552902	154608823	G/C	0.39	5'UTR	–	No data	
	<i>ADARB1</i> 21q22.3	rs7281416	46605839	T/C	0.33	Intron 7	–	6
		rs11088983	46608470	C/T	0.41	Intron 7	–	6
		rs7277143	46614346	G/C	0.08	Intron 7	–	No data
		rs11701522	46631419	G/A	0.13	Intron 8	–	6
		rs2838817	46631698	T/C	0.33	intron 8	–	4
rs4818766		46635351	A/G	0.40	Intron 8	–	5	
rs9983925		46636844	T/C	0.34	Intron 8	–	No data	
rs9637192		46637413	T/C	0.41	Intron 8	–	No data	
rs2253763		46642764	T/C	0.35	3'UTR-exon 10	–	No data	
rs4819035		46645715	G/T	0.29	3'UTR-exon 10	–	1F	
rs1051385		46646264	C/T	0.06	3'UTR-exon 10	–	4	
<i>HTR2C</i> Xq24	rs6318	113965735	C/G	0.16	exon 4	p.Cys23Ser	6	

Minor allele is underlined.

^aSNV position according to dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>, accessed 02/10/2013) (Sherry et al. 2001)

^bMinor allele frequencies (MAF) for European population in 1000 genomes database (<http://www.1000genomes.org>, accessed 02/10/2013) (1000 Genomes Project Consortium et al. 2012).

^cSNV location in the gene and its consequence on protein level from Ensembl database (<http://www.ensembl.org>, accessed 10/10/2013) (Flicek et al. 2013); used transcripts: ENST00000368474 (*ADAR*), ENST00000360697 (*ADARB1*), ENST00000276198 (*HTR2C*).

^dAnnotation of SNV's function according to Regulome database (<http://www.regulome.stanford.edu>, accessed 13/12/2013) (Boyle et al. 2012).

Supplementary Table III. Minor allele frequencies of all examined *ADAR*, *ADARB1* and *HTR2C* SNVs among suicide attempters and suicide non-attempters and the results of allelic tests. The variants that were significantly different among suicide attempters and suicide non-attempters and their parameters are shown in bold.

Gene	tagSNV dbSNP ID	Alleles	MAF SAs	MAF non-SAs	χ^2	P ^a	OR	95% CI	P ^b	
<i>ADAR</i>	rs2072659	G/C	0.091	0.096	0.059	0.808	0.939	0.564–1.562	0.852	
	rs2072660	T/C	0.239	0.190	2.568	0.109	1,343	0.936–1.928	0.114	
	rs3811450	T/C	0.091	0.064	1.770	0.183	1,458	0.834–2.549	0.220	
	rs9427092	C/T	0.188	0.158	1.118	0.290	1,235	0.835–1.828	0.325	
	rs9616	T/A	0.264	0.271	0.052	0.819	0.962	0.689–1.343	0.862	
	rs1127309	T/C	0.279	0.269	0.091	0.762	1,053	0.755–1.466	0.796	
	rs3766924	T/C	0.258	0.282	0.528	0.468	0.884	0.633–1.234	0.488	
	rs2229857	T/C	0.282	0.274	0.054	0.815	1.040	0.748–1.447	0.863	
	rs6699729	T/A	0.445	0.433	0.102	0.750	1.050	0.779–1.414	0.756	
	rs962242	C/T	0.206	0.207	0.002	0.964	0.992	0.688–1.429	1.000	
	rs9427108	A/G	0.403	0.399	0.012	0.912	1,017	0.752–1.375	0.938	
	rs1552902	G/C	0.361	0.378	0.219	0.639	0.929	0.684–1.263	0.692	
	<i>ADARB1</i>	rs7281416	T/C	0.361	0.330	0.739	0.390	1,146	0.840–1.564	0.434
		rs11088983	C/T	0.464	0.487	0.375	0.540	0.912	0.678–1.226	0.555
rs7277143		G/C	0.121	0.144	0.764	0.382	0.822	0.530–1.275	0.468	
rs11701522		G/A	0.118	0.082	2.513	0.113	1,492	0.908–2.451	0.120	
rs2838817		T/C	0.301	0.251	2.034	0.154	1.280	0.911–1.796	0.164	
rs4818766		A/G	0.470	0.468	0.002	0.966	1,006	0.748–1.354	1.000	
rs9983925		T/C	0.309	0.388	4.839	0.028	0.705	0.516–0.963	0.037	
rs9637192		T/C	0.485	0.500	0.161	0.688	0.941	0.700–1.265	0.705	
rs2253763		T/C	0.406	0.356	1.842	0.175	1,235	0.910–1.674	0.183	
rs4819035		G/T	0.251	0.183	4.811	0.028	1,495	1.042–2.144	0.043	
rs1051385	C/T	0.106	0.133	1.203	0.273	0.774	0.488–1.225	0.298		
<i>HTR2C</i>	rs6318	C/G	0.185	0.114	5.712	0.017	1,755	1.102–2.794	0.028	

Minor allele is underlined.

Significant allelic associations with suicide attempt are bolded.

^aPearson's χ^2 test.

^b10e6 permutations test.

SAs-suicide attempters; non-SAs-suicide non-attempters; OR-odds ratio; CI-confidence interval.

References

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. 2012. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491:56–65.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265.
- Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al. 2012. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res* 22: 1790–1797.
- Flicek P, Ahmed I, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, et al. 2013. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Res* 41:D48–55.
- International HapMap Consortium. 2003. The International HapMap Project. *Nature* 426:789–796.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996–1006.
- Pettersson FH, Anderson CA, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. 2009. Marker selection for genetic case-control association studies. *Nat Protoc* 4:743–752.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29:308–311.

Effect of childhood general traumas on suicide attempt depends on *TPH2* and *ADARBI* variants in psychiatric patients

Jelena Karanović¹ · Maja Ivković^{2,3} · Vladimir M. Jovanović⁴ · Saša Šviković¹ · Maja Pantović-Stefanović² · Miloš Brkušanin¹ · Aleksandar Damjanović^{2,3} · Goran Brajušković¹ · Dušanka Savić-Pavićević¹

Received: 31 May 2016 / Accepted: 6 January 2017
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract Suicidal behavior has been associated with a deficient serotonin neurotransmission which is likely a consequence of individual genetic architecture, exposure to environmental factors and interactions of those factors. We examined whether the interaction of child abuse, *TPH2* (tryptophan hydroxylase 2) variant rs4290270, affecting alternative splicing and editing of *TPH2* pre-mRNAs, and *ADARBI* (adenosine deaminase acting on RNA B1) variants rs4819035 and rs9983925 may influence the risk for suicide attempt in psychiatric patients. *TPH2* rs4290270 was genotyped in 165 suicide attempters and 188 suicide non-attempters diagnosed with major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia. Genotyping data for *ADARBI* variants were taken over from our previous study. Child abuse before the age of 18 years was assessed using the Early Trauma Inventory-Self Report. Generalized linear models and backward selection were applied to identify the main and interacting effects of environmental and

genetic factors, including psychiatric diagnoses, patients' gender and age as covariates. Childhood general traumas were independently associated with suicide attempt. Two-way interaction between *TPH2* rs4290270 and general traumas revealed that TT homozygotes with a history of general traumas had an increased risk for suicide attempt. Three-way interaction of general traumas, *TPH2* rs4290270 and *ADARBI* rs4819035 indicated that the highest predisposition to suicide attempt was observed in individuals who experienced general traumas and were TT homozygote for rs4290270 and TT homozygote for rs4819035. Our findings suggest that the risk for suicide attempt in psychiatric patients exposed to an adverse childhood environment may depend on *TPH2* and *ADARBI* variants.

Keywords Suicide attempted · Tryptophan hydroxylase · rs4290270 · RNA editing · Child abuse · Gene–environment interaction

Kompletan tekst rada dostupan preko linka Springer Nature SharedIt: <http://rdcu.be/owJG>

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Карановић

Број индекса M3002/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Варијанте у генима за едитовање РНК, серотонински рецептор 2Ц и триптофан-
хидроксилазу 2 као фактори ризика за покушај самоубиства код психијатријских
болесника“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 10.04.2017. године

Јелена Карановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Карановић

Број индекса M3002/2009

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Варијанте у генима за едитовање РНК, серотонински рецептор 2Ц и триптофан-хидроксилазу 2 као фактори ризика за покушај самоубиства код психијатријских болесника“

Ментор проф. др Душанка Савић-Павићевић

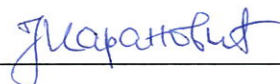
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 10.04.2017. године



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Варијанте у генима за едитовање РНК, серотонински рецептор 2Ц и триптофан-хидроксилазу 2 као фактори ризика за покушај самоубиства код психијатријских болесника“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 10.04.2017. године

Ј. Карановић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.