

# A PGC-1 $\alpha$ - ÉS A SIRT GÉNEK EXPRESSZIÓ- VÁLTOZÁSAINAK PREKLINIKAI VIZSGÁLATA

*CÍMŰ Ph.D. ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÓJA*

DR. SALAMON ANDRÁS



KÍSÉRLETES ÉS KLINIKAI IDEGTUDOMÁNYOK KÉPZÉSI  
PROGRAM  
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TÉMAVEZETŐK:

PROF. DR. KLIVÉNYI PÉTER; DR. ZÁDORI DÉNES, Ph.D.

SZEGED

2020

## I – BEVEZETÉS

Napjainkban a krónikus betegségek a várható élettartam növekedésével egyre súlyosabb egészségügyi problémává válnak a fejlett országokban. A leggyakoribb krónikus szív- és érrendszeri betegségek, valamint az egyes daganatos megbetegedések mellett a neurodegeneratív kórképek is jelentős hatással vannak az egészségügyi finanszírozási rendszerre. Ezidáig számos közös klinikai és molekuláris hasonlóságot sikerült azonosítani az egyes neurodegeneratív betegségekben. Összességében feltételezhető, hogy a mitokondriumok a legfontosabb szubcelluláris csomópontok között vannak e betegségek patomechanizmusában. Ezen okból kifolyólag jelentős tudományos aktivitás irányul a mitokondriális diszfunkció megismerésére, valamint a potenciális neuroprotektív célpontok azonosítására. E kutatási folyamat során két, egymással szoros kapcsolatban lévő metabolikus szabályozó molekuláris családot sikerült azonosítani, nevezetesen a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator (PGC) és a silent information regulator 2 homologues (Sirtuin) családokat.

A PGC családnak három tagja ismert: (1) peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), (2) peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\beta$  (PGC-1 $\beta$ ), (3) PGC-related coactivator (PRC). A PGC-1 $\alpha$  a legrészletesebben vizsgált tagja a családnak. A PGC-1 $\alpha$  körülbelül 20 évvel ezelőtt került leírásra a barna zsírszövetben, mint az adaptív termogenezisnek egy, a hideg stimulációra aktiválódó koaktivátora. E fő szabályozó molekula részt vesz a májban zajló glükoneogenezis mellett a barna zsírszövetben történő adaptív termogenezisben, a vázizomzatban zajló izomrostváltásban (II-es típusúról I-es típusúra), valamint a mitokondriális biogenezis és a zsírsavak  $\beta$ -oxidációjának stimulációjában. Tovább fokozza a PGC-1 $\alpha$ -rendszer bonyolultságát, hogy jelenleg több, mint 10 izoforma ismert, melyek az alternatív splicing és promóter használat eredményeként jönnek létre. E két folyamat gyakran kombináltan van jelen. A splicing variánsoknak a két legfőbb csoportja a teljes hosszúságú (FL-Pgc-1 $\alpha$ (1/-a); 797 aminosav) és az N-terminálisan csonkolt (NT-Pgc-1 $\alpha$ (-a); 270 aminosav) izoformák. A rövidebb, azonban szintén biológiai funkcióval bíró NT-Pgc-1 $\alpha$  izoforma egy a 6. és 7. exonok közé ékelődő 31 bázispár nagyságú in-frame stop kodon eredményeképpen jön létre. A promóterek vonatkozásában elmondható, hogy a kanonikus proximális (vagy referencia (PP; REF-Pgc-1 $\alpha$ )) és alternatív promótereken (AP) kívül további szövetspecifikus promóterek is ismertek (agyspecifikus (BP;

CNS-Pgc-1 $\alpha$ ) és májspecifikus (LP) promóterek). Jelenleg azonban korlátozott adat áll rendelkezésre az egyes izoformák agyi megoszlására vonatkozóan. A neurodegeneratív betegségek kapcsán széles körben vizsgált Pgc-1 $\alpha$  vonatkozásában azonban elmondható, hogy a *Pgc-1 $\alpha$*  deficiens állatokban a neurodegeneráció mechanizmusa felgyorsul, míg a génextpresszió stimulációja lelassítja a sejtkárosító folyamatokat.

A Sirtuinok olyan, többségében NAD<sup>+</sup>-dependens deacetyláz funkcióval bíró fehérjék, amelyek a regulált fehérje acetil-lizin reziduumával lépnek kapcsolatba. Jelenleg hét Sirtuin altípus ismert (Sirt1-7). Ezen altípusok különböző szubcelluláris lokalizációt mutatnak. Hasonlóan a Pgc-1 $\alpha$ -hoz, a Sirtuinok is számos fehérjének a működését szabályozzák. Kiemelten fontos szerepük van a genom stabilitásának megőrzésében, a tumorszuppresszióban és a sejten belüli energetikai folyamatok szabályozásában. Továbbá a Sirt1 és a Sirt3 vonatkozásában leírt izoformák a rendszer működését tovább bonyolítják. A PGC-rendszerhez hasonlóan az izoformák az alternatív splicing és promóter használat eredményeképpen jönnek létre. A teljes hosszúságú Sirt1-en (Sirt1-F1) túl két további izoforma állítható elő speciálisan megtervezett PCR primerekkel: Sirt1- $\Delta$ 8 (hiányzó 8-as exon) és Sirt1- $\Delta$ E2 (hiányzó 2-es exon). A Sirt3-nak is ismert három transzkript variánsa (Sirt3-M1 (aminosav /1-334/), -M2 (aminosav /15-334/) és -M3 (aminosav /88-334/)), amelyek eltérő hosszúságú fehérjéket eredményeznek. Kísérletes adatok bizonyítják, hogy a Sirt3-M1 és -M2 többnyire a mitokondriumokban, míg az -M3 variáns a sejtmagban található. Ezidáig számos tanulmány vetette fel a Sirtuinok szerepét a neurodegenerációban.

Egyre több irodalmi adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a fent említett két, igen fontos neuroprotektív rendszer egymástól nem független. Úgy tűnik, hogy a citoplazmában a PGC-1 $\alpha$  és a SIRT1 között interakció van. E molekuláris kapcsolódás során a SIRT1 deacetylálja a PGC-1 $\alpha$ -t, amely ezt követően aktiválja a molekuláris célpontjait és ezáltal fokozza a mitokondriális biogenezist, az oxidatív foszforilációt és az energia termelést. Ezen túlmenően a SIRT1 különböző környezeti hatásokra a *Pgc-1 $\alpha$*  gén promóter régióját is képes stimulálni (éhezés, kalóriamegszorítás).

Tekintettel a PGC- és a Sirtuin rendszerek számos különböző metabolikus folyamatban betöltött szabályozó szerepeire, valamint a potenciális neuroprotektív hatásaikra, jelentős tudományos törekvés irányult e rendszerek modulációjára. E modulációs törekvések alapvetően három fő csoportba oszthatóak: (1) – környezeti hatásra történő aktiváció (hűtés, testmozgás, kalóriamegszorítás), (2) – farmakológiai aktiváció (pl. resveratrol) és (3) – genetikai manipuláció (pl. overexpresszió, knockout (KO) állatok). A külső hőmérséklet

hatása a barna- és fehér zsírszövet, valamint a vázizomzat vonatkozásában részleteiben vizsgált. Mindazonáltal igen kevés adat áll rendelkezésre a külső hőmérséklet agyra kifejtett hatásairól. Tritos és *mtsai* (2003) vizsgálatuk során 18-20 hetes hím C57Bl/6J egerek agyában négy óra hűtést (4°C) követően nem találtak eltérést a *Pgc-1 $\alpha$*  szintjében. Habár széles körű vizsgálatok történtek a testmozgás PGC- és Sirtuin rendszerekre kifejtett hatásairól, a vizsgálatba vont modellek és a testedzési protokollok diverzitása miatt igen nehéz az adatok összehasonlítása, interpretálása. Bizonyított, hogy a PGC-1 $\alpha$  és a SIRT1 szintje testmozgás hatására a vázizomzatban megemelkedik. Steiner és *mtsai* (2011) 8 hét testedzést követően a *Pgc-1 $\alpha$*  és a *Sirt1* mRNS szintek megemelkedését detektálták az egerek különböző agyi régióiban. Ennek ellenére azonban ezidáig számos egymásnak ellentmondó adat látott napvilágot.

A Parkinson-kórt klinikailag a bradikinézia, a tremor és/vagy a rigor tünetegyüttese jellemzi. E klinikai tünetegyüttes háttérében álló, a substantia nigrát érintő dopaminerg sejtpusztulás számos komplex molekuláris patológiai folyamat eredményeként jön létre. A diagnózis felállításának időpontjában e dopaminerg sejtek kb. 30%-a már elpusztult. Egyike a legszéleskörűben használt Parkinson-kór modelleknek az MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) toxin modell (mitokondriális komplex 1 inhibitor). Korábbi állatkísérletes kutatások feltételezik a PGC-1 $\alpha$  lehetséges neuroprotektív hatását az MPTP toxin által indukált idegsejt károsodásban. Az MPTP toxin által előidézett (oxidatív) károsodás a *Pgc-1 $\alpha$*  deficiens állatokban a vad típusú állatokkal összehasonlítva igen kifejezett. Azonban a *Pgc-1 $\alpha$*  farmakológiai (pl. resveratrol), valamint genetikai stimulációja az MPTP kezelés ellen neuroprotektívnek bizonyult. Két elvégzett vizsgálat tesztelte a *Sirt1* overexpresszió jelentőségét az MPTP kezelés során. Konklúzióként elmondható, hogy a *Sirt1* overexpressziója nem csillapította a toxin által kiváltott károsodás mértékét.

A Huntington-kór egy olyan hereditár, autoszómális domináns módon öröklődő neurodegeneratív megbetegedés, amelyet az IT15 génben jelen lévő CAG ismétlődések számának növekedése által generált mutáns huntingtin fehérje okoz (*mHtt*), és leginkább a striatum degenerációjával jellemezhető. Az elvégzett szövettani vizsgálatok igazolták, hogy Huntington-kórban a közepes méretű tüskés neuronok a leginkább sérülékenyek, ezzel szemben az interneuronok többségében megkíméltek. Korábbi közlemények bizonyítják, hogy a mutáns huntingtin fehérje a PGC-1 $\alpha$ -t gátolja a transzkripciójának diszregulációja által. Török és *mtsai* (2015) elsőként vizsgálták a Huntington-kór 8-, 12- és 16 hetes állatmodelljeiben (N171-82Q) az FL-, NT-, REF-, CNS-*Pgc-1 $\alpha$*  mRNS-ek agyi régiókban

való megoszlását. Vizsgálataik során a 8 hetes állatok striatális és kortikális régióiban az FL-Pgc-1 $\alpha$  mRNS szintjének szignifikáns csökkenését detektálták. Ezzel szemben a 16 hetes állatok striatális és kortikális mintáiban az NT-Pgc-1 $\alpha$  mRNS szintje fokozott volt. Török és *mtsai* (2015) a cerebellumot is részleteiben vizsgálták és szignifikánsan megemelkedett FL- és NT-Pgc-1 $\alpha$  mRNS szinteket mértek. Az eredmények háttérében kompenzatorikus mechanizmust feltételeztek. A Sirtuinok és a Huntington-kór lehetséges összefüggésének vizsgálatára ezidáig több kísérlet történt. Összességében elmondható, hogy a Sirt1/SIRT1 mRNS és protein szintek változásai inkonzekvensek.

A fentebb részletezett adatok hiányosak: kevés adat áll rendelkezésre a PGC- és Sirtuin rendszerek izoformáinak agyi régió specifikus megoszlására vonatkozóan, annak ellenére, hogy egyre több közlemény hangsúlyozza az alternatív splicing és promóter használat során keletkező, potenciálisan új biológiai funkcióval járó izoformák szerepét. Igen fontosnak tartjuk ebből adódóan, hogy e rendszerek az egyes neurodegeneratív betegségek vonatkozásában részletesen karakterizálva legyenek, hogy a jövőben esetleges új terápiás célpontok kerüljenek azonosításra.

## II – CÉLOK

### A kutatás fő céljai a következők voltak:

- (1) Meghatározni a hűtés (4°C; 200 és 900 perc) hatását a PGC- és Sirtuin rendszer elemeire (FL-, NT-, CNS-, REF-Pgc-1 $\alpha$ , Sirt1, Sirt3-M1/M2/M3) különböző, a motoros funkciók szabályozásának szempontjából legfontosabb agyi régiókban (striatum (Str), cortex (Ctx), cerebellum (Crb)), C57Bl/6J egerekben.
- (2) Meghatározni a testmozgás (2x30 perc/nap; 5 vagy 12 napig) hatását a PGC- és Sirtuin rendszer elemeire (FL-, NT-, CNS-, REF-Pgc-1 $\alpha$ , Sirt1, Sirt3-M1/M2/M3) különböző, a motoros funkciók szabályozásának szempontjából legfontosabb agyi régiókban (Str, Ctx, Crb), C57Bl/6J egerekben.
- (3) Meghatározni az MPTP toxin (5x1 i.p. inj. (15 mg/kg) 1 napig; disszekció 90 perccel vagy 1 héttel az utolsó oltást követően) hatását a PGC- és Sirtuin rendszer elemeire (FL-, NT-, CNS-, REF-Pgc-1 $\alpha$ , Sirt1, Sirt3-M1/M2/M3) a motoros funkciók szabályozásának szempontjából legfontosabb agyi régiókban (Str, Ctx, Crb), C57Bl/6J egerekben.
- (4) Meghatározni a Sirt1 és a három Sirt3 izoforma mRNS expressziós mintázatát az N171-82Q Huntington-kór transzgén egerek striatumában, kortexében és cerebellumában. Továbbá célunk volt a transzgén jelenlétének, az öregedésnek, valamint a nemnek expresszióra kifejtett hatásainak vizsgálata.

### III – ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

ÁLLATOK – A hűtés és a testmozgás kísérletek során 20 hetes nőstény (C57Bl/6J) egeret használtunk. Az MPTP toxin vizsgálatban 12 hetes hím (C57Bl/6J) egerek vettek részt. A transzgén jelenlétének PGC- és Sirtuin rendszerekre kifejtett hatásainak vizsgálata során 8-, 12- és 16 hetes N171-82Q egerek és kontroll csoportjaik (B6C3, azonos genetikai háttérrel) lettek bevonva (hím és nőstény egerek egyaránt). Minden transzgén állat eredetileg a Jackson laboratóriumból származott (Bar Harbor, ME, USA). Az egereket előre meghatározott diurnális ritmus szerint (12-12 h nappal-éjszaka) ketrecekben tartottuk. Az élelemhez és a vízhez szabad hozzáférésük volt az állatoknak. A kísérletek az európai direktívákat szem előtt tartva történtek (86/609/EEC).

#### KEZELÉSI PROTOKOLLOK -

(1) *HŰTÉS* – Az állatokat véletlenszerűen 4 csoportba osztottuk ( $n = 7-8$ /csoport). Az első csoportot naponta 40 percig tartottuk  $4^{\circ}\text{C}$ -on 5 napig (200 min), míg a második csoportot naponta 180 percig szintén 5 napig (900 min). A hűtési expozíciót követően az állatokat standard környezetükbe ( $22-24^{\circ}\text{C}$ ) helyeztük vissza. A harmadik és a negyedik csoport kontroll állatait az előbbi két csoport állataival egy szobában helyeztük el ( $22-24^{\circ}\text{C}$ ).

(2) *TESTMOZGÁS* – E vizsgálatokhoz rotarod készüléket használtunk. Az egereket random módon 4 csoportba osztottuk ( $n = 5-8$ /csoport). Az első és a második csoportban lévő állatok vettek részt a testedzésben. Az állatokat naponta 2 alkalommal (de. 9 és du. 4 órakor) helyeztük fel a rotarodra. Az első csoport esetében a vizsgálat 5 napig, míg a második esetében 12 napig tartott. Az állatoknak rövid tanulási idő állt rendelkezésre a vizsgálatok megkezdése előtt. A standard sebesség 5 RPM volt (30 perc). Minden egyes testmozgási szakasz előtt az állatokat legalább fél órával a vizsgálatot megelőzően akklimatizálódás céljából a vizsgálati helyiségbe transzportáltuk. A harmadik és negyedik csoport kontrollként szolgált.

(3) *MPTP KEZELÉS* – Az MPTP-t foszfát-pufferelt sóoldatban oldottuk fel az intraperitoneális (i.p.) injekció előtt (PBS;  $\text{pH} = 7.4$ ). Az állatokat véletlenszerűen 4 csoportba osztottuk ( $n = 7-8$ /csoport). Az első és a második csoport kapott intraperitoneális MPTP injekciót (15 mg/ttkg; naponta 5-ször, 2 óránként). A harmadik és a negyedik csoport

kontrollként szolgált. Ezek az állatok 0.1 M-os PBS oldatot kaptak intraperitoneálisan a fent említett protokollnak megfelelően.

MINTÁK KEZELÉSE – A hűtés és a testmozgás kísérletek során az állatokat 90 perccel az utolsó kísérleti fázist követően isofluránnal túlaltattuk, majd disszekáltuk (Forane; Abott), végül az agyuk a koponyából gyorsan eltávolításra került. Az MPTP toxin kísérlet során az első csoportban lévő állatokat az utolsó injekciót követően 90 perccel disszekáltuk (akut kísérlet), míg a második csoportba tartozó állatok csak egy héttel később (szubakut kísérlet). A harmadik és a negyedik csoportok állatait (kontroll) az első és második csoportoknak megfelelően disszekáltuk. Az N171-82Q kísérlet során felhasznált állatok a megfelelő életkor (8-, 12-, 16 hetes kor) elérésekor szintén feldolgozásra kerültek (a kontroll csoportok hasonlóképpen). A disszekció során, a koponyából eltávolított agyat egy folyamatosan hidegen tartott felületen a középvonalban elvágtuk, majd a megfelelő agyterületeket (Str, Ctx, Crb) egymástól elszeparáltuk. Az RT-PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) vizsgálat idejéig a mintákat  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

RT-PCR ANALÍZIS – A használati utasításnak megfelelően, Trizol reagenssel a teljes RNS mennyiséget izoláltuk a Str-ből, Ctx-ből és a Crb-ből. Az RNS koncentrációt MaestroNano spektrofotométer segítségével határoztuk meg és az RNS minták integritását véletlenszerűen gélelektroforézissel (1%-os agaróz gél) ellenőriztük. 1  $\mu\text{g}$  mennyiségű RNS-ből cDNS-t írtunk át random hexamer primerek és reverz transzkriptáz felhasználásával (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit). A cDNS-t  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további felhasználásig. CFX 96 Real-Time System (Bio-Rad, USA) rendszert használtunk a RT-PCR vizsgálatok elvégzéséhez. Különböző primerek felhasználásával detektáltuk az egyes mRNS szintek változásait (végtérfogat = 20  $\mu\text{l}$ ). A következő Pgc-1 $\alpha$  és Sirtuin primerek kerültek felhasználásra: FL-Pgc-1 $\alpha$ : forward - ex4/ex5 és reverse - ex6/ex7; NT-Pgc-1 $\alpha$ : forward - ex4/ex5 és reverse - ex6/7a; CNS-Pgc-1 $\alpha$ : forward - exB4 és reverse - ex3; Ref-Pgc-1 $\alpha$ : forward - ex1a/ex2 és reverse - ex3; Sirt1: forward - ex7/ex8 és reverse - ex8); Sirt3-M1: forward - ex1b és reverse - ex3; Sirt3-M2: forward - ex1b és reverse - ex3; Sirt3-M3: forward - ex2 és reverse - ex3. A célzott génexpressziós vizsgálat során a 18S rRNS gént alkalmaztuk endogén kontrollnak (Applied Biosystems, USA). A relatív expressziót a  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  módszerrel számítottuk ki.

STATISZTIKA – A statisztikai értékeléshez a szabadon hozzáférhető R programot használtuk (R Development Core Team). A populáción belüli adatok megoszlását Shapiro-Wilk teszttel



ellenőriztük. A varianciák homogenitását Levene teszttel vizsgáltuk. A hűtés és a testmozgás kísérletekben a Pgc-1 $\alpha$  és a Sirtuin génexpressziós szinteket a vizsgált agyterületekben a kontroll csoportjukkal hasonlítottuk össze (10,000 random permutációt végeztünk) kétmintás t-próba alkalmazásával. Fischer-Pitman permutációs tesztet végeztünk a hűtés és a testmozgás kísérletekben. Az MPTP toxin kísérletekben Monte-Carlo permutációt követően szintén kétmintás t-próbát végeztünk (kb. 10,000 random permutáció). A Huntington-kór modelljének vizsgálata során az adatok számos alkalommal inhomogén eloszlást mutattak és a varianciák sem voltak egyenlők. Ezen okokból kifolyólag Scheirer-Ray-Hare tesztet végeztünk annak érdekében, hogy meg tudjuk határozni a vizsgált faktorok közötti különbségeket és interakciókat. Ezt követően permutációs t-teszteket végeztünk post hoc analízisként a páronkénti összehasonlítás és az egyes típusú hiba kiküszöbölése érdekében. Tekintettel arra, hogy vizsgálataink szempontjából nem mindegyik lehetséges összehasonlítás volt releváns, összesen 9 összehasonlítást végeztünk el. Minden esetben a vizsgált agyi régiók Pgc-1 $\alpha$  génexpressziós szintjét a kontroll striatális FL-, valamint a CNS-Pgc-1 $\alpha$  szintekhez hasonlítottuk. A Sirtuinok vizsgálatánál a génexpressziós szinteket a Sirt1 esetében a kontroll striatális szinthez, míg a Sirt3 izoformák esetében a kontroll csoport striatális Sirt3-M1 szintjéhez képest számítottuk ki. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték kisebb volt 0.05-nél.

#### IV – EREDMÉNYEK

HŰTÉS – Sem a 200, sem a 900 perces hűtés (4°C) nem eredményezett változást a Pgc-1 $\alpha$  szintekben semelyik vizsgált agyi régióban. 200 perc hűtést követően szintén nem találtunk eltérést a Sirt és a Sirt3-M2 transzkriptek vonatkozásában egyik agyi régióban sem, azonban a Sirt3-M1 kortikális szintjének emelkedését (ctrl (kontroll):  $1.26 \pm 0.49$ ; EX (kezelt):  $1.97 \pm 0.60$ ;  $p = 0.036$ ), valamint a Sirt3-M3 cerebelláris szintjének csökkenését detektáltuk (ctrl:  $0.16 \pm 0.05$ ; EX:  $0.10 \pm 0.03$ ;  $p = 0.027$ ). 900 perc hűtés hatására a kortikális Sirt1 (ctrl:  $1.14 \pm 0.31$ ; EX:  $0.66 \pm 0.24$ ;  $p = 0.008$ ) és a striatális Sirt3-M1 (ctrl:  $1.04 \pm 0.30$ ; EX:  $0.72 \pm 0.21$ ;  $p = 0.029$ ) szintek csökkenését észleltük.

TESTMOZGÁS – 5 nap rotarodon végzett edzést követően nem tapasztaltunk változást a PGC-1 $\alpha$  izoformák vonatkozásában semelyik általunk vizsgált agyi régióban. Ezzel szemben 12 nap testedzést követően mindegyik izoforma (FL-Pgc-1 $\alpha$ , NT-Pgc-1 $\alpha$ , CNS-Pgc-1 $\alpha$  és

REF-Pgc-1 $\alpha$ ) szignifikánsan megemelkedett a Crb-ban (FL-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $1.32 \pm 0.20$ ; EX:  $1.59 \pm 0.19$ ;  $p = 0.024$ ; NT-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $0.29 \pm 0.04$ ; EX:  $0.38 \pm 0.04$ ;  $p = 0.0002$ ; CNS-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $1.35 \pm 0.23$ ; EX:  $1.80 \pm 0.32$ ;  $p = 0.003$ , REF-PgcC-1 $\alpha$ : ctrl:  $0.21 \pm 0.03$ ; EX:  $0.30 \pm 0.02$ ;  $p = 0.0003$ ). A Str és a Ctx vonatkozásában nem tapasztaltunk jelentős változást. A Sirtuinok vizsgálata során elmondhatjuk, hogy az 5 napos testedzés hatására megemelkedett a kortikális Sirt1 szint (ctrl:  $0.78 \pm 0.10$ ; EX:  $0.97 \pm 0.16$ ;  $p = 0.042$ ). A többi izoforma azonban változatlan maradt. A 12 napos testedzés szintén megemelte mind a Sirt3-M1, mind a Sirt3-M2 mRNS szinteket a Crb-ban (Sirt3-M1: ctrl:  $0.79 \pm 0.18$ ; EX:  $1.28 \pm 0.30$ ;  $p = 0.002$ ; SIRT3-M2: ctrl:  $0.33 \pm 0.09$ ; EX:  $0.50 \pm 0.10$ ;  $p = 0.007$ ). A Sirt1 és a Sirt3-M3 vonatkozásában azonban nem találtunk eltérést egyik általunk vizsgált agyi régióban sem.

MPTP KEZELÉS – Az akut vizsgálati protokollban, 90 perccel az utolsó MPTP injekció beadását követően a striatális (FL-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $0.97$  ( $0.92$ – $1.04$ ); EX:  $1.47$  ( $1.21$ – $1.83$ );  $p = 0.0048$ ; NT-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $0.44$  ( $0.40$ – $0.49$ ); EX:  $0.70$  ( $0.56$ – $0.78$ );  $p = 0.019$ ), kortikális (FL-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $0.96$  ( $0.91$ – $1.06$ ); EX:  $1.23$  ( $1.15$ – $1.43$ ),  $p = 0.009$ ; NT-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $0.46$  ( $0.43$ – $0.48$ ); EX:  $0.69$  ( $0.59$ – $0.71$ );  $p = 0.0012$ ) és cerebelláris (FL-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $1.50$  ( $1.27$ – $1.90$ ); EX:  $2.40$  ( $2.07$ – $2.76$ );  $p = 0.013$ ; NT-Pgc-1 $\alpha$ : ctrl:  $0.67$  ( $0.48$ – $0.86$ ); EX:  $1.21$  ( $1.14$ – $1.44$ );  $p = 0.009$ )) FL- és NT-Pgc-1 $\alpha$  szintek szignifikánsan megemelkedtek. Továbbá az MPTP kezelés a CNS-Pgc-1 $\alpha$  szintek megemelkedését is eredményezte minden vizsgált agyi régióban a kontroll csoporthoz képest (Str: ctrl:  $1.03$  ( $0.88$ – $1.11$ ); EX:  $1.38$  ( $1.34$ – $1.78$ );  $p = 0.0069$ ; Ctx: ctrl:  $0.91$  ( $0.80$ – $0.98$ ); EX:  $1.41$  ( $1.24$ – $1.42$ );  $p = 0.0048$ ; Crb: ctrl:  $1.51$  ( $1.20$ – $1.98$ ); EX:  $2.77$  ( $2.34$ – $3.17$ );  $p = 0.019$ ). Ezzel szemben a REF-Pgc-1 $\alpha$  szintje egyik vizsgált agyi régióban sem változott (Str (ctrl:  $0.11$  ( $0.10$ – $0.12$ ); EX:  $0.11$  ( $0.95$ – $0.12$ )); Ctx (ctrl:  $0.11$  ( $0.11$ – $0.12$ ); EX:  $0.09$  ( $0.08$ – $0.10$ )); Crb (ctrl:  $0.21$  ( $0.20$ – $0.29$ ); EX:  $0.28$  ( $0.24$ – $0.29$ )). Azon állatok vizsgált agyi régióiban, akiknek a disszekciója 1 héttel az utolsó MPTP injekció beadását követően történt, nem találtunk szignifikáns eltérést a csoportok közötti összehasonlítás során.

A Sirtuinok vonatkozásában az akut vizsgálati protokoll alkalmazásakor az utolsó MPTP injekciót követően nem találtunk génexpressziós változást a vizsgált agyi régiókban. Ezzel szemben 1 héttel az utolsó MPTP kezelést követően enyhe szignifikancia mutatkozott a cerebelláris Sirt3 izoformák tekintetében (Sirt3-M1: ctrl:  $1.11 \pm 0.29$ ; EX:  $1.44 \pm 0.14$ ;  $p = 0.015$ ; Sirt3-M2: ctrl:  $0.33 \pm 0.08$ ; EX:  $0.44 \pm 0.05$ ;  $p = 0.021$ ; Sirt3-M3: ctrl:  $0.03 \pm 0.01$ ; EX:  $0.044 \pm 0.01$ ;  $p = 0.018$ ). Azonban e szignifikanciák a Bonferroni-korrekció után eltűntek.

NI71-82Q KÍSÉRLET – A vizsgálataink során nem találtunk szignifikáns különbséget a nemek vonatkozásában a Sirtuin izoformák, valamint a vad és transzgén csoportok között, emiatt a hím és nőstény állatok adatait közösen elemeztük tovább. A Sirt1 és Sirt3 izoformák expressziójának vizsgálatakor nem találtunk interakciót a transzgén jelenléte és az öregedés között. A különálló hatásokra fókuszálva szignifikáns Sirt1 emelkedést találtunk a transzgén állatok minden kortikális és cerebelláris mintájában a vad típusú állatokhoz képest (Ctx (8 hetes:  $p = 0.0029$ ; 12 hetes:  $p = 0.0018$ ; 16 hetes:  $p = 0.0029$ ); Crb (8 hetes:  $p = 0.0052$ ; 12 hetes:  $p = 0.0054$ ; 16 hetes:  $p = 0.0065$ )). Ezzel szemben a Str-ban nem találtunk eltérést. Az öregedés hatásának vizsgálata során a Sirt1 szintjének növekedését egyedül a 16 hetes transzgén állatok Crb-ában tudtuk detektálni (8- vs. 16 hetes:  $p = 0.0245$ ; 12- vs. 16 hetes:  $p = 0.0316$ ). A striatális és kortikális Sirt3-M1 egyik életkorban sem mutatott változást a kontroll csoporthoz képest. Ezzel szemben a cerebelláris minták Sirt3-M1 expressziója magasabb volt minden életkorban a kontroll csoporthoz képest (8 hetes:  $p = 0.0024$ ; 12 hetes:  $p = 0.0024$ ; 16 hetes:  $p = 0.0024$ ). Az életkor nem fejtett ki hatást a Sirt3-M1 izoformára egyik vizsgált csoportban sem. A striatális és kortikális Sirt3-M2 szint sem mutatott eltérést a két csoport (vad típusú, transzgén) között, azonban szignifikáns emelkedést azonosítottunk a Crb-ban az életkor szerinti összehasonlítások során (8 hetes:  $p = 0.0021$ ; 12 hetes:  $p = 0.0012$ ; 16 hetes:  $p = 0.0021$ ). Az életkor hatását vizsgálva elmondható, hogy egyedül a kortikális minták Sirt3-M2 relatív expressziója csökkent a 16 hetes vad típusú állatokban (8- vs. 16 hetes:  $p = 0.038$ ; 12- vs. 16 hetes:  $p = 0.038$ ). Habár a Sirt3-M3 expressziója szignifikánsan megemelkedett minden transzgén striatális és cerebelláris mintában a kontroll csoporthoz képest, azonban a Ctx-ben csak a 16 hetes transzgén állatokban lehetett ezt kimutatni (Str (8 hetes:  $p = 0.0097$ ; 12 hetes:  $p = 0.0054$ ; 16 hetes:  $p = 0.0097$ ); Ctx (16 hetes:  $p = 0.0032$ ); Crb (8 hetes:  $p = 0.002$ ; 12 hetes:  $p = 0.0006$ ; 16 hetes:  $p = 0.0016$ )). Mind a vad, mind a transzgén 12 hetes állatokban a striatális minták Sirt3-M3 expressziója csökkent (8- vs. 12 hetes (wt-wt):  $p = 0.0243$ ; 8- vs. 12 hetes (tg-tg):  $p = 0.036$ ).

## V – MEGBESZÉLÉS

A mitokondriális diszfunkció egyike a legfontosabb tényezőknek a neurodegeneráció patomechanizmusában. Ebből következik, hogy minden olyan kísérlet, amely a mitokondriális rendszer megóvását, javítását célozza, potenciálisan neuroprotektívnek tekinthető. Számos korábban megjelent közlemény hangsúlyozza a PGC- és Sirtuin rendszerek relevanciáját a fenti kontextusban. Mindazonáltal e rendszerek részletes karakterizálása nem történt még meg. Ebből fakadóan kutatásunk fő célja volt, hogy e rendszereket részleteiben megvizsgáljuk (agy-i régió és izoforma specifikusan) különböző környezeti (hűtés, testmozgás), toxin (MPTP) és transzgén (N171-82Q) modellekben.

A hűtés hatását a barna zsírszövetre, valamint a vázizomzatra korábban már széles körben vizsgálták. Összességében elmondható, hogy az elvégzett vizsgálatok – habár számos különböző experimentális protokollt használtak (különböző hőmérséklet, hűtési periódus, változó állatmodellek, és ezek különböző életkora) – arra utalnak, hogy a PGC- (FL-, NT-Pgc-1 $\alpha$ ) és a Sirtuin rendszer (Sirt1, -2, -3, -6) elemei hűtéssel aktiválhatók. Ezzel szemben igen kevés adat áll rendelkezésre a központi idegrendszer és a hűtés vonatkozásában. Tritos és *mtsai* (2003) kísérletük során nem találtak eltérést a Pgc-1 $\alpha$  mRNS szintekben 4 óra (4°C) hűtést követően 18-20 hetes hím C57Bl/6J állatokban. Ezzel megegyezően kísérleteink (200 és 900 perc hűtés) során mi sem találtunk változást a Pgc-1 $\alpha$  izoformákban (FL-, NT-, CNS-, REF-Pgc-1 $\alpha$ ) egyik általunk vizsgált agyi régióban sem. Másrésztől azonban a 200 perces hűtés megemelte a kortikális Sirt3-M1 mRNS szintjét, valamint lecsökkentette a cerebelláris Sirt3-M3 szintet. 900 perces hűtés hatására a kortikális Sirt1 és a striatális Sirt3-M1 szintek csökkentek. A talált eltérések magyarázataként felmerül, hogy a hűtési protokollunk ineffektív volt az állatok maghőjének lecsökkentésében. Feltételezzük, hogy a korai barna zsírszövet- és a vázizom eredetű kompenzatórikus mechanizmusok megvédték az agyat a hűtés hatásától. Mindenesetre konklúzióként elmondható, hogy a Sirtuin rendszer szenzitívebbnek tűnik a hűtésre, mint a PGC-rendszer.

A testmozgás hatását a PGC- és a Sirtuin rendszerekre széleskörűen vizsgálták, azonban a felhasznált modellek és testmozgási protokollok igen megnehezítik az eredmények összehasonlítását és interpretációját. A vázizomzatban a Pgc-1 $\alpha$  izoformák egyértelműen megemelkednek testmozgás hatására. Ezen emelkedés mértéke nagy mértékben függ az alkalmazott testmozgás típusától és intenzitásától. Úgy tűnik, hogy különböző aktivitású

testmozgások esetén különböző komplex programok között váltás történik (beleértve a promóter váltást). A Sirtuin rendszer néhány eleme is számos vizsgálat tárgyát képezte már, elsősorban a testmozgás intenzitásának, az állatok életkorának és az egyes Sirtuin altípusoknak a vonatkozásában. Összegezve tehát a testmozgás hatására a Sirt1 és Sirt6 szintek megemelkednek. A hűtéssel szemben a testmozgás hatását a központi idegrendszerben is már valamennyire vizsgálták. Steiner és *mtsai* (2011) 8 hét testmozgást követően nézték a PGC- és Sirtuin rendszerek változásait egér agyban. Számos vizsgált agyterületben egyértelmű emelkedést tapasztaltak (pl.: Ctx, hippokampusz, frontális lebeny), de izoformákat nem néztek. Steiner vizsgálataival szemben Gusdon és *mtsai* (2017) nem találtak sem a PGC-1 $\alpha$  -, sem a SIRT3 protein szintekben eltérést 17 napos testmozgást követően sem fiatal, sem idősebb állatokban. Számos egyéb vizsgálat történt különböző protokollokkal, ugyanakkor ellentmondó eredményekkel. Kísérleteink során célunk volt, hogy ezeket az ellentmondásokat némileg feloldjuk a PGC- és a Sirtuin rendszerekben végzett – két különböző testmozgási protokollt követő – részletes vizsgálattal. A rövidebb idejű (5 nap) kísérlet során nem találtunk egyik agyterület és izoforma esetében sem eltérést. Ezzel szemben 12 nap testmozgást követően igen kifejezett cerebelláris aktivációt figyeltünk meg, amely eredmények Steiner csoportjának megfigyeléseivel nagy mértékben konzisztensek. A Sirtuin rendszerben az 5 napos testmozgás szintén nem okozott változást az mRNS szintekben, azonban a hosszabb protokollt követően a cerebelláris Sirt3-M1 és Sirt3-M2 mRNS szintek megnövekedtek. Ezen adatok azt sugallják, hogy a rövid ideig tartó edzés nem, míg a hosszabb edzés képes aktiválni a Sirtuin rendszert, elsősorban a Crb-ban. Ezen eredmények háttérében azt feltételezzük, hogy a prominens cerebelláris Pgc- és Sirtuin aktiváció összefüggésben állhat a Purkinje sejtek közötti szinaptikus kapcsolatok fejlődésével, mely által optimálisabb motoros koordinációt és integrációt eredményez. Lucas és *mtsai* (2015) *Pgc* knockout egerek agyában a Purkinje sejtek csökkent számát és tüzelési frekvenciáját figyelték meg, amely tovább erősítette feltételezésünket.

A Parkinson-kór egyik leginkább elfogadott modellje az MPTP toxin kísérlet. A PGC-rendszerrel való összefüggéséről ismert a korábban publikált irodalomból, hogy a PGC-rendszer genetikai vagy farmakológiai stimulációja az MPTP toxin által okozott károsodásokat csillapítani tudja. Ezzel szemben a *Pgc-1 $\alpha$*  knockout egerekben egy fokozott érzékenység figyelhető meg. Továbbá úgy tűnik, hogy a PGC-rendszer csak rövid ideig kompenzál az MPTP toxin beadását követően. Kísérleteink során a PGC-rendszer elemeit vizsgáltuk meghatározott agyi régiókban MPTP kezelést követően. Akut kísérleti

protokollunk során azt tapasztaltuk, hogy minden általunk vizsgált agyi régióban minden izoforma szignifikánsan megemelkedik a kontroll csoporthoz képest. Ezzel szemben a szubakut kísérlet során e megemelkedés már nem volt észlelhető. A cerebelláris rendszer aktivációja felveti továbbá, hogy az MPTP nem teljesen szelektíven hat. Az MPTP hatása a Sirtuin rendszerre kevésbé karakterizált. Két tanulmány vizsgálta a *Sirt1* stimuláció potenciális neuroprotektív hatását az MPTP toxicitás ellen. E vizsgálatok konklúziójaként leírható, hogy a stimuláció önmagában nem csillapította a neurotoxikus hatást. Hiányoznak az adatok az MPTP és a Sirtuin rendszer összefüggésére vonatkozóan. Úgy tűnik azonban, hogy a *Sirt3* és a *Sirt5* null egerekben az MPTP által okozott károsodás kifejezettebb. Vizsgálataink során egy enyhe, normalizációt követően eltűnő cerebelláris Sirt3 aktivációt találtunk a szubakut MPTP kísérlet során, amely felveti egy potenciálisan lassabban aktiválódó cerebelláris Sirtuin rendszer lehetőségét.

A Sirtuinok bizonyítottan részt vesznek a Huntington-kór patomechanizmusában, azonban a pontos szerepükre vonatkozóan az eredmények ellentmondóak. Tulino és *mtsai* a striatális Sirt1 mRNA expresszió csökkenését detektálták a negyedik és a kilencedik életkori hét között vad típusú állatokban, míg a cerebelláris Sirt1 mRNA szignifikáns emelkedését a kilencedik és a tizennegyedik életkori hét között az azonos kontroll állatokban az R6/2 egér modell vizsgálat során (átlagos repeat szám: 204). A transzgén jelenléte látszólag nem befolyásolta a Sirt1 mRNA expresszióját. Egy másik kutatócsoport (Reynolds és *mtsai*) szintén meghatározta a Sirt1 mRNA szintjét 5, 8, 11 (átlagos repeat szám: 144) és 8, 12 (átlagos repeat szám: 182) hetes R6/2 egerek teljes agyi mintáiban. Az 5, 8, 11 hetes 144 repeat számmal rendelkező állatokban minden transzgén állat csoportban a Sirt1 mRNA szint megemelkedett. Az öregedés nem befolyásolta az értékeket. Ennek megfelelően nem volt szignifikáns interakció a kor és a transzgén jelenléte között. A 182 repeatet tartalmazó kizárólag nőstény egerekkel végzett kísérletben egyedül a 8 hetes csoportban detektáltak szignifikáns emelkedést. Az eltérő CAG repeat számból, a különböző életkorokból és agyi régiókból, valamint a nemek összetételéből adódóan az egyes vizsgálatok összehasonlíthatósága korlátozott. Vizsgálatunk során nem találtunk szignifikáns különbséget a nemek között, ebből adódóan a Tulino és Reynolds által végzett vizsgálatokat e faktor feltehetően nem befolyásolta. Hasonlóan Tulino munkacsoportjához, mi sem találtunk a striatum vonatkozásában a transzgén jelenlétének tulajdonítható hatást, azonban hasonlóan Reynoldsék munkacsoportjához, a kortikális és a cerebelláris minták Sirt1 expressziója fokozott volt a transzgén állatokban a vad típusú állatokhoz képest minden vizsgált életkorban. Az öregedés és a transzgén jelenléte között itt

sem találtunk interakciót. Az öregedés hatására kialakuló striatális és cerebelláris Sirt1 mRNS expresszió fokozódást a vad típusú állatokban, hasonlóan Tulinoékhoz, mi sem tudtuk tudunk kimutatni. Habár irodalmi adatok támasztják alá, hogy a mitokondriálisan ható Sirt3 a Huntington-kór modelljeiben jótékony hatással rendelkezik, ezidáig nem történt meg ezen izoforma expressziós mintázatának meghatározása a Huntington-kór modelljében. Tanulmányunkban, hasonlóan a Sirt1-Fl-hez, jelentős cerebelláris Sirt3 expresszió fokozódást figyeltünk meg a transzgén állatokban a kontroll csoporthoz képest. A striatális Sirt3-M3 expresszió minden életkorban, valamint a kortikális Sirt3-M3 a 16 hetes állatokban megemelkedett. Azonban fontos megjegyezni, hogy a Sirt3-M3 mRNS relatív expressziós szintje a másik két transzkripthez képest jelentősen csökkent. A 16 hetes vad típusú állatok kortikális Sirt3-M2 szintje, illetve a vad- és transzgén állatok 12 hetes striatális Sirt3-M3 szintje szintén csökkent. A vizsgálatunk során detektált SIRT altípusok expressziós mintázata nagyban hasonlít a kutatócsoportunk által korábban publikált, PGC-vel kapcsolatos eredményekhez. Az azonos expressziós mintázat mögött feltehetően az állhat, hogy a Sirtuinok a Pgc-1 $\alpha$  regulátorai. Habár a Huntington-kór patomechanizmusában a Crb nem a leginkább érintett terület, mégis egyre több adat kerül publikálásra a Crb Huntington-kórban betöltött szerepét illetően. Néhány, motoros predomináns tünetekkel járó, Huntington-kóros beteg cerebellumában jelentős Purkinje sejt vesztesség került leírásra. A sejtpusztulás mértéke összefüggést mutatott a CAG ismétlődések számával. Azonban nincs egyértelmű összefüggés a betegség stádiuma, valamint a Purkinje- és szemcsesejt pusztulás mértéke között. Az észlelt cerebelláris patológia igen variábilis volt. E variabilitás oka (bizonyos esetekben a Crb teljes megkíméltségével) azonban nem tisztázott. Mindazonáltal néhány tanulmány felvetette a Huntington-kóros betegek agyában a fokozott cerebelláris metabolizmus lehetőségét, amely feltehetően kompenzatórikusan aktiválódik a károsodott fronto-striato-thalamikus körök érintettsége kapcsán. A cerebelláris Pgc-1 $\alpha$  - és Sirt mRNS expresszió szignifikáns emelkedése az N171-82Q modell állatokban feltehetően e kompenzatórikusan felfokozott metabolikus válasz eredményeként értelmezhető. Továbbá a megemelkedett Sirt3 mRNS expresszió felveti a mitokondriális involváció lehetőségét is. A SIRT-PGC tengely jelentőségét tovább erősíti, hogy az FL-Pgc-1 $\alpha$  knockout egerekben a cerebelláris magvak reaktív asztrogliózisa került leírásra a Str és a Ctx teljes megkíméltsége mellett.

## VI – KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Dr. Klivényi Péternek, aki valódi lehetőséget adott, hogy tudományos munkát végezzek a laboratóriumban. Hálás vagyok folyamatos támogatásáért, melyet mind a tudományos, mind a személyes életem során nyújtott. Kiemelt köszönettel tartozom társtéma-vezetőmnek, Dr. Zádori Dénesnek a kiváló szakmai vezetéséért, valamint a tudományos munkám során biztosított folyamatos támogatásáért. Lehetőségem volt tőle megtanulni az alapos munka és a precizitás értékét. Továbbá nagyon hálás vagyok Dr. Maszlag-Török Ritának, aki időt és energiát nem sajnálva megtanított a laboratóriumi metodikák alkalmazására.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vécsei Lászlónak, aki lehetőséget biztosított, hogy tudományos munkát végezzek a laboratóriumban. Szeretnék továbbá köszönetet mondani Vágvölgyi-Sümege Evelinnek, Dr. Boros Fanninak, Dr. Veres Gábornak, valamint Dr. Szpisjak Lászlónak a munkám során nyújtott támogatásukért.

Végül, de nem utolsósorban nagyon hálás vagyok családomnak, akik nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Köszönöm feleségemnek, Nórának, aki időt biztosított a tudományos munkára és folyamatosan támogatott. Hálás vagyok édesanyámnak, aki felnevelt és kitanított. E dolgozatot édesapám emlékének ajánlom.

(A tézisfüzetben található tudományos állítások referenciái a disszertációban találhatóak.)



### **A TÉZISHEZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK**

**I. Salamon A**, Maszlag-Török R, Veres G, Boros FA, Vágvölgyi-Sümege E, Somogyi A, Vécsei L, Klivényi P, Zádori D (2020) Cerebellar predominant increase in mRNA expression levels of Sirt1 and Sirt3 isoforms in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurochem Res* (accepted publication) (original paper; **IF** (2018): **2,782**)

**II. Salamon A**, Török R, Sümege E, Boros F, Pesei ZG, Fort Molnár M, Veres G, Zádori D, Vécsei L, Klivényi P (2019) The effect of physical stimuli on the expression level of key elements in mitochondrial biogenesis. *Neurosci Lett* 698: 13-8 (original paper; **IF** (2018): **2,173**)

**III. Török R, Salamon A**, Sümege E, Zádori D, Veres G, Fort Molnár M, Vécsei L, Klivényi P (2017) Effect of MPTP on mRNA expression of PGC-1 $\alpha$  in mouse brain. *Brain Res* 1660: 20-6 (original paper; **IF**: **3,125**)

A TÉZISHEZ KÖZVETLENÜL KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK IMPAKT FAKTORA:  
**8,08**

### **A TÉZISHEZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK**

**I. Salamon A**, Dézsi L, Radics B, Varga ET, Hortobágyi T, Tömösvári A, Vécsei L, Klivényi P, Rajda C (2020) CANOMAD syndrome with respiratory failure. *Ideggyogy Sz* 73: 141–4 (case report; **IF** (2018): **0,113**)

**II. Szpisjak L, Salamon A**, Zádori D, Klivényi P, Vécsei L (2020) Selecting dopamine depleters for hyperkinetic movement disorders: how do we choose? *Expert Opin Pharmacother* 21: 1-4 (editorial article; **IF** (2019): **0**)

**III. Salamon A, Zádori D, Szpisjak L, Klivényi P, Vécsei L (2019) Neuroprotection in Parkinson's disease: facts and hopes. J Neural Transm (Vienna) 127: 821-9 (review article; IF (2018): 2,903)**

**IV. Salamon A, Zádori D, Szpisjak L, Klivényi P, Vécsei L (2019) Opicapone for the treatment of Parkinson's disease: an update. Expert Opin Pharmacother 20: 2201-7 (review article; IF (2018): 3,038)**

**V. Salamon A, Zádori D, Horváth E, Vécsei L, Klivényi P (2019) Zonisamide treatment in myoclonus-dystonia. Orv Hetil 160: 1353-7 (case report; IF (2018): 0,564)**

**VI. Salamon A, Faragó P, Németh VL, Szépfalusi N, Horváth E, Vass A, Bereczky Z, Tajti J, Vécsei L, Klivényi P, Zádori D (2019) Multiple ischemic stroke in Osler-Rendu-Weber disease. Ideggyogy Sz 72: 65-70 (case report; IF (2018): 0,113)**

A TÉZISHEZ KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK IMPAKT FAKTORA: 6,731.

**KUMULATÍV IMPAKT FAKTOR: 14,81**