

PARK génekről és hosszú nem-kódoló RNS-ekről – a Parkinson kór lehetséges molekuláris okairól

Ph.D. értekezés

Összefoglaló

készítette

Dr. Boros Fanni Annamária



Kísérletes és Klinikai Idegtudomány Képzési Program

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

Témavezetők:

Prof. Dr. Klivényi Péter

Prof. Dr. Vécsei László

Szeged

2020

A tézis alapját képező eredeti közlemények

I. **Boros, F. A.**, Török, R., Vágvölgyi-Sümegei, E., Pesei, Z. G., Klivényi, P., & Vécsei, L. (2019). Assessment of risk factor variants of LRRK2, MAPT, SNCA and TCEANC2 genes in Hungarian sporadic Parkinson's disease patients. *Neuroscience letters*, 706, 140-145. Original paper; IF: **2.274**

II. **Boros, F. A.**, Maszlag-Török, R., Vécsei, L., & Klivényi, P. (2020). Increased level of NEAT1 long non-coding RNA is detectable in peripheral blood cells of patients with Parkinson's disease. *Brain Research*, 1730, 146672. Original paper; IF: **2.733**

A tézis témájához kapcsolódó összefoglaló közlemény

I. **Boros, F. A.**, Vécsei, L., & Klivényi, P. NEAT1 on the field of Parkinson's disease: offense, defense or a player on the bench? *Journal of Parkinson's disease – közlés alatt*; IF: **5.178**

A tézis témájához nem kapcsolódó közlemények

I. **Boros, F. A.**, Bohár, Z., & Vécsei, L. (2018). Genetic alterations affecting the genes encoding the enzymes of the kynurenine pathway and their association with human diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 776, 32-45. Review article; IF: **6.081**

II. **Boros, F. A.**, & Vécsei, L. (2019). Immunomodulatory effects of genetic alterations affecting the kynurenine pathway. *Frontiers in Immunology*, 10, 2570. Review article; IF: **5.085**

III. **Boros, F. A.**, Klivényi, P., Toldi, J., & Vécsei, L. (2019). Indoleamine 2, 3-dioxygenase as a novel therapeutic target for Huntington's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 23(1), 39-51. Review article; IF: **5.473**

IV. Salamon, A., Torok, R., Sumegi, E., **Boros, F.**, Pesei, Z. G., Molnar, M. F., ... & Klivenyi, P. (2019). The effect of physical stimuli on the expression level of key elements in mitochondrial biogenesis. *Neuroscience letters*, 698, 13-18. Original paper; IF: **2.274**

V. Salamon, A., Maszlag-Török, R., Veres, G., **Boros, F. A.**, Vágvölgyi-Sümegei, E., Somogyi, A., ... & Zádori, D. (2020). Cerebellar Predominant Increase in mRNA Expression Levels of Sirt1 and Sirt3 Isoforms in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *Neurochemical Research*, 1-10. Original paper; IF: **3.038**

VI. **Boros, F., & Vécsei, L. (2020).** Progress in the development of kynurenine and quinoline-3-carboxamide-derived drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 1-25.
Review article; IF: **5.081**

Rövidítésjegyzék

PD: Parkinson's disease; Parkinson kór

SNP: single nucleotide polymorphism, egy pontos nukleotid-polimorfizmus

GWAS: genome wide association study; teljes genom asszociációs tanulmány

lncRNA: long non-coding RNA; hosszú nem-kódoló RNS

NEAT1: Nuclear Enriched Abundant Transcript 1; Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1

i.p.: intraperitonealis

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin

SFN: szulforafán

MPP+: 1-metil-4-fenilpiridinium

PQ: parakvát

RFLP: restriction fragment length polymorphism; restrikciós fragment hossz polimorfizmus

RT-qPCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

TUG1: Taurine up-regulated gene 1

WB: western blot

mtDNS: mitokondriális DNS

LD: linkage disequilibrium; kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság

LOPD: late onset PD; késői kezdetű PD

DBS: deep brain stimulation; mélyagyi stimulációs kezelés

LDD: long disease duration; hosszú betegség tartam

HSF1: Hősokk faktor 1

1. Bevezetés

A Parkinson kór (PD; Parkinson's disease) világszerte a második leggyakoribb neurodegeneratív betegség. A betegségre jellemző fő motoros tünetek - tremor (remegés), bradikinézia (mozgás meglassulása) és rigiditás (izommerevség) – megjelenéséhez a *substantia nigra* dopaminerg sejtjeinek pusztulása vezet. Diagnózis a motoros tünetek jelenléte esetén lehetséges, amikor azonban a dopaminerg neuronok többsége már elpusztult. A PD kezelése napjainkban is csak tüneti és intenzív kutatás folyik a háttérben álló pathomechanizmusok pontosabb megismerésére és új terápiás célpontok azonosítására [1]. Tekintettel a kór gyakoriságára, súlyos tüneteire, diagnosztikus teszt és definitív terápia hiányára, kiemelt fontosságú a diagnózis felállítását elősegítő biomarkerek és új terápiás célpontok azonosítása.

A PD egy multifaktoriális megbetegedés, kialakulásában környezeti és életmódbeli tényezők mellett genetikai tényezők is szerepet játszanak [2]. Bár a megbetegedések kisebb részében, 10-15 százalékában mutatható ki családi halmozódás, a gyakoribb sporadikus megbetegedések mintegy 60 százalékában is valószínűsíthetők genetikai okok [3]. Ezek általában nukleotid polimorfizmusokat (SNP; single nucleotide polymorphism) jelentő genetikai variációk, melyek PD-vel való kapcsolatára teljes genomra kiterjedő asszociációs tanulmányok (GWAS; Genome Wide Association Study) eredményei utalnak. Tekintettel arra, hogy az SNP-k különböző populációkban eltérő frekvenciával vannak jelen és hogy a GWA tanulmányok során nagy elemszámú, ezáltal sokszor heterogén mintacsoportokat analizálnak, indokolt e tanulmányok eredményeit validálni kisebb, jól definiált kohortokban. PhD munkám részeként PD-vel összefüggésbe hozott, úgynevezett PARK gén variánsok előfordulását vizsgáltam magyar populációban.

A PARK gének szerteágazó sejtfunkciókat ellátó fehérjéket kódolnak, így nem adnak egyértelmű magyarázatot a betegség molekuláris okára. Éppen ezért nagy az érdeklődés olyan mechanizmusok feltárására, melyek hatásaikban a közös nevezőt jelenthetik és így elvezethetnek a betegség patomechanizmusának pontosabb megismeréséhez és megértéséhez. Tekintettel sejtfunkció és génexpresszió szabályozásban betöltött sokoldalú szerepükre [4], az utóbbi néhány évben a hosszú nem-kódoló RNS-ek (lncRNA, long non-coding RNA) kerültek az érdeklődés előterébe, mint ilyen csomópontok lehetséges kulcsmolekulái.

A NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1; Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1) lncRNA különösen figyelmet kapott PD vonatkozásában, miután az RNS emelkedett szintjét mutatták ki betegek különböző agyrégióiban [5]. PhD munkám ideje alatt egyre több adat jelent meg a szakirodalomban az RNS PD-ben betöltött lehetséges szerepéről

[6][7][8][9][10][11][12]. Ezek az adatok azonban ellentmondásosak és felvetik a kérdést, hogy a NEAT1 szintjének változása ok-okozati összefüggésben áll-e a PD-vel (ha igen, az RNS szintjének emelkedése a betegséggel szemben protektív hatású-e, vagy annak súlyosbodását eredményezi) vagy a betegség patomechanizmusától független jelenség? Munkám egy része ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására irányult.

2. Célkitűzések

I. 4 PARK gén összesen tíz variánsa előfordulásának vizsgálata magyar sporadikus PD betegek és kontroll személyek körében. Célunk annak a vizsgálata volt, hogy:

A: Különbözik-e a vizsgált génvariánsok előfordulásának gyakorisága PD betegek és kontroll személyek csoportjai között.

B: A vizsgált SNP-k között van-e olyan, amely összefügg a PD előfordulásával – ha igen, protektív hatású, vagy rizikófaktor-e a betegségre nézve?

II. Annak meghatározása, hogy perifériás vérben kimutathatók-e eltérések neurodegenerációval összefüggésbe hozott hosszú nem-kódoló RNS-ek szintjében PD betegek és kontroll személyek csoportjai között.

A: Annak vizsgálata, hogy a 41 kiválasztott lncRNA közül mely(ek) az(ok), ami(k)nek megváltozott a szintje PD-ben.

B: Annak vizsgálata, hogy milyen összehasonlításban van különbség az lncRNA(-k) szintjében beteg és kontroll csoportok között, és az eltérés milyen összefüggést mutat a betegség progressziójával.

III. A megváltozott NEAT1 szint modellezése *in vitro* és *in vivo* PD modellekben azzal a céllal, hogy vizsgálni tudjuk a megváltozott lncRNA szint hatását és szerepét a betegségben.

A: Miután PD betegek vérmintáiban emelkedett NEAT1 szintet mutattunk ki, a betegség sejtes és egér modelljeiben vizsgáltuk melyek azok a hatások/állapotok, melyek fokozott NEAT1 expresszióhoz vezetnek.

B: Vizsgálataink célja annak feltárása volt, hogy a NEAT1 expresszió fokozásának van-e hatása a sejt életképességre, apoptózisra és a mitokondriális DNS (mtDNS) kópiaszámra.

Vizsgálatainkkal és kísérleteinkkel arra kerestük a választ, hogy a NEAT1 lncRNA protektív, vagy károsító hatású-e PD-ben.

3. Módszerek

3.1. Biológiai minták

Vizsgálataim során humán, sejt és egérszövet mintákat használtam. PARK gén variánsok előfordulásának és lncRNA szintek vizsgálatára PD betegek és kontroll személyek perifériás vénás vér mintáit használtam. Az állatkísérletekben 10-12 hetes C57Bl/6J hím egereket használtunk, melyeket intraperitonealis (i.p.) MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) és szulforafán (SFN) kezelésben részesítettünk. A betegség *in vitro* modellezésére az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonalat használtuk. A sejteket SFN-nel, MPP⁺-vel (1-metil-4-fenilpiridinium) és parakvátal (PQ) kezeltük.

3.2. DNS, RNS és fehérje izolálás biológiai mintákból

DNS izolálás perifériás vénás vérből standard kisózási technikával [13], eger agyszövetből Trizol reagenssel történt. Sejtkultúrából DNS-t fenol-kloroform extrakcióval nyertünk. RNS-t a vizsgálataink során használt összes minta típusból Trizol reagenssel izoláltunk. Fehérje analízishez teljes sejt lizátumok készültek.

3.3. DNS, RNS és fehérje minták analízise

Az *LRRK2* gén R1628P és G2385R mutációinak vizsgálatához a restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP; *r*estriction *f*ragment *l*ength *p*olymorphism) kimutatási módszert alkalmaztuk. A további PARK génvariánsok (*LRRK2* gén R1398H, N551K, S1647T és rs1491923 variánsai, *MAPT*, *SNCA* és *TCEANC2* mutációk) vizsgálata TaqMan genotipizálás módszerrel történt.

Relatív mtDNS kópiaszám meghatározásához valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR; quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) módszert alkalmaztunk. Referenciagéneknek a nukleárisan kódolt eger HK2 (Hexokinase 2) és humán B2M (Beta-2-microglobulin) géneket használtuk. A mért mitokondriális gén eger minták esetén 16S, humán minták esetén tRNA^{Leu(UUR)} volt.

lncRNA szintek változásának kimutatása humán vérmintákban RT-qPCR reakciókkal történt 41, illetve 12 lncRNA primert tartalmazó PCR plate-ek használatával (Qiagen, Hilden, Germany) (megerősítő vizsgálat I.). A II. megerősítő vizsgálat során kereskedelmi forgalomban beszerezhető NEAT1 és TUG1 (Taurine up-regulated gene 1) primereket alkalmaztunk (Qiagen).

A betegség sejt- és eger modelljéből nyert minták RT-qPCR vizsgálatát egyedileg gyártott primerekkel syber green detektálással végeztük. Referenciagénként 18S-t alkalmaztunk.

PINK1 fehérje meghatározás western blot (WB) módszerrel történt anti-PINK1 nyúl poliklonális antitestek (ThermoFisher Scientific) használatával.

Sejt életképesség vizsgálatokhoz Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) esszét alkalmaztunk.

Apoptózis analízist Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) használatával, fluoreszcencián alapuló sejt válogatás (FACS; fluorescence-activated cell sorting) módszerrel végeztünk.

3.4. Statisztikai analízis

Genotípus és allél frekvenciák analíziséhez Khi-négyzet próbát (χ^2) és Fisher tesztet alkalmaztunk. A genotípusok és allélok PD-vel való asszociációjának vizsgálatára esélyhányadost (OR; Odds ratio) számoltunk 95% -os konfidencia intervallummal (CI).

A humán mintákon végzett lncRNA analízis I. megerősítő vizsgálatának eredményeit az 'RT2 PCR analysis' weboldalon (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) analizáltuk. A további összes PCR reakció eredmény analíziséhez a GraphPad Prism 6.01 statisztikai programot használtuk. Génexpresszió analíziséhez a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztunk. Relatív mtDNS kópiaszám meghatározás Venegas *et al.* szerint, a vizsgált genomi és mitokondriális gének Ct értékeinek összehasonlítása alapján történt [14].

A mintacsoportok eloszlás vizsgálata D'Agostino és Pearson omnibus normalitás tesztel történt, ezt követően kétmintás t próbát vagy Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. Szignifikancia szintnek $p < 0.05$ -öt tekintettük. Többszörös összehasonlítás esetén Bonferroni korrekciót végeztünk.

Több csoport összehasonlítása esetén egy szempontos ANOVA- vagy, non-parametrikus Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. A többszörös összehasonlítás miatti korrekcióra Dunn-, illetve Tukey tesztet használtunk.

4. Eredmények

4.1. PARK génvariánsok gyakoriságának vizsgálata a magyar populációban

Vizsgálataink hat *LRRK2* variáns (R1628P, G2385R, S1647T, R1398H, N551K és rs1491923), két *SNCA* polimorfizmus (rs356186 and rs2583988), a *MAPT* gén (rs1052553) és a PARK10 lókuszt (rs10788972) egy-egy mutációjának előfordulási gyakoriságára irányultak.

4.1.1. *LRRK2* variánsok

A G2385R és az R1628P variánsok egyik vizsgálati csoportunkban sem voltak jelen. Ez az eredmény összhangban áll a kaukázusi populációra vonatkozó szakirodalmi adatokkal [15][16].

Az S1647T variáns minor allélja homozigóta formában (AA) magasabb frekvenciával fordult elő férfi PD betegek körében, mint a férfi kontrollok csoportjában. Ugyanezen csoportokban az allélfrekvenciák gyakoriságának összehasonlítása alapján a variáns A allél szignifikánsan nagyobb arányban volt jelen a vizsgált kontroll személyek körében ($\chi^2 = 6.06$; $p = 0.014$).

Az rs1491923, R1398H és N551K *LRKK2* variánsok esetében sem a genotípus, sem az allélok gyakorisága nem különbözött szignifikánsan vizsgálati csoportjaink között. Az R1398H és N551K variánsok - egy kontroll személy kivételével - minden esetben együttesen fordultak elő. Ez arra utal, hogy a két allél egymástól nem függetlenül öröklődik, közöttük kapcsoltsági kiegyensúlyozatlanság (LD; linkage disequilibrium) van.

4.1.2. *SNCA*, *MAPT* és *TCEANC2* génvariánsok

Az rs356186 *SNCA* SNP genotípus megoszlása szignifikánsan eltért a kontroll- és beteg csoportunkban ($\chi^2 = 7.65$; $p = 0.022$). A különbséget az AA genotípus nagyobb aránya eredményezte a kontroll személyek körében (AA vs. GG + AG. Fisher's test: $p = 0.019$, OR: 0.12, CI (95%): 0.014–0.95). A betegkohort késői betegségkezdetű (LOPD; late onset PD, betegség kezdet >60 év) alcsoportját összehasonlítva a kontroll csoporttal szintén szignifikáns különbség volt megfigyelhető az rs356186 SNP genotípus vonatkozásában ($\chi^2 = 6.14$; $p = 0.046$), mely különbséget a betegek körében nagyobb arányban előforduló AG genotípus eredményezett (AG vs. GG + AA. $\chi^2 = 5.07$; $p = 0.024$).

Az rs2583988 *SNCA* variáns, valamint a vizsgált *MAPT* (rs1052553) és *TCEANC2* (rs10789972) SNP-k genotípus-, illetve allél-frekvenciája nem mutatott szignifikáns különbséget a vizsgálati csoportjaink között.

4.2. LncRNA szintek változásának vizsgálata humán vérmintákban

41 féle neurodegenerációval összefüggésbe hozott lncRNA szintjét vizsgáltuk PD és kontroll mintákban (n=3 mindkét csoportban) RT-qPCR módszerrel. Az analízis során 12 RNS bizonyult ezzel a technikával könnyen kimutathatónak, így ezek szintjét megvizsgáltuk további, nagyobb elemszámú kontroll (n=15) és PD (n=18) mintákban (megerősítő vizsgálat I.). *GAS5* endogén kontrollt használva összehasonlításra, a *NEAT1* lncRNA szignifikánsan nagyobb mennyiségét detektáltuk PD betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva (fold increase=1.93; $p=0.035$). Hasonlóan szignifikánsan emelkedett volt a *TUG1* lncRNA szintje a

betegek körében a kontroll kohorthoz képest (fold increase = 1.71; $p = 0.036$). A NEAT1 és a TUG1 transzkripteken kívül a többi vizsgált RNS szintjében nem volt szignifikáns különbség vizsgálati csoportjaink között.

A két szignifikáns eltérést mutató RNS szintjét megvizsgáltuk további nagyobb elemszámú PD ($n=43$) és kontroll ($n=36$) csoportokban (megerősítő vizsgálat II.). GAS5 endogén kontrollhoz normalizálva adatainkat és a többszörös összehasonlítások miatt Bonferroni korrekciót használva szignifikánsan emelkedett NEAT1 szintet detektáltunk PD betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva (fold increase=1.62; $p=0.0019$), mélyagyi stimulációs kezelésben (DBS; deep brain stimulation) részesülő betegek körében a kontroll csoporthoz képest (fold increase = 1.61; $p = 0.0021$) és a hosszú betegség-tartamú (LDD; long disease duration, betegség-tartam ≥ 10 év) betegek alcsoportjában a kontroll kohorthoz képest (fold change= 1.74, $p=0.0008$).

A II. megerősítő vizsgálat során a TUG1 lncRNA szintje nem mutatott szignifikáns különbséget a vizsgálati csoportjaink között.

4.2.1. Két NEAT1 izoforma mutatható ki perifériás vérben

Célunk volt annak vizsgálata, hogy az adatbázisokban szereplő NEAT1 splice variánsok kimutathatóak-e humán perifériás vérben. Az intronok körüli szekvenciákra tervezett primerekkel a két leginkább elfogadott izoformán kívül (NEAT1S és NEAT1L) más variánst nem detektáltunk.

Vizsgálatunk további célja volt a NEAT1S és a NEAT1L arányának megállapítása. Kimutattuk, hogy az összes NEAT1 (NEAT1S és NEAT1L) lncRNA szint humán perifériás vérben 6-8-szorosan meghaladta NEAT1L szintjét, ami arra utal, hogy a rövidebb izoforma nagyobb mennyiségben van jelen a vizsgált mintákban.

4.3. *In vitro* sejtkultúrák kísérletek NEAT1 funkció vizsgálatára

4.3.1. MPP+ kezelés idő- és dózis arányos NEAT1 expresszió fokozódást eredményez SH-SY5Y neuroblasztóma sejtekben

SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek kezelése MPP+ toxinnal a PD egy széleskörűen alkalmazott sejtes modellje. Célunk volt, hogy e modellt használva meghatározzuk az MPP+ kezelés hatását a NEAT1 expresszióra. Megállapítottuk, hogy SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek 0.5 és 1 mM dózisú MPP+-vel történő kezelése 6, 20 és 24 órán át, a NEAT1 expressziójának idő- és dóziszfüggő fokozódását eredményezi. 24 órás kezelés 0.5 mM MPP+-vel 4.92-szeres növekedést eredményezett. Az 1 mM-os MPP+ kezelés esetében 20 órás kezelés esetén tapasztaltuk a legnagyobb NEAT1 expresszió növekedést (8.03). A 24 órás

kezelés esetén azonban a növekedés csak a 6 órás kezelés esetén tapasztalt értékű volt (3.54). Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy az 1 mM dózisú MPP+ erősen toxikus a sejtekre, és a 24 órás kezelés esetén tapasztalt mérsékelt szintű génkifejeződés a még életben maradt sejtek számának az erős csökkenését tükrözi. Ezt a felvetést támasztják alá sejt életképesség vizsgálataink eredményei (lásd később).

4.3.2. SFN kezelés NEAT1 expresszió fokozódást okoz

Ismert, hogy a HSF1 (Hősokk faktor 1) fokozza NEAT1 expresszióját [17]. A hősokk útvonal aktiválására alkalmas SFN ennek megfelelően HeLa sejtekben NEAT1 expresszió fokozódást idézett elő [17]. Ezen eredmények alapján megvizsgáltuk az SFN NEAT1 expresszióra gyakorolt hatását neuroblasztóma sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy 10 μ M SFN kezelés a kezelés időtartamával arányosan növekvő, tartós NEAT1 expresszió fokozódást eredményezett.

4.3.3. SFN és MPP+ kezelés additívan fokozza a NEAT1 expressziót

Kombinált SFN és MPP+ kezelés additívan növelte NEAT1 expresszióját SH-SY5Y sejtekben. A legnagyobb génexpresszió fokozó hatása az alacsony, 0.5 mM dózisú MPP+-vel kombinált SFN kezelésnek volt (fold up-regulation 0.5 mM: 15.78 vs. 1 mM: 10.52). A különbség háttérében a magasabb dózisú MPP+ kezelés kifejezett sejttöxicitása állhat.

4.3.4. MPP+ és SFN kezelés hatása mtDNS kópiaszámra

SH-SY5Y sejtek MPP+ kezelése idő- és dózisarányos relatív mtDNS kópiaszám csökkenést eredményezett. SFN-nel történő előkezelés részlegesen kompenzálta a 0.5 mM MPP+ kezelés által kiváltott mtDNS szám csökkenést. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a NEAT1 expresszió fokozódás önmagában nem okoz mtDNS kópiaszám csökkenést, illetve ha igen, SFN egyéb hatásai kompenzálni képesek azt.

PQ kezelés SFN nélkül és azzal kombinációban is hasonló hatásúnak bizonyult az SFN mtDNS kópiaszám növelő hatását tekintetve, ugyanakkor a PQ egyik alkalmazott dózisa se okozott olyan prominens mtDNS csökkenést, mint azt az MPP+ kezelés esetén tapasztaltuk.

4.3.5. PINK1 fehérjeszint változása NEAT1 expresszió fokozás hatására

SH-SY5Y sejteket 0.25 mM MPP+-vel kezeltünk 24 órán át, majd teljes fehérje izolátumból WB analízist végeztünk. Az adott koncentrációjú MPP+ kezelés hatására nem tapasztaltunk változást a PINK1 fehérje szintjében.

4.3.6. SFN és MPP+ kezelés hatása sejt életképességre

MPP+ kezelés (1 és 2 mM) prominens (60 százalékos) sejt életképesség csökkenést eredményezett. Alacsony dózisú MPP+ (0.002 és 0.01 mM) kezelés 10 μ M SFN-nel

kombinálva sejt életképesség fokozó hatású volt, az önmagában alkalmazott SFN kezelés esetén tapasztaltnál meghaladó mértékben.

24 órás 0.1 mM, 0.5 mM és 2.5 mM PQ kezelés szintén sejt életképesség csökkenést okozott, amit 10 μ M SFN kezelés részlegesen kompenzált. Hasonlóan az MPP+ kezelés esetén tapasztaltnál, alacsony dózisú PQ (0.05 mM) kezelés erősítette az SFN sejt életképesség fokozó hatását.

4.3.7. SFN kezelés részlegesen kompenzálja az MPP+ indukálta apoptózist

SFN kezelés markánsan csökkentette mind a 0.25, mind a 0.5 mM MPP+ kezelés indukálta apoptózis mértékét: Annexin V-FITC jelölést követő áramlási citometriás analízis apoptotikus sejtek - azon belül is leginkább a korai apoptózis stádiumában levők - arányának a csökkenését mutatta az MPP+ kezelés SFN-nel történő kombinációja esetén.

4.4. *In vivo* egér modell NEAT1 hatásainak vizsgálatára

4.4.1. SFN kezelés a kezelés idejével és dóziséval arányos NEAT1 expresszió fokozást eredményez egér agyszövetben

SFN kezelés (2.5, 5 és 10 mg/testtömeg kg dózisokban; 90 perc, 6, 12 és 24 óra intervallumokban) NEAT1 hosszú izoformájának expresszió fokozódását okozta. A génkifejeződés növekedés az állatok striatumában és agytörzsében volt a legkifejezettebb.

4.4.2. MPTP kezelés dózissal arányos NEAT1 expresszió fokozódást eredményez

Megállapítottuk, hogy MPTP kezeléssel NEAT1L expresszió fokozódás indukálható egerekben. Legkifejezettebb NEAT1L szint növekedés többszöri MPTP oltásban részesülő állatok striatumában volt megfigyelhető (striatum: 6.49 ($p=0.0044$), agytörzs: 3.84 ($p=0.0001$)-szeres növekedés), ami arra utal, hogy az MPTP kezelés dózis függő NEAT1L expresszió fokozódást okoz.

4.4.3. Kombinált SFN és MPTP kezelés additívan hat NEAT1 expresszió fokozásra

Kombinált SFN és MPTP kezelés NEAT1L szint szignifikáns emelkedését eredményezte egér striatumban és agytörzsben. Legkifejezettebb NEAT1L expresszió növekedést kombinált SFN és MPTP kezelés esetén tapasztaltunk (6.92 és 5.25-szörös növekedés a striatumban és az agytörzsben). Megfigyelhető volt továbbá, hogy az SFN oldószereként használt EtOH szintén additívan hat az MPTP-vel a NEAT1L expresszió fokozásában.

Alacsony elemszámú csoportokon végzett előzetes vizsgálataink során nem mutattunk ki szignifikáns mtDNS kópiaszám változást az MPTP-vel kezelt egerek agyszövetében.

5. Diskusszió

Vizsgálataink célkitűzése volt az *LRRK2*, *SNCA*, *MAPT* és *TCEANC2* gének összesen tíz variánsa gyakoriságának felmérése magyar sporadikus PD betegekben és kontroll személyekben.

Eredményünk, mely szerint az rs2583988 *SNCA* minor allélja és a betegség előfordulása között nincs asszociáció, összhangban van német [18] és ír [19] populációkból származó adatokkal. Az rs356186 variánsra vonatkozó eredményeink szintén összhangban állnak irodalmi adatokkal [20]: szignifikáns különbséget mutattunk ki az LOPD és a kontroll csoport genotípus megoszlása között, ami az LOPD páciensek körében tapasztalt AG genotípus magasabb arányának következménye. Szignifikánsan nagyobb arányban fordult elő továbbá a protektív minor allél homozigóta formában (AA) a kontroll csoportban, mint a PD betegek csoportjában.

Az *LRRK2* (*PARK8*) gén G2385R és R1628P variánsaira vonatkozó eredményeink megegyeznek a szakirodalomban szereplő adatokkal [15][16]. Az S1647T variáns minor allélja (A) szignifikánsan nagyobb gyakorisággal fordult elő kontroll férfiak körében, mint férfi PD páciensekben ($\chi^2 = 6.06$; $p = 0.014$).

GWA tanulmányok felvetették egy, az *LRRK2* gén közelében elhelyezkedő SNP PD rizikót növelő hatását. Az rs1491923 variáns egy A/G báziscsere, melynek minor alléljáról kimutatták, hogy szignifikánsan gyakrabban fordul elő PD betegek körében kaukázusi és ázsiai populációkban [22]. Mi nem tapasztaltunk összefüggést a variáns és a betegség előfordulása között, az SNP PD rizikót befolyásoló hatása azonban nem zárható ki.

A két protektív hatású *LRRK2* variáns (R1398H és N551K) együttes előfordulására vonatkozó eredményeink összhangban állnak görög és finn populációkból származó adatokkal, amely esetekben szintén nem mutattak ki összefüggést a variánsok jelenléte és a betegség előfordulása között [23][24].

A *MAPT* gént érintő inverzió okozta haplotípusok vonatkozásában eredményeink megegyeznek brit [25], svéd [26] és tajvani betegek [27] vonatkozó adatokkal, ahol szintén nem írtak le összefüggést a H1 haplotípus és PD között.

A *TCEANC2* gén (*PARK10* lókuszt) rs10789972 variánsáról PD rizikó fokozó hatást írtak le amerikai populációban [28], de nem mutatták ki betegség módosító hatását kínai populációban [29][30]. Utóbbival vannak összhangban a mi eredményeink is: nem észleltünk összefüggést az SNP és a PD előfordulása között.

Tekintettel a funkciók széles körére, melyekben *PARK* gének szerepet játszanak, intenzív kutatás folyik azzal a céllal, hogy ezek között közös nevezőt képező mechanizmusokat és molekulákat azonosítsanak. Az utóbbi években a hosszú nem-kódoló RNS-ek előtérbe

kerültek, mint amik szerepet játszhatnak a PARK gének által ellátott funkciók csomópontjain. Vizsgálataink célja volt könnyen hozzáférhető PD mintákban azonosítani olyan lncRNA szint eltéréseket, melyek egyrészt biomarkerként szolgálhatnak, másrészt közelebb juttathatnak minket a betegség hátterében zajló pathomechanizmusok megismeréséhez.

A vizsgált lncRNA-k közül NEAT1 szignifikánsan emelkedett szintjét mutattuk ki többféle összehasonlításban. Legkifejezettebbek voltak a különbségek PD betegek, DBS kezelésben részesülő PD páciensek és LDD PD páciensek csoportjainak a kontroll csoporthoz történő hasonlítása esetén. A fokozott NEAT1 expresszióra vonatkozó eredményeink összhangban állnak azokban a tanulmányokban közölt adatokkal, melyek az RNS emelkedett szintjét írják le PD páciensek különböző agyrégióiban [5][6].

A NEAT1 lncRNA a ‘paraspeckle’ sejtmagi organelumok fő szerkezeti eleme, ezáltal központi szerepet játszik génexpresszió- és sejt homeosztázis szabályozásában [31]. Egyre több adat támasztja alá az RNS PD-ben betöltött szerepét, de az nem tisztázott, hogy a NEAT1 szintjében észlelt változások ok-okozati összefüggésben állnak-e a betegséggel vagy véletlen az egybeesés. Egyes adatok a NEAT1 káros hatását tételezik fel, aminek mechanizmusa lehet PINK1 fehérje stabilizálás [7], *SNCA* génexpresszió modulálás [8][10], mikroRNS-ek “kihorgonyozása” [10][9][11][12]– ami által reaktív oxigén gyökök képzésében, neuroinflammációban, autofágiában, sejt növekedés és apoptózis modulálásában vehet részt a NEAT1 lncRNA. Ezzel szemben más eredmények, melyek az RNS természetes LRRK2 inhibitor funkciójára utalnak a NEAT1 PD-vel szembeni protektív hatását támogatják [6].

Eredményeink a NEAT1 expresszió változásának hatásairól a PD használt sejtes és egér modelljeiben számos tekintetben összhangban vannak az előbb felsorolt kutatócsoportok eredményeivel és kiegészítik azokat. Másokhoz hasonlóan, MPP+/MPTP kezelés hatására NEAT1 expresszió növekedést mutattunk PD SH-SY5Y neuroblasztóma- és egér modelljében. Újdonság, hogy NEAT1 expresszió fokozódást mutattunk ki az előbb említett modellekben SFN kezelés hatására, amit a vegyület HSF1 aktiváló hatása eredményének tulajdoníthatunk. Ez lehetőséget adott arra, hogy vizsgálni tudjuk a NEAT1 expresszió fokozódásának hatását arra való tekintettel is, hogy mi volt az ezt kiváltó ágens: toxin, illetve neuroprotektív anyag. Sejt életlépesség mérésre vonatkozó vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy SFN kezelés növeli a sejtek életképességét. SFN kezelést kombinálva alacsony dózisú MPP+-vel vagy PQ-val még kifejezettebb sejt életképesség növekedést értünk el. Ennek lehetséges magyarázata a ‘prekondicionálás’ jelensége, amely szerint az alacsony dózisú neurotoxikus kezelés okozta stressz endogén neuroprotektív folyamatokat indít el [32].

A mtDNS kópiaszám változás tekintetében is különbséget találtunk a PD hatásainak modellezésére használt toxinok között. Míg az MPP+ kezelés markáns mtDNS kópiaszám csökkenést eredményezett, a PQ kezelés esetén a legnagyobb (1.5 mM) alkalmazott dózis esetén sem észleltünk ilyen változást. 0.5 mM MPP+ kezelés kiváltotta mtDNS csökkenés részlegesen kompenzálható volt 6 órás 10 uM SFN előkezeléssel. Míg egyik alkalmazott PQ dózis esetében sem volt észlelhető mtDNS csökkenés, alacsony dózisu (0.1 és 0.5 mM) toxinkezelés mtDNS kópiaszám növekedést eredményezett. Ez arra utal, hogy kellően alacsony, szubtoxikus dózisu PQ kezelésnek prekondicionáló hatása lehet, ami mitokondriális turnover- és ATP termelés-fokozódást eredményez. A PQ és az MPP+ kezelés mtDNS kópiaszámra gyakorolt hatása különbségének hátterében a két toxin eltérő hatásmechanizmusa állhat.

Érdekes módon markáns csökkenés volt észlelhető a 0.25 mM és 0.5 mM MPP+ kezelés által kiváltott apoptotikus sejtek arányában SFN kezelés hatására. Ez az eredmény ellentmondásosnak tűnhet a sejtviabilitási vizsgálatok során tapasztaltakkal (míserint az SFN-nek nincs védő hatása az MPP+ kezelés által okozott sejt életképesség csökkenéssel szemben), de az eltérő vizsgálati metodikák magyarázatul szolgálhatnak: a sejt életképesség vizsgálatok során használt CCK8 esszé a sejtek dehidrogenáz enzimeinek aktivitásán alapszik, ezért a metabolikus változások jelentősen befolyásolhatják a sejt életképesség vizsgálatok során nyert eredményeket [33][34].

Eredményeink az eltérő toxinkezelések eltérő hatásairól (mtDNS kópiaszám és sejtviabilitás) felhívják a figyelmet a betegség toxin modelljeinek hiányosságaira. Az összetett patomechanizmus pontos megismeréséhez elengedhetetlen volna olyan PD modellek létrehozása, amelyek még pontosabban reprodukálják a betegség hátterében álló kórfolyamatokat.

Összegezve, eredményeink arra utalnak, hogy a NEAT1 expresszió fokozódása önmagában nincs káros hatással az apoptózisra, a sejt életképességre és a mtDNS kópiaszám változásra. Összességében eredményeink tehát nem támasztják alá NEAT1 primer neurodegeneratív hatását.

6. Új eredmények

I. 4 PARK gén 10 variánsának előfordulását vizsgáltuk magyar sporadikus PD betegek és kontroll személyek körében. Kimutattuk, hogy:

1. Az *LRRK2* gén G2385R and R1628P rizikófaktor variánsai nincsenek jelen sem a vizsgált beteg-, sem a kontroll csoportban.

2. Az rs1491923 *LRRK2* SNP genotípus megoszlása és allél frekvenciája hasonló a két vizsgálati csoportban.
3. Az S1647T variáns minor (A) allélja szignifikánsan nagyobb gyakorisággal fordult elő férfi kontroll személyek körében férfi PD betegek csoportjához képest ($\chi^2 = 6.06$; $p = 0.014$).
4. A protektív hatású *LRRK2* variánsok (R1398H és N551K) egymással kapcsolatosan és a két vizsgálati csoportban hasonló előfordulási gyakorisággal voltak jelen.
5. A protektív hatású rs356186 *SNCA* variáns vad típusú allélja homozigóta formában (AA) nagyobb arányban fordult elő a kontroll csoportban, mint a betegek kohortjában. Hasonlóan szignifikáns különbség volt az LOPD és a kontroll csoport genotípus megoszlása között, amit az AG genotípus nagyobb aránya okozott a betegek körében.
6. Az rs2583988 *SNCA*, az rs1052553 *MAPT* és az rs10789972 *TCEANC2* génvariánsok genotípus és allél megoszlása nem különbözött szignifikánsan vizsgálati csoportjaink között.

Tudomásunk szerint ezekre az SNP-kre vonatkozó eredményeink az elsők a közép-európai populációra vonatkozóan és adataink összhangban állnak az irodalomban szereplő más populációkra vonatkozó adatokkal.

II. PD páciensek és kontroll személyek perifériás vérmintáiban történt lncRNA szint meghatározással kimutattuk, hogy:

1. A NEAT1 szintje emelkedett PD betegek vérében. Legkifejezettebb volt az emelkedés az összes PD beteg vs. kontroll csoport (fold change = 1.62; $p = 0.0019$), a DBS kezelt PD páciensek vs. kontroll csoport (fold change = 1.61; $p = 0.0021$) és az LDD betegek csoportja vs. kontroll csoport (fold change = 1.74; $p = 0.0008$) összehasonlításban.
2. Eltekintve a két fő izoformától (rövid és hosszú) más NEAT1 izoformát nem mutattunk ki humán perifériás vérben. A két fő izoforma közül a NEAT1S jelentősen nagyobb mennyiségben van jelen.

Közleményünk az első, melyben emelkedett NEAT1 lncRNA szintet közölnek humán perifériás vérben. *Post mortem* agyszövetből és a betegség modelljein végzett vizsgálatok eredményei összhangban vannak az általunk kimutatott eltéréssel.

III. PD *in vitro* neuroblasztóma sejtmodelljét használva kimutattuk, hogy:

1. MPP+ kezelés NEAT1 expresszió fokozódást okoz.

2. SFN kezelés dózis- és időfüggő NEAT1 up-regulációt eredményez SH-SY5Y sejtekben.
3. Neuroblasztóma sejtek egyidejű kezelése MPP+ és SFN-nel kifejezettebb NEAT1 expresszió fokozódást eredményez, mint külön MPP+-vel és SFN-nel történő kezelés.
4. SH-SY5Y sejtekben a mtDNS kópiaszámot az MPP+ kezelés csökkenti, ezzel szemben az SFN kezelés növeli. Az MPP+ kezelést megelőző SFN előkezelés részlegesen kompenzálni képes a toxin által okozott mtDNS kópiaszám csökkenést.
5. PQ és MPP+ kezelés is sejt életképesség csökkenést okoz. Ezzel ellentétben, SFN kezelés növeli a sejt életképességet.
6. SFN kezelés részben kompenzálni képes a PQ okozta sejt életképesség csökkenést, szemben az MPP+ kezeléssel, ahol az SFN ilyen jellegű hatását nem tapasztaltuk.
7. SFN kezelés markánsan csökkentette a 0.25 és 0.5 mM MPP+ kezelés kiváltotta apoptózist.

Eredményeink arra utalnak, hogy a PD modellezésére alkalmazott toxinok (MPP+ vs. PQ) különböző mechanizmusok révén eredményeznek sejt életképesség csökkenést. Az emelkedett NEAT1 szint nem toxikus a sejtekre és a NEAT1 expresszió fokozódás nem közvetlen oka a mtDNS kópiaszám csökkenésnek.

IV. PD *in vivo* egér modelljét használva kimutattuk, hogy:

1. MPTP kezelés NEAT1L expresszió fokozódást okoz egér agyszövetben. Az expresszió változás dóziszfüggő és a legkifejezettebb a striatumban.
2. SFN kezeléssel dóziszfüggő és agyrégió specifikus NEAT1L expresszió fokozódás érhető el.
3. SFN és MPTP kezelés additív hatású NEAT1 expresszió fokozást tekintve mind a striatumban, mind az agytörzsben.

Eredményeink azt mutatják, hogy SFN kezeléssel NEAT1 up-reguláció érhető el *in vivo*, ez lehetőséget ad további, NEAT1 funkciójának megismerését célzó kísérletek végzésére *in vivo* PD modellben.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőimnek, Prof. Dr. Klivényi Péternek és Prof. Dr. Vécsei Lászlónak a lehetőséget, hogy tudományos munkát végezhettem a laboratóriumban és támogatásukat, iránymutatásukat és szakmai vezetésüket munkám során.

Köszönetet mondok továbbá Dr. Maszlag-Török Ritának és Vágvölgyi-Sümegei Evelinnek tanításukért, segítségükért a kísérleteim során és a laboratóriumban eltöltött idő alatti barátságos légkörért.

Köszönet illeti az SZTE TTIK és BRC munkatársait, akik segítettek a sejtes modell létrehozásában és a sejteken végzett kísérletekben. Külön köszönettel tartozom Ökrös Gyuláné Katalinnak felbecsülhetetlen segítségéért ezen kísérletek során.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok családomnak a türelmükért és biztatásukért mind tanulmányaim, mind munkám során. Folyamatos segítségük és támogatásuk nélkül ez a munka nem lett volna lehetséges.

8. Referenciák:

- [1] Savitt D, Jankovic J (2019) Targeting α -synuclein in Parkinson's disease: Progress towards the development of disease-modifying therapeutics. *Drugs* **79**, 797–810.
- [2] Johnson ME, Stecher B, Labrie V, Brundin L, Brundin P (2019) Triggers, facilitators, and aggravators: Redefining Parkinson's disease pathogenesis. *Trends Neurosci* **42**, 4–13.
- [3] Hamza TH, Payami H (2010) The heritability of risk and age at onset of Parkinson's disease after accounting for known genetic risk factors. *J Hum Genet* **55**, 241–243.
- [4] Lv Q, Wang Z, Zhong Z, Huang W (2020) Role of long noncoding RNAs in Parkinson's disease: putative biomarkers and therapeutic targets. *Parkinsons Dis* **2020**, 1–12.
- [5] Kraus TFJ, Haider M, Spanner J, Steinmaurer M, Dietinger V, Kretzschmar HA (2017) Altered Long Noncoding RNA Expression Precedes the Course of Parkinson's Disease—a Preliminary Report. *Mol Neurobiol* **54**, 2869–2877.
- [6] Simchovitz A, Hanan M, Niederhoffer N, Madrer N, Yayon N, Bennett ER, Greenberg DS, Kadener S, Soreq H (2019) NEAT1 is overexpressed in Parkinson's disease substantia nigra and confers drug-inducible neuroprotection from oxidative stress. *FASEB J* **33**, 11223–11234.
- [7] Yan W, Chen ZY, Chen JQ, Chen HM (2018) LncRNA NEAT1 promotes autophagy in MPTP-induced Parkinson's disease through stabilizing PINK1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* **496**, 1019–1024.
- [8] Liu Y, Lu Z (2018) Long non-coding RNA NEAT1 mediates the toxic of Parkinson's disease induced by MPTP/MPP+ via regulation of gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **45**, 841–848.
- [9] Liu R, Li F, Zhao W (2020) Long noncoding RNA NEAT1 knockdown inhibits MPP+-induced apoptosis, inflammation and cytotoxicity in SK-N-SH cells by regulating miR-212-5p/RAB3IP axis. *Neurosci Lett* **731**, 135060.
- [10] Sun Q, Zhang Y, Wang S, Yang F, Cai H, Xing Y, Chen Z, Chen J (2020) NEAT1 decreasing suppresses Parkinson's disease progression via acting as miR-1301-3p sponge. *J Mol Neurosci* 1–10.
- [11] Xie SP, Zhou F, Li J, Duan S jie (2019) NEAT1 regulates MPP+-induced neuronal injury by targeting miR-124 in neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* **708**, 134340.
- [12] Geng L, Zhao J, Liu W, Chen Y (2019) Knockdown of NEAT1 ameliorated MPP+ -induced neuronal damage by sponging miR-221 in SH-SY5Y cells. *RSC Adv* **9**, 25257–25265.
- [13] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids Res* **16**, 1215.
- [14] Venegas V, Wang J, Dimmock D, Wong LJ (2011) Real-time quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content. *Curr Protoc Hum Genet* 1–12.
- [15] Toft M, Haugarvoll K, OA R, MJ F, JO A (2007) LRRK2 and Parkinson's disease in Norway. *Acta Neurol Scand* **115**, 72–75.
- [16] Kumari U, Tan EK (2009) LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from

- patients. *FEBS J* **276**, 6455–6463.
- [17] Mohammad Lellahi S, Rosenlund IA, Hedberg A, Kiær LT, Mikkola I, Knutsen E, Perander M (2018) The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response. *J Biol Chem* **293**, 18965–18976.
- [18] Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T, Berg D, Wüllner U, Meitinger T, Gasser T (2005) Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* **57**, 535–541.
- [19] Ross OA, Gosal D, Stone JT, Lincoln SJ, Heckman MG, Irvine BG, Johnston JA, Gibson JM, Farrer MJ, Lynch T (2007) Familial genes in sporadic disease: common variants of α -synuclein gene associate with Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev* **128**, 378–382.
- [20] Zhang Y, Shu L, Sun Q, Pan H, Guo J, Tang B (2018) A comprehensive analysis of the association between SNCA polymorphisms and the risk of Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci* **11**, 1–12.
- [21] Kumari U, Tan EK (2009) LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients. *FEBS* **276**, 6455–6463.
- [22] Simon-sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs R, Berg D, Paisan-ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Kruger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Cookson M, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, Brug M van der, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* **41**, 1308–1312.
- [23] Tan E, Peng R, Teo Y, Tan LC, Angeles D, Ho P, Chen M-L, Lin C-H, Mao X-Y, Chang X-L, Prakash KM, Liu J, Au W, Le W-D, Jankovic J, Burgunder J-M, Zhao Y, Wu R-M (2010) Multiple LRRK2 variants modulate risk of Parkinson Disease: a Chinese multicenter study human. *Hum Mutat* **31**, 561–568.
- [24] Paisán-Ruiz C, Evans EW, Jain S, Xiromerisiou G, Gibbs JR, Eerola J, Gourbali V, Hellström O, Duckworth J, Papadimitriou A, Tienari PJ, Hadjigeorgiou GM, B SA (2006) Testing association between LRRK2 and Parkinson's disease and investigating linkage disequilibrium. *J Med Genet* **43**, 1–6.
- [25] de Silva R, Hardy J, Crook J, Khan N, Graham EA, Morris CM, Wood NW, Lees AJ (2002) The tau locus is not significantly associated with pathologically confirmed sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **330**, 201–203.
- [26] Johansson A, Zetterberg H, Hakansson A, Nissbrandt H, Blennow K (2005) TAU haplotype and the Saitohin Q7R gene polymorphism do not influence CSF Tau in Alzheimer's disease and are not associated with frontotemporal dementia or Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* **2**, 28–35.
- [27] Fung HC, Xiromerisiou G, Gibbs JR, Wu Y, Eerola J, Gourbali V, Hellström O, Chen CM, Duckworth J, Papadimitriou A, Tienari PJ, Hadjigeorgiou GM, Hardy J, Singleton AB (2006) Association of Tau haplotype-tagging polymorphisms with Parkinson's disease in diverse ethnic Parkinson's disease cohorts. *Neurodegener Dis* **3**, 327–333.
- [28] Beecham GW, Dickson DW, Scott WK, Martin ER, Schellenberg G, Nuytemans K, Larson EB, Buxbaum JD, Trojanowski JQ, Deerlin VM Van, Hurtig HI, Mash DC, Beach TG, Troncoso JC, Pletnikova O, Frosch MP, Foroud TM, Ghetti B, Honig LS, Marder K, Vonsattel JP, Goldman SM, Vinters H V, Ross OA, Wszolek ZK, Wang L, Dykxhoorn DM, Pericak-Vance MA, Montine TJ, Leverenz JB, Dawson TM, Vance JM (2015) PARK10 is a major locus for sporadic neuropathologically confirmed Parkinson disease. *Am Acad Neurol* **84**, 972–980.
- [29] Guo Y, Tan T, Deng X, Song Z, Yang Z, Yang Y, Deng H (2015) TCEANC2 rs10788972 and rs12046178 variants in the PARK10 region in Chinese Han patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **36**, 3335.e1-3335.e2.
- [30] Tian S, Yang X, Zhao Q, Zheng J, Huang H, Chen Y, An R, Xu Y (2017) No association of PARK10 polymorphism with Parkinson's disease in Han Chinese population. *Park Relat Disord* **42**, 106–106.

- [31] Bond CS, Fox AH (2009) Paraspeckles : nuclear bodies built on long noncoding RNA. *J Cell Biol* **186**, 637–644.
- [32] Stetler AR, Leak KR, Gan Y, Li P, Hu X, Jing Z, Chen J, Zigmond MJ, Gao Y (2014) Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: paradigms and clinical significance. *Prog Neurobiol* **114**, 58–83.
- [33] Aslantürk ÖS (2018) In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In *Genotoxicity - A predictable risk to our actual world*, Larramendy ML, Soloneski S, eds., pp. 1–18.
- [34] Strober W (2015) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* **111**, A3.B.1.-A3.B.3.