

Munkánk célja az idegrendszeri pajzsmirigyhormon szint szabályozásának celluláris és molekuláris vizsgálata és e folyamatok agyműködésre gyakorolt hatásainak mélyebb megértése volt.

Vizsgálataink egyik fő súlypontja a neuro-gliális pajzsmirigyhormon jelátvitel működésének megértése volt. Adataink közvetlen bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a gliális kettes-típusú dehidrogenáz enzim (D2) által előállított T3 parakrin módon befolyásolja a neuronok transzkripciós aktivitását, amire a neuronális kompartmentben expresszálandó hármastípusú dehidrogenáz enzim (D3) által katalizált T3 lebontás is hatással van. Jellemeztük primer asztrocitákban egyes pajzsmirigyhormon metabolizmusban és transzportban szerepet játszó kulcsgének expresszióját, továbbá megállapítottuk, hogy a H4 humán glióma sejtvonal is rendelkezik e gének megfelelő expressziós mintázatával. Így vizsgálatainkba ez utóbbi modellrendszert is bevontuk. Eredményeink rámutattak, hogy az agyi pajzsmirigyhormon háztartás eltérő kóros állapotokban különböző adaptációs stratégiákat követ. A „sonic hedgehog” nevű morfogén és agyi oxigén hiány hatására csökken a T3 termelés, ill. fokozódik a lebontás. Az ischaemiás patkány agyban észlelt jelentős agykérgi és hippocampális D3 indukció miatt felgyorsul a T3 lebontása. Az így kialakuló lokális hypothyroid környezet a szöveti oxigén felhasználás csökkentése által támogathatja az ischaemiás/hipoxiás szövetek túlélését. A „sonic hedgehog” kiváltotta D2 aktivitás csökkenés pedig a felnőtt agyban végbemenő neurogenesis szabályozásában játszhat szerepet. A munkánk eredményeképpen létrejött modell számos, a pajzsmirigyhormonok agyi szabályozásának mechanizmusát érintő eddigi adatot tudott egy funkcionális rendszer keretében egyesíteni.

(Beatriz C G Freitas, Balázs Gereben*, Melany Castillo, Imre Kalló, Anikó Zeöld, Péter Egri, Zsolt Liposits, Ann Marie Zavacki, Rui M. B. Maciel, Sungro Jo, Praful Singru, Edith Sanchez, Ronald M. Lechan and Antonio C. Bianco. Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells J Clin Invest 2010 120(6):2206–2217 IF: 14,152, *megosztott első szerzők)*

A fenti neuro-gliális mechanizmus vizsgálatát kiterjesztettük a hipotalamusz pajzsmirigyhormon jelátvitelének tanulmányozására. Megfigyeltük, hogy az eminentia mediana külső zónájában futó parvocelluláris hipofiziotrop axonok varikozitásai D3 enzimet tartalmaznak, így potenciálisan T3-at bonthatnak le. Ez a hipotalamikusan T3 szabályozás egy új útvonalát valószínűsítette. Megállapítottuk, hogy a varikozítások D3 tartalma alapján három csoportra különíthető el: a magas (~75%; GnRH, CRH, GHRH), alacsony (~25%, TRH) D3 tartalmú és D3 mentes (szomatostatint) tartalmú rostok. Azonban az MCT8 T3 transzporter az összes varikozításban megtalálható volt. A D3 enzim „dense core” granulumban lokalizálódott a varikozításokban. N-STORM szuperrezolúciós mikroszkópiával vizsgáltuk az enzim topológiáját és megállapítottuk, hogy az enzim aktív centrumát tartalmazó C-terminális domén a citoplazmában helyezkedik el, tehát az enzimet a vezikulum membránjában az N-terminális transzmembrán domén rögzíti. Mivel ismert, hogy a D3 monomerek dimerizációja az enzim katalitikus aktivitásának előfeltétele, GT1-7 sejtekben bimolekuláris fluoreszcencia komplementációval megmutattuk, hogy a D3 dimerek megtalálhatóak e sejtek axonszerű nyúlványaiban. Emellett patkányok eminentia mediana mikrodisszekátumából D3 aktivitást tudunk mérni, amit a hipertiroid állapot homeosztatikusan megnövelt. Adataink a hipotalamikusan T3 szabályozás új útját bizonyítják melynek kulcstényezője az axonális T3 felvétel és a rost-specifikus D3-mediált T3 lebontás. Ez a folyamat választ ad a terület azon régi kérdésére, mely arra kereste a választ, hogy a fokális, tanicitális D2-mediált T3 termelés, ill. a keringésből a vér-agy gáton kívüli eminentia

mediana-ba eljutó T3 keveredéséből létrejövő hipotalamikus T3 szint i) hogyan éri el az eltérő területeken elhelyezkedő hipotalamikus neuroszekretoros neuronrendszereket, továbbá ii) hogyan valósulhat meg a neuronok T3 szintjének rendszer-specifikus szabályozása. Az általunk leírt mechanizmus jelentős hatással lehet az anyagcsere, szaporodás, növekedés és stressz hipotalamikus szabályozására.

(Kalló I, Mohácsik P, Vida B, Zeöld A, Bardóczi Z, Zavacki AM, Farkas E, Kádár A, Hrabovszky E, Arrojo E Drigo R, Dong L, Barna L, Palkovits M, Borsay BA, Herczeg L, Lechan RM, Bianco AC, Liposits Z, Fekete C, Gereben B. A novel pathway regulates thyroid hormone availability in rat and human hypothalamic neurosecretory neurons. PLoS One. 2012;7(6):e37860. doi: 10.1371/journal.pone.0037860. Epub 2012 Jun 18. IF: 3,73).

Tanulmányoztuk a D3-mediált T3 lebomlás szabályozását hippocampális neuronokban hipoxia során, mely kondíció a hippocampális neurogenesis ismert induktora. *In vivo* és *in vitro* adataink bizonyítják, hogy a D3 hipoxia hatására a sejtmagba transzlokálódik, és ott T3 bontást végez. A D3 magi transzlokációjában szerepet játszik a Hsp40 „chaperon”. Ez volt az első ismert példa arra, hogy a sejtmagban végbemehet pajzsmirigyhormon metabolizmus. Megmutattuk, hogy a D3 magi transzlokációja következtében kialakuló intracelluláris hipotiroidizmus hatására megváltozik e neuronok génexpresszója, glikolitikus rátája és oxigén felvétele. Feltételezzük, hogy a kialakuló lokális hipotiroidizmusa elősegíti a régió proliferációs aktivitásának növekedését.

(Jo S, Kalló I, Bardóczi Z, Arrojo E Drigo R, Zeöld A, Liposits Z, Oliva A, Lemmon VP, Bixby JL, Gereben B, Bianco AC*. Neuronal hypoxia induces hsp40-mediated nuclear import of type 3 deiodinase as an adaptive mechanism to reduce cellular metabolism. J Neurosci. 2012 Jun 20;32(25):8491-500. IF: 6,908; *megosztott utolsó szerzők)*

Az idegrendszeri pajzsmirigyhormon jelátvitel *in vivo* befolyásolásának céljából transzgenikus egérvonalat (floxolt D2) állítottunk elő, ami lehetővé teszi az idegrendszeri T3 képződésért felelős D2 enzim szövet-specifikus kikapcsolását. A D2 hipotalamikus, ill. hipofizeális kiütése a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengely szabályozásának új mechanizmusait tárta fel. Bizonyítottuk, hogy a TRH neuronok „feedback” szabályozásához szükséges hipotalamikus T3 termelésért a tanicták felelősek, míg a hipofizeális D2 kiütése következtében előálló feedback csökkenésére, ill. az annak következtében előálló TSH indukcióra a hipotalamusz kompenzációs válaszként a hipofiziotrop TRH expresszió csökkenésével és a TSH bioaktivitás csökkentéssel válaszol, ami segíti a szervezet élettani pajzsmirigyhormon státuszának fenntartását.

Fonseca, TL; Medina, MC; Campos, MPO; Wittmann, G; Werneck-de-Castro, JP; Arrojo e Drigo, Rafael; Mora-Garzon, ME; Ueta, CB; Caicedo, A; Fekete, Cs; Gereben, B; Lechan, RM, Bianco, AC. Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression The Journal of Clinical Investigation 2013 123(4):1492-500. IF: 12,812)

Felkérésre review cikkben foglaltuk össze a glia-specifikus pajzsmirigy-hatás és gliális T3 szabályozással kapcsolatos nézeteinket.

(Petra Mohácsik, Anikó Zeöld, Antonio C. Bianco and Balázs Gereben. Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target (2011) Journal of Thyroid Research, Special issue: Thyroid Hormones and Their Receptors: From Development to Disease Volume 2011, Article ID 215718, 16 pages doi:10.4061/2011/215718)

Az agyi T3 képződéséért felelős D2 enzim ubikvitinálódik és mai tudásunk szerint ez a folyamat jelenti az idegrendszer T3-függő folyamatainak leggyorsabb szabályozó mechanizmusát. Ezért munkánk másik fő súlypontja az agyi T3 képződés ubikvitinációs szabályozását lehetővé tevő molekuláris folyamatok jobb megértése volt. A natívan nem ubikvitinálódó egyes típusú deiodáz (D1) mutagenézisével olyan rekombináns kimérákat hoztunk létre, melyekbe beillesztettük a D2 egyes strukturális elemeit (K223 és K230 ubikvitinálható lizinek, destabilizációs hurokmodul), ill. az endoplazmatikus retikulumba, a D2 enzim natív lokalizációjába irányító Sec62 fúziós domént. E módszerrel meghatároztuk a D2 ubikvitináció szükséges és elégséges elemeit. Majd a D2 kimérák ubikvitin ligáz kötésének tesztelésére fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) módszert állítottunk be, ami alkalmas az ubikvitinációs fehérje-komplexben létrejövő fehérje-fehérje interakciók vizsgálatára és meghatároztuk a D2 mindkét ismert ubikvitin (E3) ligázának, a WSB1-nek és a Teb4-nek a létrehozott D2 kimérákhoz történő kötődését. Klónoztuk a Teb4 promóterét és kimutattuk, hogy az nem érzékeny a sonic hedgehog effektorára, a Gli2-re, így megállapítottuk, hogy a tanicitákban expresszáldó Teb4-mediált D2 lebomlás a WSB1-szabályozta útvonaltól eltérően nem szabályozódik sonic hedgehog jelátvitel által. Mivel a hipotalamusz tanicitáiban egyedülálló módon koexpresszáldó a D2 a Teb4-el és WSB1-el, ezért létrehoztunk egy összetett 3-FRET rendszert, aminek a segítségével egyszerre három fehérje közötti kölcsönhatást lehet vizsgálni élő sejtben. Ennek segítségével megállapítottuk, hogy a két E3 ligáz közel hasonló mértékben vesz részt a D2 ubikvitinációjában. Adataink betekintést nyújtanak a D2-mediált agyi T3 képződés molekuláris szabályozásába.

Egri, P, Gereben, B. Identification of minimal requirements for ubiquitination-mediated regulation of thyroid hormone activation (benyújtás előtt)

Tanulmányoztuk továbbá a D2 endoplazmatikus membránból történő extrakciójának mechanizmusát, ami az enzim proteaszómába kerülése szempontjából kulcsfontosságú. Megállapítottuk, hogy a p97/Atx3 komplex fontos szerepet játszik ebben a folyamatban és meghatároztuk a háttérben álló fehérje interakciók változásait.

(Arrojo E Drigo R, Egri P*, Jo S, Gereben B, Bianco AC. The Type II Deiodinase Is Retrotranslocated to the Cytoplasm and Proteasomes via p97/Atx3 Complex. Mol Endocrinol. 2013 Dec;27(12):2105-15. doi: 10.1210/me.2013-1281. IF:4,746 *megosztott első szerzők)*

Emellett leírtuk a D2-mediált T3 előállítás egy új típusú szabályozó mechanizmusát, melynek során a D2 fehérje transzlációja eIF2a-mediált úton csökken endoplazmatikus retikulum (ER) stresszben, ám-e folyamat a D2 fehérje lebomlását nem érinti. Ennek következménye az intracelluláris T3 szintézis kóros állapotokban bekövetkező csökkenése lehet.

(Rafael Arrojo e Drigo, Tatiana L. Fonseca, Melany Castillo, Matthias Salathe, Gordana Simovic, Petra Mohácsik, Balazs Gereben and Antonio C. Bianco. Endoplasmic Reticulum Stress Decreases Intracellular Thyroid Hormone Activation via an eIF2a-Mediated Decrease in Type 2 Deiodinase Synthesis. Molecular Endocrinology December 1, 2011 vol. 25 no. 12 2065-207 IF: 4,544)

Ubikvitinációs folyamatok tanulmányozása során szerzett jártasságunk eredményeképpen felkérésre vettünk részt a kisspeptin receptorának (KISS1R) lebomlási vizsgálatában. Ennek során kimutattuk, hogy az emberi Arg386Pro, e nagy klinikai jelentőségű aktiváló mutáció túlműködése a mutáns csökkent proteolízise miatt alakul ki. A munka az Endocrinology címlapjára került.

(Suzy D. C. Bianco, Lauren Vandepas, Mayrin Correa-Medina, Balázs Gereben, Abir Mukherjee, Wendy Kuohung, Rona Carroll, Milena G. Teles, Ana Claudia Latronico and Ursula B. Kaiser. Kiss1R intracellular trafficking and degradation: Effect of the Arg386Pro disease-causing mutation. Endocrinology 152(4):1616-26 IF: 4,459)

Az American Thyroid Association felkérésére részt vettem egy olyan bizottság munkájában, mely a pajzsmirigy endokrinológiai alap kutatások átfogó metodikai áttekintését, továbbá ajánlások megfogalmazását kapta feladatul. Közel egy éves munkánk eredménye a Társaság hivatalos véleményeként, „Guide”-ként jelent meg, egy szerkesztőségi ajánlás kíséretében.

(Bianco AC, Anderson G, Forrest D, Galton VA Dr, Gereben B, Kim BW, Kopp PA, Liao XH, Obregon MJ, Peeters R, Refetoff S, Sharlin D, Simonides WS, Weiss RE, Williams G. American Thyroid Association Guide to Investigating Thyroid Hormone Economy and Action in Rodent and Cell Models. 2014 Jan;24(1):88-168. doi: 10.1089/thy.2013.0109. Epub 2013 Dec 12. IF:3,544)

A pályázati munka eredményeiből 9 közleményt jelent meg (össz. impakt faktor: 54,89 és egy további kézirat áll beküldés előtt. Eredményeinkről rendszeresen beszámoltunk hazai és nemzetközi konferenciákon (pl. Endocrine Society, American Thyroid Association, Magyar Idegtudományi Társaság, Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság), továbbá hazai és külföldi meghívásoknak eleget téve (pl. 10th International Workshop on Resistance to Thyroid Hormone & Thyroid Hormone Action 2012, Dept. of Biochem. and Mol Cell Biol., University of Vienna 2012, Debreceni Endokrin Napok 2013, továbbá meghívott előadó leszek a European Congress of Endocrinology-n (Wroclaw, 2014 május) és az Annual Meeting of the European Thyroid Association (Santiago de Compostella 2014 szeptember) konferenciáján.

Eredményeinkről az MTA honlapja is beszámolt: http://mta.hu/tudomany_hirei/magyar-eredmenyek-az-idegrendszeri-hormonhaztartas-uj-mechanizmusainak-kutatasaban-100031/