

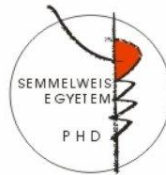
A pajzsmirigyhormon aktiváció molekuláris szabályozása

Doktori tézisek

Egri Péter

Semmelweis Egyetem

Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Gereben Balázs, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Endre, D.Sc.
Dr. Dobolyi Árpád, D.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Miklós, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kovács Krisztina, D.Sc.
Dr. Tamás Andrea, Ph.D.

Budapest

2016

1. BEVEZETÉS

A pajzsmirigyhormonok (PH) az anyagcsere, továbbá az idegrendszer fejlődésének és működésének kiemelten fontos szabályozói. A szinaptogenezis, a progenitor sejtek migrációja és fejlődési programja egyaránt PH-függő folyamatok. A hippocampus és a kisagy fejlődése szorosan PHok által kontrolált, amelyet jól demonstrál az elégtelen PH szint következtében kialakuló motorikus, tanulási és kognitív funkcióvesztés. A PHok jelentős szereppel bírnak az érzékszervek fejlődésében is. Összességében a PH szignalizáció a központi idegrendszer fejlődésében elengedhetetlen, ezt jól tükrözi, hogy a perinatális hypothyroidismus következtében kialakuló visszafordíthatatlan fejlődési rendellenességek kivédése gyors PH pótlást követel. A PH hatás kiemelt jelentőségű a periféria esetében is; a zsír és máj anyagcsere, szívműködés, izomtónus és a rágcsálók, valamint újszülöttek hőtermelésének központja, a barna zsírszövet (BAT) egyaránt a PH hatások jól ismert célpontjai.

A PHok szintézisét és felszabadulását a hypothalamus-hypophysis-pajzsmirigy (HHP) tengely szabályozza. A tengely szerveződésének szintjeit a thyrotropin-releasing hormone-t (TRH) termelő paraventricularis mag neuronjai a hypothalamusban, a thyroid-stimulating hormone-t (TSH, thyrotropin) termelő sejtek az adenohypophysisben és maga a pajzsmirigy képezi. A TSH a PH szintézis szinte minden elemét illetve a PHok felszabadulását stimulálja. Azonban a PH hatás tér- és időbeni finomhangolásában a HHP tengelynek nyilvánvaló korlátai vannak, különösen a központi idegrendszer esetében. A pajzsmirigyből döntő mértékben egy stabil prohormon, a tiroxin (T_4), szabadul fel, amely nem képes a pajzsmirigyhormon magreceptorokat aktiválni, mivel azok a T_3 -ra szelektívek. Azonban a vér-agy és a vér-CSF gát áteresztőképessége T_3 -ra nézve rendkívül alacsony, amelynek alapja az e területeken expresszáladó pajzsmirigyhormon transzporterek eltérő affinitása az egyes PH derivátumokra, vagyis az agyszövetbe elsősorban a transzkripcionálisan inaktív T_4 jut be. Ebből következően az agyi PH hatás a tengely által szabályozott PH szekréció, PH transzport és a helyi, dejedáz enzimek által katalizált PH metabolizmus együttes eredője.

Az agyi PH aktiváció, vagyis a T_4 T_3 -má alakulása a glia sejtekben expresszáladó kettes-típusú dejedáz (D2) enzim által katalizált. A neuronok nem képesek a T_3 előállítására, a neuronális PH hatást a gliális eredetű T_3 -tól függ. Azonban a neuronok is képesek az intracelluláris T_3 szint szabályozására, a hármas-típusú dejedáz (D3) általi inaktiváción keresztül.

A dejedázok szelenoenzimek, a szelenocisztein a katalitikus aminosav, amely beépítése összetett, energiaigényes kotranszlációs folyamat. Az enzimesaládnak három tagja ismert, ezek biokémiai paraméterei, expressziója és szabályozása nagymértékben eltér egymástól.

Az egyes-típusú dejojáz (D1) mind a PH aktivációt, mind az inaktivációt képes katalizálni. Azonban a D1 elsődleges szubsztrátja a reverz T_3 (rT_3), míg a T_3 előállításban elsősorban hyperthyroid körülmények között képes részt venni. Emberben az agyban nem expresszálódik, így nem vesz részt az agyi PH metabolizmusban. A D1 fehérje hosszú felezési idejű, poszttranszlációs módosítása nem ismert.

A D2 elsődleges feladata a T_4 T_3 -má alakítása. Mivel preferált szubsztrátja a T_4 és arra nézve a K_M -je három nagyságrenddel alacsonyabb a D1-énél, ezért euthyroid körülmények között elsősorban a D2 a T_3 fő forrása. Eltérően a plazmamembránban lokalizálódó D1-től és D3-tól, a D2 homodimerek az endoplazmatikus retikulumban (ER) helyezkednek el, stabil retencióban. A magas katalitikus hatások megköveteli a D2 aktivitás precíz szabályozását, amelyért többszintű rendszer felelős. Figyelembe véve, hogy a központi idegrendszerben a D2 a kizárólagos aktiváló dejojáz, így a D2 felel az agyi T_3 előállításért. Magas D2 expresszió figyelhető meg továbbá a BAT-ban, illetve izomszövetben.

A hármas-típusú dejojáz (D3) a PH inaktivációt katalizálja. Biokémiai paramétereit alapján képes a T_4 közvetlen inaktiválására, rT_3 -má alakításával, valamint a T_3 bontására. A D3 az agyban neuronálisan fordul elő, lehetőség biztosítva azok intracelluláris T_3 szintjének szabályozására.

A hypothalamicus PH metabolizmusnak kiemelt jelentősége van, hiszen, a HHP tengely negatív visszacsatolásának szabályozásán keresztül, hatása az egész szervezetre kiterjed. Mivel a hypothalamusban a T_3 nagy része helyben keletkezik a harmadik agykamra alsó-oldalsó falában elhelyezkedő tanycytákban meglévő D2 által, az enzim precíz szabályozásának feltárása ezekben a sejtekben kulcsfontosságú a tengely működésének megértéséhez. Míg korábbi vizsgálatok számos D2-t szabályozó intracelluláris útvonalat azonosítottak, az ezekre ható extracelluláris szignálok – különösen a tanycyták esetében – kevésbé ismertek, noha alapvető hatásuk lehet a HHP tengely működésének szabályozásában.

A *DIO2* gén promotere összetett transzkripcionális szabályozás alatt áll. rámutattak, hogy a cAMP/PKA útvonal a *DIO2* transzkripció aktivátora. Ez a mechanizmus ismert szerepet játszik a tobozmirigy fotoperiodikus szabályozásában, a hypothalamicus T_3 aktiváció évszakos váltakozásában, valamint a BAT hidegstressz általi indukciójában. Azonban a cAMP/PKA útvonal jelentősége tanycytákban, így a HHP tengely szabályozásában kevésbé feltárt, és az ezt aktiváló faktorok nem ismertek. A *DIO2* promoter érzékeny az NF- κ B szignalizációra, amely az ún. alacsony T_3 szindróma pathomechanizmusában kiemelt jelentőségű lehet, aminek során a tanycyták megemelkedett T_3 előállítása a HHP tengely gátlásához, ezáltal hypothyroidismushoz vezet. A *DIO2* transzkripciót maguk a pajzsmirigyhormonok is

befolyásolják azonban nem tisztázott, hogy gátló hatásukat direkt, vagy indirekt módon fejtik ki, mivel negatív pajzsmirigyhormon válaszelemet a *DIO2* promoterben nem azonosítottak.

A legjelentősebb különbség dehidázok szabályozása között, hogy egyedül a D2 célpontja az ubikvitin-proteaszóma rendszer általi (UPS) degradációnak, ennek következtében felezési ideje rövid. Ez a mechanizmus lehetővé teszi a D2 aktivitás gyors és reverzibilis szabályozását a dimer struktúrában ubikvitináció hatására bekövetkező konformáció változáson keresztül, amely degradáció nélkül is inaktíválja az enzimet. Ez deubikvitinázok által megfordítható, így az ubikvitinált D2 újra aktiválódhat. Az ER-ben elhelyezkedő D2 dimereket szorosan kötődnek az ECS^{WSB1} és MARCH6 ubikvitin ligázok, valamint az USP33 (VDU1) és USP20 (VDU2) deubikvitinázok. Az ECS^{WSB1} komplex a Cullin5 váz-, Skp1, Elongin B és C adapter fehérjékből, valamint a WSB1 F-box szubsztrát felismerő alegységből áll. A MARCH6 egy 14 transzmembrán hélixet tartalmazó fehérje, az ER-asszociált degradáció fontos résztvevője. A D2 ubikvitináció általi inaktívációját a T₄ serkenti, amely a szubsztrát általi enzim gátlás egyik ritka példája és lehetővé teszi a T₃ elállítás gyors szabályozását. Ezen összetett rendszer elemeinek régió specifikus expressziója részt vehet az egyes agyterületek D2 szabályozásának T₄-függő adaptációjában, amely által bizonyos területek (pl. cortex) PH szint szabályozása homeosztatikussá, míg a hypothalamusban különböző szignálók hatásának megfelelően állítja be a lokális PH szintet.

Az UPS alapvetően két részfolyamatból áll: a célfehérje ubikvitin kötés általi megjelöléséből és a proteaszomális degradációból. Az ubikvitin többlépcsős folyamat során kerül a célfehérjére, amely kijelöléséért az E3 ligáz enzimek felelősek. A szintetizált ubikvitin motívum alapvetően befolyásolja a célfehérje további sorsát, amely közül egyik lehetőség a proteaszomális lebomlás. A UPS rendkívül széleskörű biológiai jelentőséggel bír; részt vesz többek között a sejtciklus, osztódás és a jelátviteli útvonalak szabályozásában. Az ER membránfehérjék degradációja megköveteli azok ATP-igényes extrakcióját, mielőtt a proteaszómába kerülhetnének. Összességében a D2 precíz, többszintű szabályozás alatt áll – beleértve a transzkripcionális, pre- és poszttranszlációs szinteket –, amelyek működésének és jelentőségének feltárása nélkülözhetetlen a lokális PH szintek szabályozásának megértéséhez, különös tekintettel a HHP tengely működésére.

Vizsgálataink célul tűzték ki i) a D2 általi hypothalamicus PH aktivációt és azon keresztül a HHP tengelyt szabályozó mechanizmusok feltárását és ii) a D2 poszttranszlációs szabályozása szerkezeti hátterének jobb megértését, amely jelentős szerepet játszhat a szöveti PH hatás finomhangolásában, különös tekintettel a HHP tengely működésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A D2 általi pajzsmirigyhormon aktiváció új szabályozási mechanizmusainak feltárása a hypothalamusban
 - a) a D2 transzkripcionális szabályozása a hypothalamusban
 - b) a pajzsmirigyhormon és a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) szignalizáció kapcsolata

2. A MARCH6 szerepe a pajzsmirigyhormon aktiváció szabályozásában
 - a) a MARCH6 szöveti megoszlása és szabályozása
 - b) a D2-MARCH6 interakció vizsgálata

3. A D2 fehérje ubikvitinációjának szerkezeti vonatkozásai
 - a) a dehidázok ubikvitin általi szabályozásának minimális szerkezeti követelményei
 - b) a D2 ubikvitin ligázai általi felismerésének molekuláris háttere
 - c) az ER membrán extrakció szerepe a D2 ubikvitináció általi reverzibilis szabályozásában

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

DNS konstrukciók

Vad-típusú és a PCR alapú mutagenézissel előállított cAMP válaszlem mutáns emberi *DIO2* promoter konstrukciókat pGL3-basic luciferáz expresszálo riporter vektorba klónoztuk.

A *March6* és *Wsb1* expresszió szöveti megoszlásának vizsgálatához felnőtt hím Wistar patkányokból szövetmintákat vettünk majd TRIzol módszer segítségével RNS-t izoláltunk. Reverz transzkripció után a *March6*, *Wsb1* és a housekeeping *Ppia* intron-áthidaló primerekkel kerültek amplifikálásra, majd agaróz gélben szeparáltuk a PCR termékeket.

Az emberi *MARCH6* gén 3,5 kb 5' határoló régióját HEK-293T sejtekből izoláltuk, majd pGL3-basic vektorba klónoztuk. A csonkolásokat emésztés-újraligálással hoztuk létre.

A FRET konstrukciók a D2, WSB1, MARCH6 és USP33 fluoreszcens fehérjét tartalmazó fúziós vektorba klónozásával készültek. A mutációkat hely-specifikus PCR-alapú mutagenézissel alakítottuk ki.

A kiméra dejudázok létrehozása a D2-ből történő kazetta beillesztésével vagy hely-specifikus PCR-alapú mutagenézissel történt. FRET mérések céljából ezek szubklónozva lettek fluoreszcens fehérje fúziós vektorokba.

Minden létrehozott konstrukció szekvenálással ellenőrizve lett.

Sejtenyésztés és transzfekció

A HEK-293T és HeLa sejtvonalakat egyaránt 10 % FBS-t és 1 % penicillin-streptomycint tartalmazó tápban tenyésztettük. A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000 vagy Xtremegene HP reagenseket használtunk. Minden mérés vagy mintavétel a transzfekció utáni második napon történt. A trijód-tironin (T_3) és tiroxin (T_4) kezeléséhez hormonmentesített szérumot használtunk.

Reagensek és kezelések

A T_3 és T_4 40 mM NaOH-ban lett oldva. A hormonmentesített szérum készítéséhez FBS-t Tris pufferben előinkubált orvosi szénnel és dextranszal kezeltük. A tetracycline MQ-ban lett oldva és 1 μ g/ml végkoncentrációban használva. MG132 dimethyl sulfoxide-ban (DMSO) lett oldva és 2 μ M végkoncentrációban használva. Eeyarestatin I (EERI) DMSO-ban lett oldva és 10 μ M végkoncentrációban használva. PACAP 1-38 0.9 % NaCl-ban lett oldva és 100 nM végkoncentrációban használva. A Forskolin DMSO-ban lett oldva és 20 nM végkoncentrációban használva.

Luciferáz promóter vizsgálatok

A transzfekció utáni második napon a sejteket jéghideg $1 \times$ PBS-sel mostuk és $1 \times$ Passive Lysis Bufferben lizáltuk. A luciferáz aktivitás méréséhez Dual-Luciferase Reporter Assay-t és Luminoskan Ascent luminométert használtunk, a gyártók utasításai szerint.

Kvantitatív PCR

RNS izoláláshoz TRIzol reagenst vagy RNeasy Lipid Tissue Mini Kit-et használtunk. Az RNS átírásához High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et használtunk. Az RNS és a cDNS koncentrációjának meghatározása Qubit 2.0 fluorimetriás méréssel történt. A génextpresszió mérését TaqMan real-time PCR-rel végeztük, melyhez TaqMan Fast Universal PCR Master Mix-et és TaqMan Gene Expression Assayt használtunk. A reakciókat ViiA™ 7 Real-Time PCR készüléken futtattuk. Az adatok normalizálásához egér minták esetében a *Gapdh* és *Hprt1* gének mértani átlagát, humán sejtvonal minták esetében az *S18*-at használtuk. A relatív génextpresszió kiszámításához a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszert alkalmaztuk.

Western blot

A mintákat cComplete™ Mini EDTA-mentes proteáz inhibitor tartalmazó Western lízis pufferben dolgoztuk fel. A fehérjekoncentráció meghatározásához Bradford módszert és Bio-Rad iMark Microplate Absorbance Reader-t használtunk. A mintákat 4-20 %-os gradiens vagy 10 %-os acrylamide/bis-acrylamide gélben futtattuk meg. A FLAG epitóp kimutatásához $1 \times$ PBS-ben 1:3000 hígítású M2 anti-FLAG monoklonális antitestet és BM Chemiluminescence Western Blotting Kit-et használtunk, a gyártók utasításai szerint.

Dejodáz aktivitás mérése

A szövetminták vagy sejt pelleték foszfát pufferben lettek homogenizálva. ^{125}I -jelölt T_4 a mérés napján LH-20 Sephadex oszlopon került tisztításra. A D1 aktivitás méréséhez használt reakció összetétele: 10 mM dithiothreitol, 100 000 CPM ^{125}I -jelölt T_4 , 1 μM T_4 és lizátum 300 μl végtérfogatban. A D2 aktivitás méréséhez használt reakció összetétele: 20 mM dithiothreitol, 1 mM propylthiouracil, 100 nM T_3 , 100 000 CPM ^{125}I -jelölt T_4 , 100 nM T_4 és lizátum 300 μl végtérfogatban. A reakciókat 200 μl normál ló szérum és 100 μl triklórecetsav hozzáadásával állítottuk le. A minták 13 000 rpm-en történő centrifugálása után a felülúszót gamma számlálón mértük.

Szekretált alkalikus foszfatáz (SEAP) mérés

A sejteket pSEAP2-Promoter plazmival kotranszfektáltuk. A kezelés napján, a sejteken lévő médiumból mintát véve, azt NovaBright Chemiluminescent SEAP Reporter Gene Assay-vel és Luminoskan Ascent luminométerrel mértük.

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

A FRET detektálásához akceptor photobleaching technikát alkalmaztunk, amelyhez Nikon AIR konfokális mikroszkópot használtunk ún. virtuális filter módban, az alábbi beállításokkal: 453 nm argon lézer ECFP gerjesztéshez, 464-500 nm tartomány detekcióhoz; 514 nm argon lézer EYFP gerjesztéshez, 516-540 nm tartomány detekcióhoz; 561 nm DPSS lézer mCherry gerjesztéshez, 600-650 nm tartomány detekcióhoz. A statisztikai kiértékelésbe a 80 % bleach hatásfokot elérő minták kerültek be.

Állatok és műtétek

Az állatkísérletek a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának előírásai valamint az Európai Unió Tanácsának 2010/63/EU irányelve szerint történtek.

Sztereotaxikus műtéttel 26-guage átmérőjű acél kanült ültettünk 8 hetes hím CD1 egerek oldalkamrájába az alábbi koordináták szerint: anteroposterior -0.2; lateral -1.0 és dorsoventral -2.0 Bregmától számítva. Egy hét felépülési idő után 33-guage átmérőjű belső kanült csatlakoztattunk a korábban beültetett kanülhöz, melyen keresztül 300 pmol PACAP 1-38-at 2 μ l artificial CSF-ben (aCSF) oldva vagy 2 μ l artificial CSF-et injektáltunk az oldalkamrába. Az állatok a beadás után 4 órával dekapitálással kerültek terminálásra, melyet követően vér és szövetszövetminta vétel történt.

Hypothyroid státuszú állatok előállításához 8 hetes hím CD1-es egereket 3 hétig jódotmentes tápon tartottunk, valamint ivóvizüket 0,1 % nátrium-perkloráttal és 0,5 % methimazollal egészítettük ki. Hyperthyroid státuszú egerek létrehozásához 3 napig napi 15 μ g T₄/0,002 % BSA/PBS i.p. injekciót alkalmaztunk.

Pajzsmirigyhormon koncentráció mérés

A szérumban szabad T₃ és T₄ szintek meghatározása AccuLite CLIA microwells assays kit felhasználásával történt Luminoskan Ascent luminométeren vagy LIAISON® fT₃ and fT₄ assays felhasználásával LIAISON® Analyzer-en.

TSH bioaktivitás mérés

Az emberi TSH receptorral stabilan transzfektált CHO sejteket 24 órával a mérés kezdete előtt 24-es plate-re helyeztünk. A sejteket 90 µl stimulációs pufferben 30 percig előinkubáltuk. 10 µl szérum minta hozzáadása után a sejteket 1 óráig inkubáltuk, majd etanolban kicsaptuk, amelyet 37 °C-on hagyunk elpárologni. Ezután a sejteket 50 µl lízis pufferben gyűjtöttük össze. A lizátumok cAMP koncentrációja AlphaScreen cAMP Assay Kit segítségével EnSpire® Multimode Plate Reader-en került meghatározásra a gyártó utasításai szerint.

Immunohisztokémia

Az egerek transzkardiális perfúziója 40 ml 4 %-os paraformaldehid/0,1 M PB-ben oldattal történt. Az agyakat a kivétel utáni posztfixálást követően 30 %-os cukrot tartalmazó krioprotektív PBS oldatban inkubáltuk éjen át. Az agyakból fagyasztó mikrotómmal 25 µm vastagságú metszetek készültek. A metszetek permeabilizálásához 0,5 % Triton X-100-at és 0,5 % H₂O₂-t tartalmazó PBS-t használtunk 15 percig. Az aspecifikus kötődés megakadályozandó 2 %-os normál ló szérumot tartalmazó PBS oldatot alkalmaztunk, az antitestek hígítása ugyanilyen összetételű pufferben történt. A PACAP receptor kimutatásához nyúl αPAC1R (Dr. Shioda illetve Sigma, 1:100-as hígítás) primer szérumot, biotinizált szamar anyúl-IgG (1:250) szekunder antitestet használtunk, melyet avidin-biotin komplex erősítés után streptavidin-FITC konjugátummal (Jackson, 1:250) jelöltünk. A vimentin kimutatásához kecske αvimentin antitestet (Santa Cruz, 1:1500) és Alexa555-konjugált szamar ajuh-IgG-t (Thermo, 1:500) használtunk. A GFAP kecske αGFAP (Santa Cruz, 1:500) és Alexa555-konjugált szamar ajuh-IgG felhasználásával került kimutatásra.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízishez a Prism 3.0 and Statistica 8.0 szoftvereket használtuk. Az adatok átlag ± SEM értékekben kerültek kifejezésre, míg a szignifikancia szint megjelenítésére egységesen a *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 jelölés lett alkalmazva. Általánosságban két csoport összehasonlítása *t-próba*, míg három vagy több csoport statisztikai vizsgálatára a megfelelő típusú ANOVA és *post hoc* teszt lett alkalmazva.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) és a pajzsmirigyhormon szignalizáció kapcsolata

4.1.1 A PACAP a cAMP/PKA útvonalon keresztül indukálja a D2 expressziót

Korábbi eredmények számos intracelluláris kaskád részvételét mutatták ki a D2 transzkripcionális szabályozásában. Azonban az ezeket aktiváló szignálok kevésé ismertek. A hypothalamus a PACAP egyik fő célpontja, amely hatásai e területen nagymértékben átfednek a PH-ok hatásával. Ezért vizsgáltuk, hogy a PACAP szerepet játszhat-e a hypothalamicus PH metabolizmusban a D2 szabályozásán keresztül. Először teszteltük a PACAP hatását az emberi *DIO2* gén transzkripciójára kettős luciferáz promoter vizsgálatok segítségével a PAC1R PACAP receptort expresszáló HEK-293T sejtekben. A *DIO2* promoter aktivitása 100 nM PACAP kezelés hatására indukálódott. Annak tisztázásához, hogy a tapasztalt hatás a cAMP/PKA másodlagos jelátviteli útvonalon keresztül jön-e létre, helyirányított mutagenézissel létrehoztunk cAMP válasz elem (CRE) mutáns *DIO2* promoter konstrukciót. Míg az NF- κ B p65 alegységének stimuláló hatása megmaradt, a PKA nem volt képes indukálni e konstrukciót, demonstrálva a mutáció specifikus hatását a cAMP/PKA útvonalra. A PACAP indukáló hatása teljes mértékben kivédhetőnek bizonyult a mutációval, arra utalva, hogy a PACAP a cAMP/PKA jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza a *DIO2* promoter.

4.1.2 A PAC1R PACAP receptor expresszálódik tanycytákban

Immunohisztokémia segítségével vizsgáltuk, hogy mely régiókban, illetve sejt-típusokban valósulhat meg a D2 transzkripció PACAP általi szabályozása vagyis, hogy a PAC1R előfordul-e az agy két fő D2-t expresszáló sejt típusában a hypothalamicus tanycytákban és az astrocytákban. PAC1R immunoreaktivitás azonosítható volt a harmadik agykamra alsó és oldalsó falában elhelyezkedő tanycytákban, melyek a helyi T₃ előállításért felelősek ebben a régióban. Ezen eredmények alapján a PACAP szerepet játszhat a hypothalamicus T₃ előállítás szabályozásában. Szemben a tanycytákkal, PAC1R expresszió nem volt megfigyelhető astrocytákban a cortexben és a hippocampusban. Meg kell azonban említeni, hogy a PACAP-ra és a vasoactive intestinal polypeptide-ra (VIP) hasonló affinitással rendelkező VPAC1 és 2 receptorok bizonyos körülmények között expresszálódhatnak ezen sejtekben, illetve korábbi vizsgálatok a PAC1R jelenlétére utalnak reaktív astrocytákban.

4.1.3 A PACAP befolyásolja a HHP tengely működését és fejlődését

Előzőekben megállapítottuk, hogy a tanycytákban megvalósulhat a D2 PACAP általi szabályozása a cAMP másodlagos jelátvivőn keresztül. Ezen mechanizmus *in vivo* működőképességének tesztelése céljából hím CD1 egereknek intracerebroventricularisan 300 pmol PACAP-ot adtunk be. 4 órás PACAP kezelés hatására a mediobasalis hypothalamus D2 aktivitása 2,4-szeresére emelkedett. Az emelkedett T₃ előállítás HHP tengelyre gyakorolt hatását a TRH neuronok szintjén paraventricularis magból mikrodisszektált minták qPCR-rel történő vizsgálatával teszteltük. A *Trh* mRNS szint 45,89 %-ot csökkent, rámutatva a megemelkedett T₃ termelés által indukált negatív visszacsatolásra a HHP tengelyen. Párhuzamosan a *Trh* szint csökkenésével a hypophysisben a *Tshb* mRNS 23,30 %-kal volt alacsonyabb, míg a *Dio2* transzkriptum szintje változatlanak bizonyult, a PACAP indirekt hatására utalva ebben a régióban. A szérum TSH bioaktivitás nem változott szignifikánsan, azonban egy csökkenő tendencia megfigyelhető volt. A szérum szabad T₄ szintjében sem történt változás, azonban tekintettel a kezelés hosszára ez nem is volt várható.

A PACAP a HHP tengely szabályozására hosszú távon gyakorolt hatását PACAP hiányos egértörzs PH státuszán keresztül vizsgáltuk. Heterozigóta PACAP hiányos egerekben csökkent szérum szabad T₃, T₄ szinteket és TSH bioaktivitást tapasztaltunk, amely centrálisan nem kompenzált hypothyroidismusra utal. A csökkent PH elérhetőség hatására a cortexben és a hippocampusban a D2 aktivitás megemelkedett. A HHP tengely szempontjából kiemelt jelentőségű régiókban, a mediobasalis hypothalamusban és a hypophysisban a D2 aktivitás nem változott szignifikánsan. Tekintettel a centrális hypothyroidismusra, ami egyes fertőzéses állapotokban is kialakulhat továbbá a PACAP markáns antiinflammatorikus szerepére, vizsgáltuk, hogy nem az immunstátusz megváltozása áll-e a fenotípus hátterében. Ennek tisztázására mértük a keringő inflammatorikus és antiinflammatorikus citokinek koncentrációját, azonban nem tapasztaltunk különbséget a genotípusok függvényében. Következő lépésként a HHP tengely fejlődésének érintettségét vizsgáltuk a PACAP hiányának hatására. Ennek tesztelésére vizsgáltuk a PH elérhetőséget 5-napos állapotokban, azaz abban a korban, amikor a tengely egyensúlyi pontja kialakul. A periféria hypothyroidnak bizonyult a máj csökkent *Dio1*, és emelkedett *Thrb* expressziója alapján, míg a hypothalamusban emelkedett *Dio3* szintet találtunk. Ezen adatok alapján valószínűsíthető, hogy a tengely egyensúlyi pontja alacsony PH elérhetőség alapján állítódik be, így a hypothyroid állapot a TRH neuronok által normális értéként ismerődik fel, következésképpen nem kompenzálódik.

4.1.4 A pajzsmirigyhormonok befolyásolják az *Adcyap1* (PACAP) promoter aktivitását

Annak tisztázása céljából, hogy a PHok hatnak-e a PACAP jelátviteli útvonalra, vagyis, hogy a PACAP és PH szignalizáció közti kapcsolat kétirányú-e, vizsgáltuk az egér PACAP-ot kódoló *Adcyap1* génje PHok általi szabályozását. Az *Adcyap1* gén promoterének 5' határoló régiójának aktivitása nem változott 1, 3 és 5 óráig 0,1, 1, 10 illetve 100 nM T₃ kezelés hatására luciferáz promoter rendszerben vizsgálva. A PACAP szintézis a cAMP/PKA szignalizáció pozitív szabályozása alatt áll, amelyet PKA kotranszfekciójával demonstráltunk. A PHok *Adcyap1* promoter cAMP/PKA általi aktivációjára gyakorolt hatását *Adcyap1* luciferáz promoter konstrukciót expresszáló sejteken vizsgáltuk, azokat 50 nM T₃ és/vagy 20 μM Forskolin kezelésnek alévetve egér TRα jelenlétében vagy hiányában. A TRα és T₃ együttes jelenléte gátolta az *Adcyap1* promoter cAMP általi indukcióját. Kimutattuk, hogy míg a PACAP szintézis nem áll a PHok direkt szabályozása alatt, azonban annak cAMP általi indukcióját képes befolyásolni a ligandált pajzsmirigyhormon receptor.

Az előzőekben azonosított mechanizmus *in vivo* jelentőségét qPCR alkalmazásával vizsgáltuk, mérve az *Adcyap1* expressziót hypo- és hyperthyroid egerekből mikrodiszsektált agyi mintákon. Kiemelten olyan régiókra fókuszáltunk, amelyek a hypothalamicus területekre vetülnek és jelentőséggel bírnak a HHP tengely, valamint a táplálkozás és az energiaháztartás szabályozásában. A parabrachialis mag esetében csökkent *Adcyap1* expressziót tapasztaltunk hyperthyroid egerekben, míg fordított összefüggés volt tapasztalható a hypophysis esetében. Azonban általánosságban az *Adcyap1* gén expresszióját nem érintette az eltérő PH státusz.

4.2 A MARCH6 ubikvitin ligáz karakterizálása

4.2.1 A *March6* szöveti expressziós profilja

A *March6* mRNS szöveti megoszlását felnőtt Wistar patkányokban vizsgáltuk, a *Wsb1* ligáz aleggységgel összehasonlítva. Jelentős *March6* expresszió volt megfigyelhető a hypophysisben, cortexben, váz- és szívizomban és vesében, míg májban és BAT-ban alacsony *March6* mRNS szintet találtunk, ez utóbbi jelentős *Wsb1* expressziót mutatott. A pajzsmirigyben egyik ligáz sem volt kimutatható.

4.2.2 Az emberi MARCH6 gén promoterének vizsgálata

A MARCH6 expresszió szabályozásának vizsgálatához klónoztuk az emberi MARCH6 gén 5' határoló régiójának transzkripciós starthelytől számított 3,5 kb hosszú szakaszát, és TESS algoritmus valamint TRANSFAC 6.0 adatbázis segítségével analizáltuk potenciális transzkripciós faktor kötőhelyeket keresve. Ennek során számos olyan feltételezhető

transzkripció faktorát találtunk, amelyek a *DIO2* gén szabályozásában fontos szerepet játszanak, mint az NF- κ B és CREB, míg a transzkripció start hely közelében számos potenciális SP1 hely volt azonosítható. Luciferáz promoter aktivitás vizsgálatok az NF- κ B és a PKA gátló hatását mutatták a *MARCH6* promoter aktivitására. Igazoltuk a feltételezett SP1 kötőhelyek funkcionális jelentőségét: deléciójuk a *MARCH6* promoter alapaktivitást a felére csökkentette. Lényeges különbség volt megfigyelhető a *MARCH6* és a *Wsb1* Sonic hedgehog (SHH) általi szabályozásában: míg utóbbi a SHH pozitív célpontja, a *MARCH6* promoter aktivitása nem bizonyult érzékenynek a SHH transzkripció faktorára, a GLI2-re.

4.2.3 A D2 ubikvitinációjának jelentősége a barna zsírszövetben (BAT)

A *MARCH6* promoter PKA általi gátlása felvetette annak lehetőségét, hogy a D2 ubikvitinációs szabályozása részt vehet a BAT hideg indukálta emelkedett T₃ termelésében. E folyamat noradrenerg szabályozás alatt áll, ami intracelluláris cAMP szint emelkedést vált ki. Ennek teszteléséhez hím CD1 egereket 4 °C-on tartottunk 1, 2, 4, 6 és 9 óráig, majd a D2 ubikvitinációs szabályozásában szerepet játszó gének expresszióját qPCR segítségével vizsgáltuk. A *March6* expresszió végig változatlan maradt, míg a *Wsb1* már az első órában emelkedett szintet mutatott, amely végig megfigyelhető volt a vizsgált intervallumban. Az *Usp33* deubikvitináz mRNS szintje 2 óra után emelkedett 2-2,5-szeres szintre, míg a *Dio2* expressziója azonnal indukálódott és 10-25-szörös emelkedett szintet mutatott az indukálatlan kontrolhoz képest. Az *Ucp1* expressziója 4 óra után tért el szignifikánsan az alapállapottól, és folytonos emelkedést mutatott.

Fordított kísérleti elrendezésben vizsgáltuk, hogy az enzim ubikvitinációs szabályozása részt vesz-e az indukált D2 aktivitás csökkentésében hidegstressz után. Hím CD1 egereket 8 órás 4 °C-os hidegstressz után termoneutrális (30 °C) hőmérsékleten tartottunk 1, 2, 4, 6 óráig. Hasonlóan az előzőekben tapasztaltakkal, a *March6* expresszió változatlan maradt, a *Wsb1* szintje a hidegstressz után azonnal a kontrol szintjére esett. Az *Usp33* mRNS szintje gyors változást mutatott, azonban 6 óra után is emelkedett maradt. A *Dio2* expresszió kinetikája hasonló volt az *Usp33*-hoz, azonban az aktivitás konstans szinten maradt csökkenést először csak 6 óra után lehetett detektálni. Az *Ucp1* mRNS szintje stabil maradt a vizsgált időszakban.

Adataink alapján az ubikvitin konjugáció nem lényeges eleme a D2 indukációjának a BAT-ban hidegstressz hatására. A *Wsb1* esetében a feltételezettel ellentétes változás megértése további vizsgálatokat igényel.

4.2.4 A D2-MARCH6 interakció topológiája

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer segítségével vizsgáltuk a MARCH6-D2 interakció meglétét és annak topológiáját élő sejtekben. Az interakció létrejöttét a MARCH6 és D2 fehérje mindkét terminusa között teszteltük. A MARCH6 RING-domén tartalmazó N-terminusa és a D2 citoplazmában elhelyezkedő C-terminális globuláris doménje közt interakciót tapasztaltunk ($E_{\text{FRET}} = 20.04 \pm 1.02 \%$). Ezzel szemben a MARCH6 C-terminusa és a D2 N- vagy C-terminusa közt nem volt mérhető FRET szignál.

4.2.5 A D2 MARCH6 általi szabályozásának pajzsmirigyhormon-függése

Vizsgáltuk, hogy a MARCH6 szerepet játszhat-e a PH aktiváció PHok általi szabályozásában. A *MARCH6* promoter aktivitása nem változott 100 nM T_3 kezelésre, arra utalva, hogy transzkripció szinten a *MARCH6* nem áll PH szabályozás alatt. Azonban a D2-MARCH6 interakció 39,17 %-os erősödését tapasztaltuk 10 μM T_4 hatására, amely alapján a MARCH6 – hasonlóan a WSB1-hez – részt vesz a D2 szubsztrát indukálta ubikvitinációjában.

4.2.6 A D2 és ligázai közti interakciók egyidejű vizsgálatára alkalmas 3-FRET rendszer létrehozása

Az agyban csak tancycytákban figyelhető meg, hogy a D2 mindkét E3 ligázával, a WSB1-gyel és MARCH6-tal koexpresszálódik. A két ligáz D2 szabályozásában betöltött szerepének egyidejű, élő sejtben történő vizsgálata céljából 3-FRET rendszert hoztunk létre, amely alapja, hogy 3 fluorfór egyszerre 2 FRET párt alkot. E módszerrel megállapítottuk, hogy mindkét ligáz hasonló mértékben járul hozzá a D2 szubsztrát általi ubikvitinációjához (55,55 % MARCH6-D2 és 49,99 % WSB1-D2 interakció erősödés 10 μM T_4 hatására).

4.3 A dejudázok ubikvitinációjának szerkezeti háttere

4.3.1 A dejudázok stabilitásának és ubikvitinálhatóságának molekuláris alapjai

A D2 rövid felezési idejének és ubikvitinálhatóságának szükséges és elégséges szerkezeti követelményeinek azonosításához D1-D2 kiméra fehérjéket hoztunk létre. A stabil D1-be, mint dejudáz vázba, külön-külön, vagy együttesen beépítettük a D2 ubikvitinálódó lizinjet, instabilitási-hurkát, illetve SEC62-füzióval a fehérjét ER-lokalizálttá tettük. Egy vagy mindkét lizin beépítése nem érintette sem a stabilitást sem az ubikvitinációt, azonban az instabilitási-hurokkal együtt csökkent felezési időhöz vezetett. Az így kapott kiméra ER-lokalizálttá tétele ubikvitinált formák megjelenését eredményezte. Az ubikvitinációt MG132 proteaszóma inhibitorral is teszteltük. A lizinet és/vagy instabilitási-hurkot tartalmazó kimérák dejudáz

aktivitását nem érintette az MG132 kezelés arra utalva, hogy ezek nem célpontjai az ubikvitin-proteaszóma rendszernek.

4.3.2 *A D2-specifikus elemek szerepe az ubikvitin ligázok általi felismerésében*

A D2-specifikus szerkezeti elemek a D2 ubikvitin ligázai általi kötéséhez minimálisan elégséges kombinációját FRET segítségével vizsgáltuk, valamint teszteltük, hogy az ubikvitinálódónak talált kiméra a D2 ubikvitin ligázai számára felismerhető-e. Hasonlóan az előzőekben tapasztaltakhoz a lizinek és az instabilitási-hurok nem bizonyultak elegendőnek sem a WSB1-, sem a MARCH6 általi felismeréshez. A D1 SEC62-fúzióval ER-be történő irányításakor hasonló eredményt tapasztaltunk. Azonban kombinálva az említett elemeket és a lokalizációt, a hármás mutáns (D2-specifikus lizinek, instabilitási-hurok, ER expresszió) és a WSB1 ligáz között interakciót tapasztaltunk, azonban ezek az elemek sem eredményeztek interakciót a MARCH6 és e kiméra közt. Ezen adatok alapján az ubikvitinálódónak talált kiméra a D2 egyik ubikvitin ligáza által felismerhető. Továbbá eredményeink arra utalnak, hogy a D2 WSB1- és MARCH6 általi felismerése eltérő motívumokon keresztül történik.

4.3.3 *A D2 treonin/alanin polimorfizmusának hatása a D2 és ligázai interakciójára*

Vizsgáltuk az emberi D2 instabilitási-hurkának első aminosavát érintő polimorfizmus hatását a fehérje ubikvitinációjára. Szubsztrát hiányában sem a D2-WSB1, sem a D2-MARCH6 interakció erőssége nem változott a T92A szubsztitúció hatására. A T₄-okozta interakció erősödés a WSB1 esetében szintén hasonló volt a vad-típusú és polimorf D2 között. Azonban a D2-MARCH6 interakció érzéketlen volt a T₄-re. Ezen eredmények alapján a T92A polimorfizmus érintheti a D2 poszttranszlációs szabályozását, ami hozzájárulhat a T92A mutáns feltételezett hosszabb felezési idejéhez, valamint adataink, hasonlóan az előzőekben tapasztaltakkal, a két ligáz eltérő felismerési motívumára, illetve mechanizmusára utalnak.

4.3.4 *A D2 deubikvitinációja és ER membránból történő extrakciója közti kapcsolat*

Az ER-ben lokalizálódó fehérjéknek proteaszomális degradációjuk előtt a membránból extrahálódniuk kell a p97/VCP komplex által. Előzetes adatok alapján az ER membrán extrakciójának gátlása nem eredményezi a D2 aktivitásának növekedését. Ezen ellentmondás tisztázása céljából vizsgáltuk a D2 globuláris doménjei, valamint a D2 és az USP33 deubikvitináz közti fehérje-fehérje interakció. Az ER membrán extrakciós komplexének, a p97/VCP-nek gátlása Eeyarrestatin I-gyel (EERI) csökkentette a D2 globuláris domének közti interakciót, hasonló szintre, mint amit T₄ hozzáadása esetén mértünk. Az EERI és T₄ együttes alkalmazása nem okozott további változást, a D2 ubikvitinációs egyensúlyának érintettségére

utalva. E hipotézis teszteléséhez vizsgálatuk a D2 és USP33 közti interakciót a membrán extrakció és az ubikvitináció gátlása esetén. Adataink alapján a D2-USP33 interakció a membrán extrakció gátlásának hatására csökkent, ami alacsonyabb deubikvitinációs kapacitásra utal, ami magyarázatul szolgálhat a csökkent aktivitásra a degradációs útvonal gátlása esetében.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kimutattuk, hogy a PACAP képes a *DIO2* transzkripciót aktiválni a cAMP/PKA útvonalon keresztül. Az agyban a D2-t expresszáló sejtípusok közül a tanyocytákban azonosítottuk a PAC1R receptor expresszióját. Intracerebroventricularis PACAP beadás emelte a mediobasalis hypothalamus D2 aktivitását, ami a PVN-ben *Trh* és a hypophysisben *Tshb* expresszió csökkenéshez vezetett, a korábban feltételezett PACAP *Trh*-ra gyakorolt stimuláló hatása ellenére. Rámutattunk a PACAP fontos szerepére a HHP tengely fejlődésében, a PACAP-hiányos állatmodell centrálisan nem kompenzált hypothyroid fenotípusán keresztül. Ennek feltételezhető oka a megváltozott hypothalamicus PH metabolizmus a tengely egyensúlyi pontjának kialakulásakor.

A tanyocytákban a D2-vel koexpresszálódó E3 ligáz – a *March6* – széleskörű szöveti expresszióját tapasztaltuk, jelentős átfedésben a *Wsb1* ligázzal, míg pajzsmirigyben egyik ligáz sem volt kimutatható. Vizsgáltuk az emberi *MARCH6* gén szabályozását, elsősorban a PH aktivációt befolyásoló faktorokra fókuszálva. Kimutattuk, hogy a *DIO2*-t stimuláló útvonalak – PKA és NF- κ B – gátolják a *MARCH6* promotor aktivitását, amely által az említett jelátviteli útvonalak posztranzlációsán is növelhetik a T_3 előállítását, interferálva a D2 ubikvitinációjával. Ennek *in vivo* tesztelésére vizsgáltuk a ligázok expresszióját BAT-ban hidegstressz hatására, amelynek központi tényezője cAMP/PKA útvonal noradrenerg stimulus általi aktivációja, amely növeli a BAT-ban a T_3 előállítását. Szemben az *in vitro* adatokkal a *March6* expresszió nem reagált a cAMP/PKA útvonal aktivációjára. Ezzel szemben a *Wsb1* mRNS szinten szorosan korrelált a hidegstressz fennállásával, amelynek jelentősége további vizsgálatokat igényel, de hozzájárulhat a PH aktiváció fokozásához a például a katalitikusan inaktív enzim lebontásával.

Kimutattuk a *MARCH6* és a D2 fehérjék kapcsolatát élő emlős sejtekben, igazolva szerepét a D2 ubikvitinációjában. A *MARCH6*, hasonlóan a *WSB1*-hez, részt vesz a D2 szubsztrát általi inaktivációjában, azonban expressziós szinten nem célpontja a PHoknak. 3-FRET rendszert létrehozva vizsgáltuk a két ligáz egymáshoz viszonyított szerepét a D2

szabályozásában, melynek során hasonló mértékű részvételt tapasztaltunk a D2 T₄-indukálta ubikvitinációjában. Kimutattuk a D2 deubikvitinációjának és p97/VCP szabályozta membrán extrakciójának funkcionális kapcsoltságát.

D1-D2 kimérák létrehozásával azonosítottuk, hogy a D2 lizinjei, instabilitási-hurka az ER-lokalizációval elegendő feltétele a rövid felezési időnek, és az ECS^{WSB1} ligáz általi ubikvitinációnak egy deudáz fehérje esetében. Az említett kiméra nem volt felismerhető a MARCH6 ligáz számára, amely a ligázok eltérő interakciós motívumára utal. Eltérés volt megfigyelhető a WSB1 és MARCH6 között a D2 T92A polimorfizmusa esetében is, amely interferált a D2-MARCH6 interakció T₄ általi erősödésével. A D2 deubikvitinációja és membrán extrakciója között szoros kapcsolatot tártunk fel, amely e lépés sebesség meghatározó voltára utal a D2 reverzibilis degradációjában.

Eredményeink hozzájárulnak a PH aktiváció molekuláris-szintű szabályozásának, és azok HHP tengely működésében betöltött jelentőségének jobb megértéséhez.

6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

6.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Zavacki AM, Arrojo E Drigo R, Freitas BC, Chung M, Harney JW, **Egri P**, Wittmann G, Fekete C, Gereben B, Bianco AC (2009)
The E3 ubiquitin ligase *TEB4* mediates degradation of type 2 iodothyronine deiodinase.
Mol Cell Biol 29(19):5339-47.
2. Arrojo E Drigo R*, **Egri P***, Jo S, Gereben B, Bianco AC (2013)
The type II deiodinase is retrotranslocated to the cytoplasm and proteasomes via p97/Atx3 complex
Mol Endocrinol 27(12):2105-15.
* megosztott első szerzők
3. **Egri P** and Gereben B (2014)
Minimal requirements for ubiquitination-mediated regulation of thyroid hormone activation
J Mol Endocrinol 53(2):217-26.
4. **Egri P**, Fekete C, Dénes Á, Reglódi D, Hashimoto H, Fülöp BD and Gereben B (2016)
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) regulates the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis via type 2 deiodinase in male mice
Endocrinology, Epub 2016 Apr 5:en20161043.

6.2 Egyéb közlemények

1. Christoffolete MA, Doleschall M, **Egri P**, Liposits Z, Zavacki AM, Bianco AC, Gereben B (2010)
Regulation of thyroid hormone activation via the liver X-receptor/retinoid X-receptor pathway
J Endocrinol 205(2):179-86.
2. Freitas BC, Gereben B, Castillo M, Kalló I, Zeöld A, **Egri P**, Liposits Z, Zavacki AM, Maciel RM, Jo S, Singru P, Sanchez E, Lechan RM, Bianco AC (2010)
Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells
J Clin Invest 120(6):2206-17.
3. Schéle E, Fekete C, **Egri P**, Füzesi T, Palkovits M, Keller É, Liposits Z, Gereben B, Karlsson-Lindahl L, Shao R, Jansson JO (2012)
Interleukin-6 receptor α is co-localised with melanin-concentrating hormone in human and mouse hypothalamus
J Neuroendocrinol 24(6):930-43.
4. McAninch EA, Jo S, Preite NZ, Farkas E, Mohácsik P, Fekete C, **Egri P**, Gereben B, Li Y, Deng Y, Patti ME, Zevenbergen C, Peeters RP, Mash DC, Bianco AC (2015)
Prevalent polymorphism in thyroid hormone-activating enzyme leaves a genetic fingerprint that underlies associated clinical syndromes
J Clin Endocrinol Metab 100(3):920-33.

5. Jansen SW, Akintola AA, Roelfsema F, van der Spoel E, Cobbaert CM, Ballieux BE, **Egri P**, Kvartha-Papp Z, Gereben B, Fekete C, Slagboom PE, van der Grond J, Demeneix BA, Pijl H, Westendorp RG, van Heemst D. (2015)
Human longevity is characterised by high thyroid stimulating hormone secretion without altered energy metabolism.
Sci Rep. 19;5:11525.
6. Kollár A, Kvartha-Papp Z, **Egri P**, Gereben B (2016)
Different Types of Luciferase Reporters Show Distinct Susceptibility to T3-Evoked Downregulation
Thyroid 26(1):179-82.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Gereben Balázsnak, a támogatásáért, valamint, hogy lehetővé tette kutatócsoportjában a doktori disszertációm elkészítését.

Köszönöm Liposits Zsolt professzor úrnak, az Endokrin Neurobiológia Kutatócsoport vezetőjének a támogatást.

Szeretném hálámat kifejezni Reglódi Dóra professzor asszonynak a munkacsoportjával végzett közös munkáért. Köszönettel tartozom Dr. Seiji Shiodának az anti-PAC1R szérumért, valamint Dr. Patócs Attilának a pajzsmirigyhormon mérésben nyújtott segítségéért.

Szeretném hálámat kifejezni Barna Lászlónak, Dr. Doleschall Mártonnak, Dr. Fekete Csabának, Dr. Sárvári Miklósnak és Dr. Zeöld Anikónak tanácsaikért és módszertani segítségükért.

Kiemelt köszönettel tartozom Hársfalvi Viviennek és Juhász Andreának, munkacsoportunk asszisztenseinek.

