

A pajzsmirigyhormon hatás szabályozó tényezőinek vizsgálata

Ph.D. Tézisek

Dr. Kollár Anna

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet



Konzulens: Dr. Gereben Balázs, D.Sc., tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Gálfi Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Tóth Zsuzsanna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Alpár Alán, D.Sc., egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Madarász Emília, D.Sc., tudományos tanácsadó

Budapest
2017

1. BEVEZETÉS

A pajzsmirigyhormonok (PMH-k) alapvető szerepet játszanak a különböző szervrendszerek fejlődésében és működésében. A PMH-k a sejtek működésének alapvető folyamatait befolyásolják, ideértve a sejtosztódás/differenciáció és a celluláris energiaháztartás szabályozását. A PMH-k különösen fontosak az agy fejlődése és működése szempontjából. A PMH háztartás zavara emberben súlyos tünetek formájában nyilvánul meg, a veleszületett hipotireózis kezeletlen formája kreténizmust, míg a PMH jelátvitel mutációk hatására bekövetkező zavarai a kognitív és a perifériás működésben okoznak problémát.

A keringő PMH szinteket a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP)-tengely szabályozza. Ez a központi vezérlés arra van programozva, hogy a szérumban T_3 szintjét élettani tartományban tartsa. Ez elsősorban a PMH termelésének szabályozásán keresztül valósul meg, különös tekintettel a pajzsmirigy által termelt, hosszú felezési-idejű T_4 prohormon elválasztására. Azonban a PMH hatás szöveti, ill. sejt szintjén valósul meg és szabályozása gyors és szövetspecifikus beállításokat igényel. Így a HHP-tengelynek a szöveti PMH szintekre gyakorolt befolyása korlátozott.

Az elmúlt két évtized erőfeszítéseinek következtében a szövetspecifikus PMH hatásért felelős molekuláris hálózatot alkotó, s annak szabályozásáért felelős számos mechanizmust sikerült feltérképezni. Kiemelkedő jelentőségű volt a szelenodejodáz enzimes család tagjainak klónozása. A kettes típusú deiodáz enzim (D2) kulcsfontosságú a PMH agyi aktiválásában: az inaktív prohormonból, a tiroxinból (T_4) trijód-tironint (T_3) képez úgy, hogy a külső fenolos gyűrűről 5' deiodációval egy jódatomot távolít el. Ez a folyamat az agyban kompartmentalizált, a D2 által képzett T_3 előállítás a gliasejtekben történik, mivel az idegsejtek nem képesek a T_3 előállítására, így az aktivált hormont fel kell venniük. A PMH elérhetőségnek ezt a lényeges elemét támasztják alá azok a megfigyelések, amelyek szerint nem a T_3 , hanem a T_4 prohormon az, amelyik az agyszövetbe hatékonyan bejuthat. Ezáltal a T_3 -nak helyben, az agyszövetben kell képződnie.

A pajzsmirigyhormonokkal összefüggő biológiai hatások előfeltétele a PMH elérhetőség szoros szabályozása. Jól ismert tény, hogy a HHP-tengelyt a PMH-k negatív visszacsatolással szabályozzák. Ezt egy olyan mechanizmus teszi lehetővé, amely funkcionálisan összekapcsolja a HHP-tengely központi irányítását azzal a mechanizmussal, ami a mediobasalis hipotalamuszbéli harmadik agykamra oldalfalát és alapját bélelő tanciták D2 aktivitása által a helyi PMH elérhetőség szabályozására irányul. A hipotalamusz paraventrikuláris magjának

hipofiziotróp TRH neuronjai D2 expresszió híján nem képesek T_3 -at előállítani, így PMH felvételtük a mediobasalis hipotalamusz T_3 -szintjétől függ.

Az általános elképzelés alapján az idegrendszer a proliferatív fejlődési stádiumokban minimalizálja a PMH hatást, de csak kevés adat áll rendelkezésre az agy T_3 képző kapacitásával kapcsolatban a korai agyfejlődési szakaszban. A csirke a fejlődő agy PMH háztartását célzó vizsgálatoknak rendkívül hasznos állatmodelljéül szolgál, mivel a patkánnyal ellentétben a csirke HHP tengelyének fejlődési kinetikája hasonló az emberéhez. Ezenkívül a csirke embrióban az anyai szabályozási körök zavaró hatásától mentesen lehet vizsgálni a fejlődési jelenségeket.

A D2 nagy aktivitással rendelkező oxido-reduktáz, aktivitására többszintű szoros szabályozás felügyel. Ezek a folyamatok kritikusan fontosak a szövetspecifikusan szabályozott és megfelelő időzítéssel végbemenő PMH hatás elérésében. A D2 mRNS és aktivitás közötti különbség arra utal, hogy a D2-függő PMH aktiváció szabályozásában aktív szerepet játszanak poszttranszkripcionális folyamatok, pl. a D2 mRNS alternatív hasítása. A D2 mRNS körülbelül négyszer hosszabb, mint egy átlagos eukarióta mRNS és hosszú nem-transzlálódó régiókat tartalmaz. Érdekes módon 5' nem-transzlálódó régiója (5'UTR) számos rövid nyitott olvasási keretet (sORF) tartalmaz, ezek start és stop kodonnal elválasztott kis alternatív kódoló régiók, amelyek RNS szegmense hárommal osztható, elvileg translációra alkalmas bázisból áll.

A létrejött T_3 biológiai hatásait elsősorban olyan, a sejtmagban található pajzsmirigyhormon receptorokon (TR) keresztül fejt ki, amelyek retinoid X receptorral (RXR) heterodimert alkotva kötődnek a DNS-hez. A TR-RXR heterodimerek a sejtmagban találhatóak abban az esetben is, amikor nem kötnék hormont, és a hormont nem kötő TR is a célgén PMH válaszelemeihez kötődik. A PMH-k által pozitívan szabályozott gének esetében a TR/RXR heterodimerek korepresszor molekulákat kötnék. A T_3 kötődés a TR konformációváltozásával jár, és a korepresszorok elengedése után a komplex koaktivátorokat köt. A PMH-függő negatívan szabályozott gének működési mechanizmusa még nem teljes mértékben feltárt és különböző modelleket dolgoztak ki a jelenség magyarázatára.

A biolumineszcencián alapuló vizsgálati módszerek a transzkripció tanulmányozására alkalmas megközelítések közül a legkorszerűbbek közé tartoznak. A génexpresszió pontos vizsgálatára irányuló kísérletek esetében elengedhetetlen követelmény, hogy maga a riportter ne legyen érzékeny arra a faktorra, aminek a promóterre, valamint az azt határoló régiók működésére gyakorolt hatását vizsgálni kívánjuk. Azonban bizonyították, hogy a klasszikus "firefly"

luciferáz aktivitása T_3 hatására PMH-függő, de promóter-független módon csökkent és feltételezték, hogy a luciferáz génben negatív PMH válaszelemek vannak jelen. Több vizsgálat is rámutatott a klasszikus luciferáz korlátaira T_3 -függő génexpressziós vizsgálatokban. Ezek a megfigyelések világossá tették, hogy szükség van olyan vizsgálati módszerre, amellyel a T_3 által közvetített génexpresszió és a T_3 sejtfunkciókra kifejtett hatása pontosan mérhető.

Ezért az volt a célunk, hogy olyan sejtes és molekuláris szabályozó tényezőket tanulmányozzunk, amelyek a PMH hatás hátterében állnak az agyban és más szövetekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A PMH hatás szabályozó tényezőit molekuláris és sejtbioológiai megközelítésekkel vizsgáltuk. A következő területekre összpontosítottunk:

- I. A PMH elérhetőség vizsgálata a fejlődő csirke hipotalamuszban
- II. A kettes típusú deiodáz enzimet kódoló *dio2* gén RNS-függő poszttranszkripció szabályozásának tanulmányozása
- III. T_3 -függő géntranszkripció vizsgálatára alkalmas riporterfehérjék azonosítása

Konkrét kérdéseink a következők voltak:

1. Milyen a D2 mRNS eloszlási mintázata a fejlődő és a felnőtt csirkeagyban?
2. Szerepet játszik-e az alternatív hasítás és a D2 5' nem-transzlálódó régiója a D2 aktivitás poszttranszkripció szabályozásában?
3. Léteznek-e olyan új luciferáz riporterrek, amelyek pontosabban képesek mérni a T_3 -által közvetített transzkripcionális változásokat, mint a klasszikus "firefly" luciferáz?

3. MÓDSZEREK

3.1. Állatok

A nyolchetes, Specifikus-Kórokozóktól-Mentes Fehér Leghörn csirkék és a 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15 és 17 napos csirkeembriók az Országos Állategészségügyi Intézetből, valamint a Ceva-Phylaxia Zrt-ből (Budapest) származtak. Az inkubáció a 0. embrionális napon kezdődött. Az állatokból származó szövetmintákat a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (Budapest) Állatvédelmi és Etikai Bizottságának jogi előírásaival összhangban gyűjtöttük.

3.2. Konstrukciók

A D2 RNS-függő posztranszkripcionális szabályozásának vizsgálata

A csirke D2 (cD2) riporter konstrukció váza az *EcoRI-HindIII* hasítási helyek között lévő cD2 kódoló régiót, valamint a *HindIII-NotI* közötti minimális patkány D1-et tartalmazta. A konstrukciók különböző UTR fragmentumok klónozásával készültek a D10 vektor *SacII* és *EcoRI* hasítási helyei közé. A cD2 5'UTR konstrukciója a teljes hosszúságú cD2 cDNS *SacII-EcoRI* fragmentumának a cD2 riporter megfelelő helyére történő beillesztésével készült.

A cORF(Wt)-cD2 konstrukcióhoz az alábbi oligonukleotidakat használtuk: „sense” tccccgcggG CCGAGAAACA ATGGGATAGC GCgaattc; „antisense” ggaattcGCG CTATCCCATT GTTCTCGGC ccgcgggga volt. A két oligonukleotidát összehibridizálva duplaszálú DNS-t hoztunk létre. A cORF(Mut-ATG)-cD2 konstrukcióhoz a következő oligonukleotidakat használtuk: „sense” tccccgcggG CCGAGAAACA tGGGATAGC Gcgaattc; „antisense” ggaattcGCG CTATCCCAaT GTTCTCGGC ccgcgggga. A keletkezett inzerteket a cD2 riporter *SacII-EcoRI* vágóhelyei közé klónoztuk. A $\Delta 77cD2$ fehérjét kódoló cDNS-t izoláltuk és a hasított cDNS-t a D10 emlős expressziós vektor *SacII* és *NotI* hasítási helyei közé illesztettük be. Az előállított konstrukciók szekvenciáját automata szekvenálással ellenőriztük.

Luciferáz riporter elemzése

A timidin kináz luciferáz (*TK-Luc*) konstrukciót a *pTRE-TK-Luc BamHI* és *BglII*-vel történő emésztésével állítottuk elő, majd ligálás után a végső konstrukciót direkt szekvenálással ellenőriztük.

A *TK-(dCpG)Luc*-ot a *TK-Luc* plazmidgerinc felhasználásával a következőképpen állítottuk elő. A *pMOD Luc-ShS v02* plazmidot használtuk Vent PCR-rel a *(dCpG)Luc* kódoló régiójának amplifikálásához. A fragmentumot *NcoI*-el vágtuk és beillesztettük a *TK-Luc NcoI* és tompa végű alakított *EcoNI* helyei közé. A konstrukciót szekvenálással ellenőriztük.

A *TK-NanoLuc*-ot úgy állítottuk elő, hogy a *pTRE-TK-Luc*-ot *Bgl*II és *Hind*III-al emésztve minimál *TK*-t nem tartalmazó TRE-t izoláltunk, majd a fragmentumot a *pNLI.1* vektor (Promega, Madison, WI, USA) megegyező helyére klónoztuk, ezt követően a végső konstrukciót szekvenálással ellenőriztük.

A *TK-Renilla-Luc*-ot a *pRL-TK* (Promega) 760 bázispár hosszú *TK* promóterének csonkolásával állítottuk elő úgy, hogy azt *Bgl*II és *Eco*RI-el emésztettük, majd Klenow polimerázzal tompítottuk a szálvégeket és újraligáltuk. Így egy minimál *TK* promotert kaptunk, amely 31 bázispárral rövidebb, mint a *TK-Luc* 128 bázispár hosszú *TK* promótere. A *TK* promotertől 3' irányban ez a konstrukció szintén tartalmaz egy 136 bázispáros kiméra intront, amely a *pRL-TK*-ból származik. A konstrukciót restriktions emésztéssel ellenőriztük.

Az egér *TRa* (*mTRa*) expressziós konstrukcióhoz templátként a *TRaCDM*-t használtuk úgy, hogy az *mTRa* kódoló régiót Vent PCR-rel amplifikáltuk. A fragmentet *Eco*RI-el és *Not*I-el emésztettük, majd a *pCI-Neo* vektor (Promega) megfelelő helyeire illesztettük és szekvenálással ellenőriztük. A szekretált embrionális alkalikus foszfatáz kódoló *pSEAP2*-Promoter plazmidot használtuk transzfekciós kontrollként.

3.3. DNS transzfektálás

HEK-293 sejteket kalcium foszfát precipitációs módszerrel transzfektáltunk. A sejteket tíz mikrogramm dehidrát kódoló D10 alapú vektorral tranziensen transzfektáltuk 4 μ g D15 „helper” vektor jelenlétében, amire a D10 promóterének transzkripció aktivációja miatt volt szükség. A D2 aktivitási eredményeket átlag \pm SEM-ben tüntetjük fel, két párhuzamos tenyésztődény legalább három különálló kísérletben történő mérésére vonatkoztatva, a cD2 kontroll százalékában. A JEG-3 humán choriocarcinoma sejteket 10% főtál borjúsavóval kiegészített Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápfolyadékban tenyésztettük 24 lyukú lemezen. Amikor a sejtek elérték a kb. 70%-os konfluenciát, 800 ng DNS-sel/tenyésztődény transzfektáltuk azokat (200 ng *Luciferáz* riporter, 100 ng egér *TRa*, 10 ng *pSEAP2* és 490 ng *pUC*, mint „inert” DNS) Lipofectamine® 2000 felhasználásával. Hat óra múlva a transzfekcióhoz használt tápfolyadékot 10%-nyi hormonmentes főtálborjúsavóval kiegészített DMEM-re cseréltük, és ebben 40 órán át inkubáltuk a sejteket. Ezt a tápfolyadékot 10%-nyi hormonmentes főtálborjúsavóval kiegészített DMEM-re cseréltük, amely vagy 50 nM 3,5,3' trijódirtionint (+T₃) vagy pedig NaOH-ot tartalmazott (-T₃). 24 óra elteltével a tápfolyadékot összegyűjtöttük SEAP mérésre. A sejteket foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk és 100 μ l Passzív lizis pufferben vettük fel.

3.4. RNS izolálás és RT-PCR

A 7, 8, 9, 10, 11, 13 és 15 napos csirkeembriókból származó párhuzamosan vett agymintákból Trizollal totál RNS-t izoláltunk. Az RNS-t oligonukleotid-dT primer segítségével cDNS-sé írtuk át, majd azt D2 specifikus primerekkel amplifikáltuk. Az agyféltekéből és a májból izolált totál RNS reverz transzkripcióját a CTCACCAGAA GGCCTGAAGA G “antisense” oligonukleotidával indítottuk és Taq polimeráz segítségével D2 specifikus primerekkel amplifikáltuk. A fragmentumokat pGEM-T vektorba klónoztuk, és automata szekvenálást végeztünk. Az amplifikációkat két különálló reakcióban végeztük.

3.5. Northern blot

A D2 ontogenetikus megoszlási vizsgálatához a Northern blot-ot a korábban leírtak alapján végeztük. Röviden, totál RNS-t izoláltunk Trizol segítségével a 7, 8, 9 és 10 napos agyaktól, valamint a 13, 15 és 17 napos embriók agyféltekéiből. A 30 µg totál RNS-ben a D2 detektálására a D2 kódoló régiójának 450 bázisával komplementer, digoxigeninnel (DIG) jelölt szimplaszálú cDNS próbát használtunk. A próbát lineáris PCR-ben az (5'-3') TGCACAATGCACACTCGCTC „antisense” oligonukleotidával és DIG-deoxiuridin 5-trifoszfáttal jelöltük. A denzitometriában kontrollként a 28S alegység etidium bromiddal jelölt gélekben nyert denzitását vettük alapul.

3.6. *In situ* hibridizáció

A módszert a 8 és 15 napos csirkeembriók és a 8 hetes csirkeagyak D2 mRNS ontogenetikus eloszlási vizsgálatában használtuk. Három darab 8 napos embriófejet, valamint három 15 napos és 8 hetes csirkeagyat szárzajégen gyorsfagyasztottunk és felhasználásig -80 fokon tároltuk. 12-µm vastag metszeteket készítettünk zselatinnal bevont tárgylemezre, 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-el fixáltuk, és a cD2 egész kódoló régiójához illeszkedő, kb. 840 bázispárnyi szimplaszálú DIG-11-uridin 5 trifoszfáttal jelölt cRNS próbával hibridizáltuk, majd mostuk és juhból származó anti-DIG alkalikus foszfatáz Fab fragmentummal (1:1000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) egész éjen át 4°C-on hibridizáltuk. Az alkalikus foszfatáz jelet 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfat/4 nitroblue tetrazolium kromogén rendszerrel (Roche Diagnostics) mutattuk ki, a gyártó előírásai alapján. A hibridizáció specifikusságát „sense” cD2 kódoló próbával igazoltuk, ami egyik vizsgált korcsoportban sem eredményezett specifikus hibridizációs jelet az agyban.

3.7. Mérések

3.7.1. Dejózáz aktivitás mérés

A mintákat 0,25M szacharózzal és 1 mM ditiotreitollal kiegészített, jéghideg PE pufferben homogenizáltuk [100 mM kálium foszfát, 1 mM etiléndiamintetraecetsav (EDTA) (pH 6,9)], és felhasználásig -80°C-on fagyaszta tároltuk. A mérésekhez 150-600 μg fehérje homogenizátumot használtunk 300 μl PE pufferben, amelyet kiegészítettünk különböző mennyiségű (1 vagy 100 nM) jelöletlen T₄-el és kb. 30.000 cpm Sephadex LH-20 tisztított, jelölt T₄-el valamint 20 mM DTT-vel. Az inkubálás 37°C-on 2 órán át tartott. A fehérje mennyiségét úgy állítottuk be, hogy a dejózáció 5 és 30% között maradjon. A reakciókat 200 μl lószérummal állítottuk le (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és 100 μl 50%-os triklórecetsavat használtunk a precipitációhoz. A jódot tartalmazó felülzót γ -mérővel mértük. Az aktivitásszintet fehérje milligramra vonatkoztatott egy órára eső femtomol dejózációban fejeztük ki. A teljes beütésszámot és a háttér homogenizátumot nem tartalmazó, üres csövek adataiból számítottuk ki. A $\Delta 77\text{cD2}$ fehérjét és a cD2 riportert alapú 5'UTR-t HEK-293 sejtekben expresszáltuk és a D2 aktivitásukat 2 nM T₄ jelenlétében teszteltük.

3.7.2. Luciferáz aktivitás mérés

A luciferáz aktivitást 20 μl sejtlyázumból mértük a Dual-luciferase Reporter Assay System segítségével (firefly luciferáz a *pTRE-TK-Luc*, *TK-Luc*, *TK-(dCpG)Luc*; *Renilla* luciferáz a *TK-Renilla-Luc-nál*). A *TK-NanoLuc* aktivitását 20 μl sejtlyázumból a Nano-Glo Luciferase Assay System-mel (Promega) mértük a gyártó előírásai alapján. A luciferáz aktivitást minden egyes transzfektált tenyésztőedényre külön megmértük. A Dual-luciferase Reporter Assay System felhasználásával minden edényből két párhuzamos mérést végeztünk és az egy edényre vonatkoztatott luciferáz aktivitást ezen mérések átlagával fejeztük ki. Valamennyi mérést Luminoskan Ascent Luminometer-rel (Thermo, Waltham, MA, USA) végeztünk.

3.7.3. Szérum alkalikus foszfatáz (SEAP) aktivitás mérés

A SEAP aktivitást 25 μl tápfolyadék Nova Bright™ SEAP Enzyme Reporter Gene Chemiluminescent Detection System 2.0-el (Invitrogen/Thermo) határoztuk meg. A SEAP-ot normalizálásra használtuk oly módon, hogy a Firefly luciferáz (Luc)/SEAP vagy *Renilla* luciferase (Renilla)/SEAP fényegység hányadosokat képeztünk minden tenyésztőedényre. A kísérleteket legalább nyolcszor megismételtük és átlag \pm SEM-ben fejeztük ki.

3.8. Statisztika

A dejózáz mérések statisztikai kiértékelését egyutas variancia analízissel (ANOVA) végeztük, amelyet Newman-Keuls poszthoc-teszt követett. Az *in situ* hibridizáció integrált denzitás

értékeinek összegét és a luciferáz mérések statisztikai analizisét kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze, 95%-os konfidencia intervallum alkalmazásával.

3.9. Szekvenciák

A $\Delta 77cD2$ kódoló régiójának szekvenciáját elhelyeztük a GenBank-ba (azonosítási szám: AF401753).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A PMH elérhetőség vizsgálata fejlődő csirkeagy hipotalamuszában

Az alábbi célokat tűztük ki:

- a D2 mRNS expressziójának vizsgálata csirkeembriók agyában a pajzsmirigy működés beindulása előtt és után
- a fejlődő csirkeagy D2 enzimaktivitással jellemezhető PMH aktiváló kapacitásának vizsgálata
- a D2 mRNS expressziójának sejttípus-specifikus eloszlása csirkeembriók és felnőtt csirke agyában

4.1.1. *A D2 mRNS expresszió vizsgálata fejlődő csirkeagyban RT-PCR és Northern blot segítségével*

A D2-t kódoló mRNS transzkriptum a 7-15. embrionális nap között valamennyi vizsgált fejlődési stádiumban kimutatható volt az mRNS kódoló régióját amplifikáló RT-PCR-rel intront átívelő oligonukleotidakkal. Mivel az agyféltekék és a köztiagy a 13 és 15 napos embriók esetében elválasztható volt az agytörzstől és a kisagytól, így lehetőség nyílt ezen régiók elkülönített tanulmányozására. A PCR termék mérete pontosan megegyezett a vad-típusú cD2 transzkriptumával (GenBank AF125575), ami azt bizonyítja, hogy az agyfejlődésnek ebben a szakaszában a hasított D2 mRNS variáns nem expresszálódik olyan mértékben, ami egy nagyérzékenységű PCR alapú módszerrel kimutatható lenne. Ezt követően Northern blotot alkalmaztunk a 7-17 napos fejlődő csirkeembriók agyának cD2 mRNS mennyiségének meghatározására. A 10. embrionális naptól kezdődően egyetlen, a várt mérettel megegyező (~6 kb, GenBank AF125575) transzkriptumot lehetett azonosítani digoxigeninnel jelölt cD2 mRNS kódoló régióra specifikus próbával. A vizsgált periódusban a D2 expresszió intenzív növekedését észleltük, amelyet a D2/28S denzitás arányok növekedése fémjelzett (0,5; 2,1; 5,2 és 7,3 a 10., 13., 15. és 17. embrionális napokon), a denzitás méréshez az etídium bromiddal festett 28S riboszomális alegységet vettük alapul.

4.1.2. *D2 aktivitás a fejlődő csirkeagyban (7-15. embrionális napokon)*

Annak érdekében, hogy még pontosabb képet kapjunk a fejlődő agy PMH aktiváló kapacitásával kapcsolatban, megmértük a D2 enzim aktivitását is. A D2 aktivitást a 7. embrionális naptól lehetett kimutatni (54 fmol/óra/mg). A 13. naptól szignifikáns növekedést tapasztaltunk ($p < 0.001$ egyutas ANOVA-vát követő Newman-Keuls poszthoc teszttel), az aktivitás a 15. napon volt a legnagyobb, 148 fmol/óra/mg értékkel. A 13 és 15 napos embriók agyában (amelyek esetében a féltekék és köztiagyak, valamint az agytörzs és kisagyminták

elkülönített mérésére nyílt lehetőség) nem volt szignifikáns különbség a D2 aktivitások között. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk, hogy a mért 5' dejudáz aktivitás D2 eredetű, frakcionális dejudációs mérést végeztünk, kihasználva a D1 és D2 enzimek nagymértékben eltérő szubsztrát-érzékenységet. Az igen különböző T_4 K_m miatt 100 nM T_4 szupresszálja a D2 aktivitást, de nem befolyásolja a D1 enzim aktivitását. E módszer segítségével megállapítottuk, hogy a mért 5' dejudáz aktivitásnak csak nagyon kis része származhatott a D1-től, mert a T_4 szaturációs mérés során az agyhomogenizátum $[^{125}I]T_4$ dejudációja erősen csökkent 100 nM jelöletlen T_4 hozzáadására, minden egyes vizsgált fejlődési stádiumban. Abban az esetben, amikor 100 nM T_3 -at és 1 mM PTU-t használtunk (a D3 aktivitás kizárása érdekében), a dejudáció csak mérsékelten változott. Az aktivitás 13 és 15 napos mintákban volt a legmagasabb a 7 és 8 napos embriókhoz képest ($p < 0.01$ egyutas ANOVA-val, amelyet Newman-Keuls teszt követett). A bemutatott enzimaktivitás vizsgálatok egyértelműen megerősítették, hogy a csirkeembriók agyában valós D2 aktivitás van jelen, amely a fejlődés során növekvő aktivitást mutat.

4.1.3. A D2 mRNS megoszlása a fejlődő csirkeagyban

A D2 expresszió sejtszintű tanulmányozásához *in situ* hibridizációt alkalmaztunk a célból, hogy a D2 mRNS jelenlétét a fejlődő agyban azonosíthassuk. A 8 napos csirkeembriók agyában elszórt sejtcsoportokban csak igen gyenge D2 hibridizációs jelet figyeltünk meg D2 kódoló régióra specifikus digoxigeninnel jelölt próbával. A 8. embrionális naphoz képest a jel erőssége az agyban fokozódott perivascularis jellegű sejtcsoportokban. A harmadik agykamra falát bélelő ependyma sejtekben nem láttunk D2 hibridizációs jelet.

4.1.4. D2 mRNS megoszlása felnőtt csirkeagyban

A felnőtt csirkeagyban nem találtunk hibridizációs jelet a harmadik agykamra falának elülső részén és az oldalsó agykamrákban. Az eminencia mediana elülső részénél a harmadik agykamra alapját bélelő ependyma sejtek egy csoportja pozitív volt D2-re. Kiemelendő, hogy egy hátrább helyeződő szegmensben a D2-t expresszáló sejtek a kamrafal alsó felét-harmadát borították. A jelölt ependyma sejtek megoszlási mintázata hasonlított a tanicítákéra. A D2 hibridizációs jel egyéb agyterületeken hasonló sejtcsoportokban fordult elő, mint a 15 napos embriók esetében, de a jel intenzitása jelentősen csökkent [15 napos embrió vs. felnőtt (integrált denzitás egység) $15,90 \pm 0,23$ vs. $3,34 \pm 1,23$, $p = 0,0043$]. Erős D2 jelet lehetett megfigyelni a neostriatum izolált sejtjeiben.

4.2. A kettes típusú dekodázt (D2) kódoló *dio2* gén RNS függő poszttranszkripció szabályozásának megértése

Célunk volt, hogy megértsük az mRNA szerkezet szerepét a *dio2* gén szabályozásában a PMH aktiváció során. Érdeklődésünk az alternatív hasítás, továbbá a D2 mRNA 5' UTR-jének a D2 aktiválásának szabályozásában betöltött szerepére terjedt ki.

4.2.1. *Egy alternatíván hasított csirke D2-öt kódoló transzkriptum klónozása és jellemzése*

A D2 mRNA és enzimaktivitás szintek egyes szövetekben eltérőek. Ezt jól szemlélteti, hogy bár a ~6.1 kilobázisnyi D2 mRNA mennyisége megegyezik a csirke agyban és a májban, ennek ellenére a D2 aktivitás az agyban mintegy 2,6-szor magasabb, mint a májban (408 vs. 156 fmol T₄/óra/mg fehérje). Ezért feltételeztük, hogy a D2 aktivitás változásában poszttranszkripcionális jelenségek, például az mRNA alternatív hasítása is szerepet játszhat. Feltételeztük, hogy kismértékben eltérő méretű, rutin módszerekkel nem kimutatható, megváltozott aktivitású D2 fehérjét kódoló D2 mRNA variánsok szövetspecifikusan befolyásolhatják a D2 aktivitást. Ezért RT-PCR-rel D2-t kódoló mRNA-eket izoláltunk csirke agyféltekékből és májból. Az amplifikált fragmentumokat plazmidokba klónoztuk és szekvenáltuk. Ezzel az eljárással egy olyan cD2 mRNA-t azonosítottunk, aminek kódoló régiójából 77 bázispár hiányzik a D2-t kódoló *dio2* gén exon/intron csuklója mellől. Az új hasított cD2 mRNA variáns szekvenciáját elhelyeztük a GenBank-ba (azonosítási szám: AF401753). A $\Delta 77cD2$ -t kódoló mRNA-t kísérletesen teszteltük. A hasított kódoló régiót D10 expressziós vektorba illesztettük és tranziensen transzfektáltuk HEK-293 sejtekbe. Megállapítottuk, hogy a $\Delta 77cD2$ mRNA inaktív D2 enzimet kódol. A hasítás által kiváltott deléción a cD2 kódoló régió olvasási keretét átállította. A $\Delta 77cD2$ DNS-ből levezetett aminosavszekvenciája egy csonkolt D2 fehérjére utalt, ami az aktív centrumtól N terminális irányban csonkoldódik. Ezt követően az volt a célunk, hogy meghatározzuk a $\Delta 77cD2$ és a vad típusú cD2 mRNA arányát a májban és az agyban. Egy olyan PCR-alapú detekciós rendszert állítottunk össze, amely alkalmas a vad típusú és a hasított D2 transzkriptum egyidejű kimutatására ugyanabban a reakcióban. Ez az eljárás alkalmas a vad-típusú és a hasított amplikonok szemikvantitatív kimutatására, mivel ugyanazok az oligonukleotidák ugyanabban a PCR reakcióban állítják elő a termékeket. Ezzel a rendszerrel a vad típusú és a $\Delta 77cD2$ mRNA koexpresszióját igazoltuk a csirke agyféltekében és májban. A májban a vad típusúhoz képest a hasított változat nagyobb mennyiségben volt jelen, míg az agyféltekék esetében ez az arány fordított volt.

4.2.2. *A csirke D2 mRNS 5' UTR funkcionális szerepének vizsgálata*

A D2 mRNS 5' UTR-e szokatlanul hosszú, ezért feltételeztük, hogy szerepe lehet a D2 aktivitás szabályozásában. Csirke D2-t kódoló riportert használtunk annak meghatározására, hogy ez az mRNS régió hogyan befolyásolja a D2 enzim aktivitását HEK-293 sejtekben. A csirke D2 5' UTR a cD2 enzim aktivitását ötödére csökkentve jelentős gátló hatást fejtett ki. Célunk volt, hogy a gátló hatás hátterében lévő molekuláris folyamatokat jobban megértjük. A D2 5'UTR rövid nyitott olvasási kereteket (sORF) tartalmaz, ez a jelenség az összes ismert D2 5' UTR-ben megfigyelhető. Először szekvenciaanalízist végeztünk, hogy meghatározzuk melyik sORF tartalmaz Kozak konszenzus szekvenciát, azaz -3 pozícióban purint (A vagy G), ami eukariótákban a hatékony translációs iniciáció elengedhetetlen feltétele. Szekvenciaanalízissel feltártuk, hogy a csirke 5' UTR négy sORF-je közül csak a transzkripció indítóhelytől számított második sORF (cORF-B) felel meg ennek a feltételnek. Ezért az izolált cORF-B gátló hatását funkcionálisan teszteltük a már korábban említett HEK-293 expressziós rendszerben. A cORF-B a D2 aktivitást 60%-kal csökkentette. Fontos kiemelni, hogy az ATG kezdő kodon pontmutációval történő deléciója a cORF-B D2 aktivitást gátló hatását teljesen megszüntette. Ez a megfigyelés igazolta, hogy translációs iniciáció történik a cORF-B-nél és ez a mechanizmus részt vesz a D2 aktivitás 5' UTR-függő csökkentésében.

4.3. *A T₃-függő géntranszkripció pontos mérésére alkalmas riportert fehérjék azonosítása*

A firefly luciferáz T₃-által kiváltott promóter-független aktivitáscsökkenése a PMH-függő transzkripció vizsgálatok komoly gátlóját képezi. Az volt a célunk, hogy olyan luciferáz riportereket azonosítsunk, amelyek a klasszikus firefly luciferáznál kevésbé érzékenyek a T₃-által kiváltott, promóter-független expresszió csökkenésre. Ugyanazon minimál TK promóterrel meghajtott emlős expressziós vektorokat készítettünk. Ezzel lehetővé vált, hogy olyan promóterfajtával végezzünk kísérleteket, amelyet a T₃ kezelés ismerten nem befolyásol, így az egységesített promóter kialakítás segített a promóter-függő T₃ válaszkülönbségek különböző konstrukciókban történő kiküszöbölésében. Kontrollként JEG-3 sejteket transzfektáltunk *pTRE-TK-Luc*-cal, illetve *TK-Luc firefly luciferázzal*, mTR α jelenlétében. Amint az várható volt, a *pTRE-TK-Luc* luciferáz aktivitása háromszorosára nőtt 50 nM T₃ hatására, ugyanez a kezelés a TRE-t nem tartalmazó *TK-Luc* riportert esetében az aktivitást ~60%-kal csökkentette. A SEAP konstrukció választát a transzkripció hatékonyság monitorozására használtuk és fontos kiemelni, hogy a T₃ kezelés nem befolyásolta a SEAP belső kontroll szintjét (SEAP szint a *pTRE-TK-Luc* tenyésztőedény lyukakban -T₃: 0,97 \pm 0,078

vs. +T₃: 0,79±0,084) /átlag±SEM; n=14, p=0,13 t-tesztel/; SEAP szint a *TK-Luc* lyukakban - T₃: 0,86±0,105 vs. +T₃: 0,76±0,057 /átlag±SEM; n=8, p=0,4 t-tesztel/). Ebben a jól jellemzett rendszerben különféle luciferáz riporterek T₃-ra adott válaszát teszteltük olyan konstrukciókkal, amelyek nem tartalmaztak TRE-t a promóter szekvenciától 5' irányban. Kiemelendő, hogy a szintetikus firefly luciferázt kódoló *TK-(dCpG)Luc*-ra nem volt hatással 50 nM T₃ hozzáadása. A *TK-NanoLuc luciferáz* aktivitása enyhén csökkenő tendenciát mutatott ugyan, de a változás nem volt statisztikailag szignifikáns. Másfelől, az 50 nM T₃ kezelés szignifikánsan csökkentette (~30%-kal) a *TK-Renilla-Luc*-ot expresszáló tenyészetek aktivitását.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az embrionális és felnőtt csirkeagy D2-függő PMH aktivációjának jobb megértését tűztük ki célul. A D2 mRNS már a 7. embrionális naptól kezdődően kimutatható volt amit D2 enzimaktivitás jelenléte kísért. Bizonyítottuk, hogy a D2 mRNS a 8. embrionális naptól kezdve elszórt sejtsoportokban van jelen és a jel erősebbé válik a 15 napos embriók hipotalamusának és neostriátumának megnyúlt perivaszkuláris sejtsoportjaiban. A felnőtt csirkeagyban a D2 jelet mutató sejtek átrendeződését figyeltük meg, azaz tanicitákra emlékeztető jelölt ependyma sejteket detektáltunk a harmadik agykamra falában, ugyanakkor az agy más területein a jel erőteljes csökkenését tapasztaltuk. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a fejlődő csirkeagy már nagyon korai stádiumban képes a tiroxin prohormon aktiválására, jóval korábban, mint ahogyan a pajzsmirigy hormonszекреciója elkezdődik. A D2 megoszlási mintázata az agyfejlődés folyamán változik, ontogenikusan szabályozott, és hozzájárul a megfelelő T_3 szintek beállításához a központi idegrendszerben. Megfigyeléseink megkérdőjelezik azt az elképzelést, miszerint a PMH hatás minimalizált a proliferatív fázisokban és arra utalnak, hogy indokolt lehet azon álláspont újragondolása, miszerint a fejlődő központi idegrendszer a minimális T_3 elérhetőségre törekszik.

Bizonyítottuk a D2 mRNS alternatív hasításának szerepét a D2-t kódoló *dio2* gén poszt-transzkripció szabályozásában. Azonosítottunk és funkcionálisan jellemeztünk egy új alternatíván hasított D2 mRNS-t csirkeagyban és májban. Ez a transzkriptum 77 bázispárral rövidebb a vad-típusú D2 mRNS-nél és inaktív dehidrogenáz enzimet kódol. Eredményeink azt jelzik, hogy az alternatív hasítás azon mechanizmusok egyike, amelyek befolyásolják egy adott szövet D2 szintjét. Eredményeink azt is megerősítik, hogy csupán a D2 mRNS szint meghatározása félrevezető lehet különböző szövetek D2 enzimaktivitás szintjének megítélésében. Ezenkívül igazoltuk, hogy a D2 mRNS 5'UTR-je csökkenti a D2 aktivitást és ennek hatásnak a háttérben sORF alapú translációs iniciáció húzódik meg. Ez a mechanizmus segít a D2 fehérje translációját alacsonyan tartani, ami hozzájárul e T_3 előállító, nagy aktivitású oxido-reduktáz szigorú szabályozásához.

Az általánosan elfogadott nézet szerint a T_3 biológiai hatásait elsősorban magreceptorokon keresztül, transzkripcionálisan fejt ki. A PMH jelátvitel tanulmányozásában ennek a mechanizmusnak a kísérletes vizsgálata kritikusán fontos. Azonban a T_3 hatással van a firefly luciferáz riporter szintjére és ez a jelenség jelentősen gátolja e vizsgálatokat. Eredményeink rámutatnak, hogy a dCpG luciferázt és a NanoLuciferázt a T_3 nem képes negatívan szabályozni. Ez lehetővé teszi a PMH-függő génexpresszió transzkripció szabályozásában szereplő tényezők pontos tanulmányozását különböző, riporter-alapú rendszerekben.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A tézis alapjául szolgáló saját közlemények listája

Kollár A, Kvártá-Papp Zs, Egri P, Gereben B (2016) Different types of luciferase reporters show distinct susceptibility to T3-evoked downregulation. *Thyroid*, 26: 179-182.

Gereben B, Pachucki J, **Kollár A**, Liposits Z, Fekete C (2004) Ontogenic redistribution of type 2 deiodinase messenger ribonucleic acid in the brain of chicken. *Endocrinology*, 145: 3619-3625.

Gereben B, **Kollár A**, Harney JW, Larsen PR (2002) The mRNA structure has potent regulatory effects on type 2 iodothyronine deiodinase expression. *Molecular Endocrinol*, 16: 1667-1679;

Gallus gallus type 2 iodothyronine 5'-deiodinase splice variant mRNA, complete cds, alternatively spliced. Deposited to GenBank under Accession #AF401753.

6.2. Egyéb publikációk

Gereben B, **Kollár A**, Bartha T, Buys N, Decuypere E, Rudas P (1998) 3,3',5-Triiodothyronine (T₃) uptake and expression of thyroid hormone receptors during the adaptation to hypothyroidism of the brain of chicken. *Acta Vet Hung*, 46: 473-485.