

Pajzsmirigyhormon jelátvitel a központi idegrendszerben és a periférián

Doktori értekezés tézisei

Mohácsik Petra Tímea

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
Magyar Tudományos Akadémia



Témavezető: Gereben Balázs Ph.D., D.Sc.

Hivatalos bírálók: Ábrahám István Ph.D., D.Sc.

Dohán Orsolya Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Alpár Alán Ph.D., D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Jancsik Veronika Ph.D.

Puskár Zita Ph.D.

Budapest
2016

I. BEVEZETÉS

A pajzsmirigyhormonok (PMH) számos alapvető biológiai folyamat, pl. a metabolizmus, idegrendszeri fejlődés és működés, növekedés, stressz és a szaporodás létfontosságú szabályozói. A napi PMH termelés a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP) tengely szigorú szabályozása alatt áll, aminek célja a szérumban T3 szintek élettani tartományban tartása. A HHP tengely központi szabályozói, a hipofízis-tirotropin-releasing hormon (TRH) neuronok a patkány hipotalamusz paraventriculáris magjának (PVN) mediális parvocelluláris és periventriculáris almagjaiban helyezkednek el. A TRH neuronok axon termináljai az eminentia mediana (EM) külső zónájába nyúlnak, ahol a fenesztrált portális kapillárisokba szekretálják a TRH peptidet, ami ezután az első hipofízis-tirotrópjait elérve serkenti a pajzsmirigy stimuláló hormon (tirotropin, TSH) elválasztását a perifériás keringésbe és ezáltal stimulálja a pajzsmirigy folliculáris sejtjeit. Az emberi pajzsmirigy főként tiroxint (T4) termel, és csak kis mennyiségben bocsát ki trijód-tironint (T3). A biológiai hatás kifejtéséhez a T4 prohormonnak T3-á kell alakulnia, mert csak ez a forma képes hatékonyan kötődni a PMH receptorokhoz (TR). A PMH a HHP tengely különböző szintjein negatív visszacsatolással szabályozzák saját termelődésüket. A PMH szérumban szintje viszonylag stabilnak tekinthető, de hatásukat jellemzően a szövetekben fejtik ki, ahol a PMH jelátviteli szövet és sejtspecifikus helyi igényekre történő szabását egy összetett lokális szabályozórendszer végzi. E rendszer része a lokális PMH elérhetőséget szabályozó PMH transzporter-mediált PMH felvétel, a dehidrogénáz enzim család által szabályozott PMH metabolizmus (aktiváció és inaktiváció), illetve a PMH jelátviteli szabályozását befolyásoló PMH receptorok és koregulátorok.

A hipotalamuszban ezen szövet-specifikus rendszer szoros összefüggésben van a HHP tengely működésével. Az agyba a PMH közül elsősorban a T4 jut be, így lokális T3 képződés kritikus fontosságú az egyes agyterületeken végbemenő PMH jelátvitelhez. Az agyban a kettes típusú dehidrogénáz (D2)-mediált PMH aktiváció és a hármas típusú dehidrogénáz (D3)-katalizált inaktiváció térben elválasztva zajlik a gliális sejtekben és neuronokban. A hipotalamusz fő D2-t expresszáló, T3 előállító sejtjeit a harmadik agykamra falát és alját bélelő specializált glia sejtek, a taniciták képezik. Bár a hipofízisotrop TRH neuronok sejttestjei a tanicitáktól távolabb, a PVN-ben találhatóak, de axon termináljai és a taniciták nyúlványai egymáshoz közel helyezkednek az EM-ban, így a TRH neuronok ezen a területen kapcsolatba léphetnek a tanicita eredetű T3-al. Az EM fontos szerepet tölt be más hipofízisotrop neuroszekretoros neuronok, pl. a gonadotropin- (GnRH), kortikotropin- (CRH), növekedési hormon- (GHRH)

releasing hormon és szomatosztatin neuronok (SST) szabályozásában is, melyek axon terminálisai szintén ebbe a régióba nyúlnak és a PMH jól ismert célpontjait képezik.

A PMH normál szintje a vérben a fejlődés során egy referencia érték, az ún. „set point” beállításával rögzül és ennek eredményeképpen a tengely a keringő T3 szinteket a kívánt tartományban tartja. Habár a „set point” kialakulás időszaka alatt a PMH szintek szigorú szabályozása kritikusan fontos és hatása az egész élettartamra kiterjed, az ennek háttérében álló mechanizmusok nagyrészt feltáratlanok. A rágszáló modellek nem jó alternatívái a humán HHP tengely fejlődését célzó kutatásoknak, hiszen tengely fejlődési kinetikájuk merőben eltér egymástól, mivel a rágszálók HHP tengelye alacsony fejlettségi fokot ér el a születés időszakára. Ezzel ellentétben a csirkék viszonylag jól fejlett HHP tengellyel rendelkeznek a kelés idején és az embriók egyesével, közvetlenül kezelhetők a tojásokban. Hasonlóan a rágszálókhoz, a csirke egyedfejlődés során a HHP tengely működésének kezdete megelőzi a PMH-mediált negatív visszacsatolás kialakulását. A PMH aktiváló D2 és inaktiváló D3 enzimek szabályozzák a hipotalamikus T3 elérhetőséget, ezáltal potenciális szabályozói lehetnek a TRH neuronokon kialakuló visszacsatolásnak, azonban jelenleg ezen folyamat fejlődéstani vonatkozásait alig ismerjük.

Az „alacsony T3 szindróma” patogenezisének és a barna zsírszövet (BAT) nem remegéssel járó hőtermelés (NST) mechanizmusának feltárásában a szövet- és sejttípus-specifikus PMH jelátvitel szabályozása különösen intenzíven tanulmányozott területté vált. A TRH neuronok visszacsatolás általi szabályozását humorális és neuronális inputok írhatják felül különböző speciális körülmények és kihívások, pl. éhezés, hideg hatás, fertőzés során. Az „alacsony T3 szindróma” jellemzően kritikus állapotú betegekben jelentkező körkép, ami egyben a HHP tengely megváltozott szabályozásának markáns példájául is szolgál. Ebben az állapotban a csökkenő szérum TSH és PMH szintek ellenére a HHP tengely aktiválódása nem következik be. A megváltozott PMH jelátvitel szabályozásának részletes vizsgálata nélkül a szindróma természetének és potenciális kezelési lehetőségeinek feltárása nem végezhető el. A szindróma mechanizmusát célzó kutatások gyakran használt modellje rágszálókban a bakteriális lipopoliszacharid (LPS) indukált szisztémás gyulladás.

A BAT az elhízással kapcsolatos kutatások előterébe került, ugyanis rágszálókban, valamint újszülött és felnőtt emberekben alapvetően fontos szerepet játszik az NST során felszabaduló energia leadásában. Hideg hatására a hipotalamusz a szimpatikus idegrendszeren keresztül aktiválja a BAT-ot, melynek eredményeképpen az uncoupling fehérje-1 (UCP-1) szétkapcsolja a mitokondriális terminális oxidációt és a felszabaduló energia hő formájában leadásra kerül. Hidegstressz során a PMH és noradrenalin (NA) jelátvitel együttesen felelős a lipogenezisért, a

lipid mozgósításáért és a hőfelszabadulás szabályozásáért. A hideg kiváltott, D2-mediált lokális T3 képzés növekedése elősegíti a trigliceridek felszabadulását a sejt raktáraiból, gyorsítja a cAMP választ és fokozza az UCP-1 expressziót. A BAT PMH jelátvitel szabályozásának mélyebb megismerése alapvető szerepet játszik az elhízás kezelésére szolgáló terápiás célpontok azonosításában.

II. CÉLOK

Vizsgálataink a szövetspecifikus PMH jelátvitel szabályozásának jobb megértését célozták. Részletezve célunk volt

1. tanulmányozni miként alakul ki a HHP tengely negatív visszacsatolása
 - meghatározni a PMH-mediált negatív visszacsatolás kialakulásának időszakát a fejlődő csirke hipotalamuszban
 - azonosítani olyan mechanizmusokat, amelyek a „set point” kialakulását irányítják
2. tanulmányozni a hipotalamikus neuroendokrin tengelyek PMH elérhetőségének szabályozását
 - jellemezni a PMH inaktivációt patkány parvocelluláris neuroszekretoros neuronokban
 - feltárni, hogy hogyan változik a PMH elérhetőség szabályozása neuroszekretoros neuronokban „alacsony T3 szindróma” modellben
3. létrehozni egy új transzgénikus egérmodellt, ami lehetővé teszi a szövetspecifikus PMH jelátvitel vizsgálatát élő állatokban és szövetmintákban
 - jellemezni a Pajzsmirigyhormon jelátvitel indikátor egérmodellt (THAI-egér)
 - a modell felhasználásával tanulmányozni az „alacsony T3 szindróma” hipotalamikus patogenezisést és a lapockák közti BAT (iBAT) PMH szabályozását

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1.1 Kísérleti állatok

HHP tengely egyedfejlődési kinetikájának tanulmányozásához szükséges White Leghorn csirke embriókat és újszülött csirkéket a Ceva-Phylaxia (Budapest, Magyarország) és Wyverkens (Halle, Belgium) biztosította.

Újszülött csirkéket, felnőtt hím Wistar patkányokat, (testtömeg: 220–250 g) és az újonnan létrehozott pajzsmirigyhormon indikátor (THAI) egérvonalakat (FVB/Ant háttér) szabványos laboratóriumi körülmények között, szabad táplálék és ivóvíz hozzáféréssel tartottuk.

1.2 Rekombináns DNS technológia és kísérletek sejtenyészetekkel

A THAI DNS konstrukciót (THAIC) továbbá a csirke dekodáz promoter és az *in situ* hibridizációhoz alkalmazott RNS próbák készítéséhez szükséges rekombináns DNS konstrukciókat standard módszerekkel készítettük. A DNS darabokat Taq vagy Vent polimeráz enzimekkel, polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk, és plazmid vektorokba klónoztuk. Az így elkészült rekombináns DNS-t baktériumokba transzformáltuk, és a megfelelő klónt szelektációs antibiotikum jelenlétében, baktérium kultúrában szaporítottuk fel.

A csirke *Dio2* promoter Nkx2.1 válaszkészségének vizsgálatához U87 humán glióma sejtvonalat használtunk, a sejteket 10% FBS-el kiegészített DMEM-ben tenyésztettük és kalcium-foszfát precipitátum segítségével transzfektáltuk. A transzfekciót 24-lyukú tenyésztőedényben végeztük 1600 ng DNS/lyuk felhasználásával. Egy nappal a transzfekció előtt lyukanként 20.000 sejtet használtunk melyeket a transzfekció után 48 órával dolgoztunk fel.

A THAIC-HEK293T sejtvonal létrehozásához HEK293T sejteket 10% FBS-t tartalmazó DMEM tápoldatban tenyésztettünk, majd Lipofectamine 2000 reagens segítségével THAIC targeting DNS konstrukcióval és pcGlobinSB100 transzpozáztt kódoló vektorral transzfektáltuk, hogy elősegítsük a Sleeping Beauty rekombináns-mediált genomialis beépülést. A klónokat 150 µg/ml zeocin jelenlétében szelektáltuk. A felszaporított klónokat 24 órán át hormonmentesített FBS-ből készült tápban tenyésztettük, majd 24 órán át 100 nM T3-al indukáltuk tranziensen expresszált egér TR α jelenlétében.

1.3 pajzsmirigyhormon indikátor (THAI)-egérmodell létrehozása és jellemzése

A targeting-konstrukció létrehozásához a *Herpes simplex* vírus timidin kináz (TK) minimál promotertől 5' irányban három, a humán *DIO1* 5' határoló régióból származó, DR-4 pajzsmirigyhormon válaszfelem (TRE) kópiát klónoztunk. Ezt a DNS darabot egy kódon-optimizált és metiláció-rezisztens dCpG luciferáz-ShBle fúziós fehéjért tartalmazó firefly luciferáz kódoló régió elé klónoztuk, amelyet egy EF1 pAni poliadenilációs kazetta követ. A targeting-konstrukciót a pWHERE vektor H19 elválasztó szekvenciáival határoltuk és a pT2/BH vektor transzpozáz fordítottan ismétlődő terminális (ITR) szekvenciái közé klónoztuk. A transzgenikus egerek létrehozásához megtermékenyített FVB/Ant oociták pronukleuszába injektáltuk a targeting transzpozon kazettát tartalmazó plazmid és az *in vitro* átírt Sleeping Beauty transzpozáz mRNS-éből álló keveréket.

A három létrehozott vonal (#4, #18, és #23-as vonal) transzgen kópia számának meghatározását lépből sterilen izolált limfocitákon, fluoreszcens *in situ* hibridizációval végeztünk. A transzgen inzerció helyét genomiális DNS-en végzett Splinkerette PCR technikával térképeztük fel. Egy speciálisan tervezett, univerzális Splinkerette oligonukleotid használatával sokszoroztuk a transzgen kazetta 5' vége és az első genomiális BstYI restriktions hasító hely közötti szakaszt, amelyet szekvenálásnak vetettünk alá.

A vonalak fenotípusos karakterizálása során meghatároztuk a szérumban PMH szinteket, és a testtömeget, valamint a #4-es vonal, 11 hetes hím állatain indirekt kalorimetriás méréseket végeztünk metabolikus ketrecekben (PhenoMaster/LabMaster) és testtömeg összetétel analízist végeztünk EchoMRI teljes testtömeg összetétel analízátor segítségével.

1.4 Szisztémás PMH szintek módosítása és mérése

HHP tengely fejlődési kinetikájának tanulmányozásához 19 napos csirke embriókat (E19) és két napos újszülött (P2) csirkéket kezeltünk 1 µg T4, 200 ng T3 vagy kontroll állatok esetében vivőanyag (5mM NaOH fiziológiás só oldatban) intravénás beadásával (chorioallantois érbe vagy lábvérába injektálva), 8 órával mintavétel előtt.

Felnőtt hím Wistar patkányokat 8 napon keresztül, kétnaponta, intraperitoneálisan (*i.p.*) 50 µg T3/100 g testtömeg (N=9) vagy vivőanyaggal (N=9) kezeltünk, és mikrodisszektált EM mintáiból D3 enzim aktivitást mértünk.

A THAI-egerek szöveteinek PMH válaszkészségét *in vitro* szöveti lizátumban és *in vivo* élő állatokban is meghatároztuk, miután az állatok PMH státuszát T4-el (5 µg/nap/egér L-T4 vagy vivőanyag *i.p.* injekció 3 napig), T3-al (1 µg/ttg L-T3 *i.p.* injekció egy napig) vagy hipotiroid

(0.1% nátrium-perklorát és 0.5% metimazol itatóvízbe keverve jódt mentes táppal kombinálva, három hétig) kezeléssel moduláltak.

Szérum szabad T4 és T3 hormon szinteket AccuLite CLIA Microwells kit-el mértük, a gyártó utasításai szerint. A kit kompetitív kemilumineszcens enzim immunoassay módszeren alapuló mikroplate formátumú mérést tesz lehetővé.

1.5 LPS beadás, az „alacsony T3 szindróma” rágcsgáló modellje

Kettős immunofluoreszcens jelölésekhez (D3 és hipofiziotróp peptidek) 200g-os hím Wistar patkányokat kezeltünk 12 óráig LPS-el (250 µg/ 100ttg; E. coli 0127:B8, Sigma, *i.p.*), majd transzkardiális perfúzióval fixáltuk az agyakat. (lásd még: III/1.6).

THAI-egereket LPS-el kezeltük (150 µg/állat; E. coli 0127:B8, Sigma, *i.p.*) és az injekciót követő 6, 8 és 10 óra múlva dekapitáltuk. Az agyterületeket „punch” tű segítségével, előhűtött tárgylemezre helyezett, fagyott metszetekből mikrodisszektáltuk. A szövetek luciferáz és D2 vagy TRH expresszós szintjét (arkuátusz mag + EM vagy PVN) Taqman valós idejű PCR-rel analizáltuk.

1.6 Immunhisztokémia és in situ hibridizáció

Kontrol és LPS kezelt Wistar patkányokat TRH detekciójához 4% acrolein/2% paraformaldehid (PFA) fixáló szerrel, a GNRH, GHRH, CRH és szomatosztatin kimutatásához 4% PFA-val transzkardiálisan perfundáltuk. A metszeteken kettős immunofluoreszcens jelöléssel detektáltuk a D3 fehérjét és a különböző hipofiziotróp peptideket. Szabványos hisztológiai előkezeléseket követően a metszeteket éjén át, a megfelelő elsődleges antitesteket tartalmazó blokkoló oldatban inkubáltuk. Biotinilált D3 antitestet sztreptavidin-konjugált Alexa 488 másodlagos antitesttel mutattuk ki, míg a hipofiziotróp peptidek elsődleges antitestét a megfelelő fluoreszcens Cy3 konjugált másodlagos antitesttel detektáltuk. Az EM külső zónájából konfokális felvételeket készítettünk 60X olaj immerziós objektívvel, Radiance 2100 konfokális mikroszkóppal. Minden állat esetében az EM külső zónájából véletlenszerűen kiválasztott, 2600 µm²-es, területen számszerűsítettük a D3-al kolokalizáló hipofiziotróp peptid tartalmú axon varikozitások mennyiségét.

4% PFA-val fixált, 10 µm vastag patkány koronális metszeteken GnRH-t, D3-at vagy RAB3 markert mutattunk ki egyes immunofluoreszcens jelöléssel. Az EM külső zónájában elhelyezkedő axon varikozitásokról Nikon N-STORM szuperrezolúciós mikroszkóp rendszer segítségével felvételeket készítettünk és NIKON NIS szoftverrel festésenként 500 immunreaktív klaszter átmérőjét mértük meg.

D2, Nkx2.1, D3 és proTRH mRNS fejlődéstani expresszióját *in situ* hibridizációval tanulmányoztuk. 12µm, natív, koronális csirke agymetszeteket kriosztáton metszettük le és tárgylemezre vittük fel. Prehibridizálás után az előbb említett mRNS-ek egyikét éjjel át, 65°C-on hibridizáltuk 500-1000 bázispár (bp) hosszúságú, S³⁵-jelölt cRNS próbával. A radioaktív jelet az egyes RNS-nél különböző exponálási időekkel, Kodak Autoradiográfias Emulzióval detektáltuk. A proTRH *in situ* hibridizációs jelének denzitometriás analízise során megmértük az átlag ezüst szemcse sűrűséget az E19 és P2 csirke PVN fölött ImageJ szoftver segítségével.

1.7 Dejudációs assay

A D2 enzim aktivitás mérése *in vitro*, szöveti lizátumból történik és a I¹²⁵-jelölt T4 külső gyűrűjéről, D2 által, eltávolított szabad I¹²⁵ mennyiségének meghatározásán alapul. Ezt a módszert használtuk a D2 aktivitás meghatározására a fejlődő csirke hipotalamuszban és MBH-ban, illetve hidegstressz kezelt THAI-egerek iBAT mintáiban szimpatikus denerválás hatásának vizsgálatára. A fagyasztott szövetmintákat PE pufferben homogenizáltuk (0.1M kálium-foszfát, 1 mM EDTA (pH 6.9), 0.25M szukróz, 10 mM DTT). Minden reakcióba egységnyi fehérje mennyiséget és I¹²⁵-jelölt T4-et mértünk be, majd a reakció keveréket megfelelő időtartamig 37°C-on inkubáltuk. Ismert mennyiségű fehérje által, adott idő alatt lehasított szabad I¹²⁵ mennyiségét (a D2 aktivitását) gamma-mérő segítségével határoztuk meg.

1.8 Luciferáz enzim aktivitás mérés szövetmintákban és élő állatban

Firefly luciferáz enzim aktivitását *in vitro* sejt- és szövetlizátumból, határoztuk meg. A reakciót 96 lyukú plate-ben az enzim szubsztrátját, valamint ATP-t tartalmazó „Luciferase Assay Reagent” hozzáadásával indítottuk el és az enzimreakció során keletkező jelet Luminoskan Ascent luminométerrel detektáltuk. Ezzel a módszerrel mértük a U87 sejtenyészetben expresszált csirke *Dio2* promotor aktivitását Nkx2.1 transzkripciófaktor jelenlétében, illetve THAI-egér szöveteiben expresszált luciferáz aktivitását megváltozott szisztémás PMH szintek mellett.

Luciferáz enzim aktivitást T3 kezelt, eutiroid, hipotiroid, valamint hidegstresszelt (24 óra, 4°C) élő THAI-egérben IVIS Lumina II *in vivo* képalkotó rendszer segítségével kvantifikáltuk. Az élő állatokról ketamin-xylazin altatásban, 15 perccel az enzim szubsztrát, D-Luciferin (*i.p.* injekció, 150 és 750 µg/ttg, PBS-ben oldva a T3 kezelt és hidegstresszelt állatok esetében) beadása után készítettünk felvételeket, miután szűrőket eltávolítottuk az iBAT és a hasi szervek területéről. Az egyes szervekből származó fény mennyiségét, az egyes állatokról készített

felvételeken azonos méretű és alakú területekről (region of interest= ROI) szoftver segítségével mértük meg és hasonlítottuk össze.

1.9 *Taqman valós idejű kvantitatív PCR*

Génexpressziós változások mértékét Taqman valós idejű PCR reakciókkal határoztuk meg natív, fagyasztott szövetekből. Vizsgáltuk az E19 és P2 csirkék hipofízisében TSH β mRNS expresszióját T3, T4 és vivőanyag kezelés hatására, THAI-egerekben az intakt és denervált iBAT D2 és luciferáz expressziójának változását hidegstressz során, valamint D2, luciferáz és TRH mRNS szint változásokat mikrodisszekált agyterületeken LPS kezelés hatására. Totál RNS-t fenol-kloroform alapú szilika-oszlopos tisztítással izoláltuk „RNeasy Lipid Tissue Mini kit” segítségével, a gyártó utasításai szerint. „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” segítségével 1 μ g totál RNS-t írtunk át egyszálú DNS-é, amelyből 10ng került minden egyes Taqman reakcióba. A reakcióhoz Thermo Fisher Scientific által tervezett és gyártott Taqman génexpressziós próbákat és „Taqman Fast Universal PCR Mastermix”-et használtunk. A génexpressziós értékeket GAPDH belső kontroll génhez viszonyítottuk.

1.10 *Statisztika*

Minden adatot átlag \pm SEM formátumban adtuk meg. A csoportokat kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze. Többszörös összehasonlításokat egy utas ANOVA-t követően Newman-Keuls vagy (3-nál több csoport esetében) Tukey post-hoc teszttel végeztük. Az iBAT denerválási kísérletek eredményeit összetartozó mintás varianciaanalízis (Repeated Measurements ANOVA) módszert követően Tukey post-hoc teszttel értékeltük ki.

IV. EREDMÉNYEK

1. Negatív visszacsatolás kialakulásának szabályozása a fejlődő csirke hipotalamuszban

1.1 *A csirke HHP tengely T4 indukált negatív visszacsatolása az E19 és P2 közötti időszakban alakul ki*

Elsőként a hipotalamikus negatív visszacsatolás kialakulásának időszakát kívántuk meghatározni ezért különböző fejlődési stádiumokban tanulmányoztuk a PVN proTRH expressziójának exogén T4 és T3-ra adott válaszát. *In situ* hibridizációval megállapítottuk, hogy az E19 korú PVN-ben a T4 nem gátolta szignifikánsan a proTRH expresszióját, ellentétben a P2-ben tapasztalt 25%-os csökkenéssel. A T4 kezeléssel ellentétben a T3 mind E19-ben, mind P2-ben (30 ill. 25%-al) csökkentette a csirke PVN proTRH mRNS szintjét. A hipofízis TSH β mRNS expressziója is hasonlóan korfüggő módon reagált T4 és T3 hatására; P2 állatokban 60% illetve 20%-al csökkentette a TSH β mRNS szintjét, de egyik kezelésnek sem volt hatása az E19 hipofízisben.

1.2 *A helyi PMH metabolizmus szerepe a hipotalamikus negatív visszacsatolás kialakulásában*

Az E19 PVN TRH expressziós válaszkészségének T4 és T3 kezelés után tapasztalt különbsége azt valószínűsítette, hogy a hipotalamikus pajzsmirigyhormon aktiváció és inaktiváció fejlődéstani változásai fontos résztvevői lehetnek a „set point” kialakításának. Elsőként a helyi PMH aktivációt végző D2 mRNS expresszióját vizsgáltuk izotópos *in situ* hibridizációval a fejlődő hipotalamuszban, a visszacsatolás kialakulása előtt és után. Jóval a „set point” kialakulása előtt, E13-ban kimutattuk a D2 mRNS jelenlétét, „posterior” hipotalamikus területeken β -tanicitáiban, illetve perivaszkuláris képletekben az egész hipotalamuszban. P2 korban a D2 mRNS expresszió megjelent az „anterior” területek β -tanicitáiban és kiterjedt az α -tanicitákra is, létrehozva egy expressziós mintázatot a harmadik agykamra ependima rétege mentén. A dejedációs enzimaktivitás mérésével vizsgáltuk a D2 aktivitásának alakulását mind az MBH-ban, mind az MBH-n kívüli hipotalamikus szövetekben, E15 E18 és P2 korban. E15 és P2 kor között D2 aktivitás 11.6-szoros növekedést mutatott az MBH-ban és jelentősen alacsonyabb, de szignifikáns 3.9-szeres növekedést ért el az MBH-n kívüli területeken.

Megvizsgáltuk a D3 mRNS expresszióját és fehérje szintjét is a visszacsatolás kialakulása előtt és után, de nem találtunk jelentős mennyiségi eltéréseket sem neuronokban, sem a rendhagyó módon D3-at expresszáló tanicitákban.

1.3 *Az Nkx2.1 mRNS expresszálódik csirke tanicitákban, de nincs jelen a perivaszkuláris képletekben*

Olyan faktorok azonosítását is megkíséreltük, amelyek szerepet játszhatnak a D2 expresszió fejlődéstani változásaiban. Mivel az Nkx2.1 olyan fejlődéstanilag jelentős transzkripciós faktor ami a humán DIO2 gén és több pajzsmirigy-specifikus gén transzaktiválója, így feltételeztük hogy a csirke D2 expresszió egyik potenciális szabályozója lehet az agy fejlődése során. *In situ* hibridizációval megmutattuk, hogy az Nkx2.1 és a D2 expresszió E13 és P2 korban is átfed a harmadik agykamra falában és aljában elhelyezkedő a tanicitákban, de az Nkx2.1 nincs jelen a D2-t expresszáló perivaszkuláris képletekben. Promoter vizsgálatot végeztünk U87 glióma sejteken annak megértése céljából, hogy a D2-t és Nkx2.1-et együttesen expresszáló csirke tanicitákban funkcionálisan működőképes lehet-e a *Dio2* gén Nkx2.1 általi transzkripcionális aktivációja. Nkx2.1 koexpresszió ~4-szeresen és 1.8-szorosan növelte *cDio2* promoter 3.6kb és 588bp hosszú 5' határoló régiójának transzkripciós aktivitását míg az üres pGL3-basic vektor nem adott választ. A használt, 3.6kb hosszú, *cDio2* 5' határoló régiót szekvencia analízisnek alávetve öt potenciális Nkx2.1 kötőhelyet azonosítottunk (transzkripcionális kezdő helyhez viszonyítva: -18, -2872, -2587: TCAAGG; -2321, -1671; TCAAGT).

2. **Pajzsmirigyhormon elérhetőség szabályozása rágcsáló hipotalamusz parvocelluláris neuroszekretoros neuronjaiban**

2.1 *A D3 megoszlása és sejten belüli elhelyezkedése patkány hipotalamuszban*

A neuronok nem képesek T3 előállításra és azt a glia sejtetől veszik fel. A T3 intracelluláris szintjének pontos beállításáért neuronokban a D3-mediált T3 inaktiválás felelős. Vizsgálni kívántuk, hogy hogyan működik ez a folyamat neuroszekretoros neuronokban. Fénymikroszkópos immunhisztokémiával vizsgálva a D3 elhelyezkedését, az immunreaktivitás egyenetlen eloszlásban, apró pontokként jelentkezett a hipotalamuszban. Legnagyobb sűrűségben az EM külső zónájában észleltük, ott ahol a hipofiziotróp axonok a portális kapillárisok körül csoportosulnak. A D3 immunreaktivitása az EM-ba vetülő területeken (pl. mediális preoptikus terület, PVN és arkuátusz mag) és a legtöbb hipotalamikus régióban jelen volt, bár itt kevésbé intenzív jelet detektáltunk, mint az EM-ban. Mivel a neuronok

perikarionjában nem találtunk D3 jelet, a jelek pontszerű jelenléte az EM-hoz hasonlóan ezekben a régiókban is az axonális lokalizációra enged következtetni.

Csoportunk korábbi ultrastrukturális vizsgálatai az axon varikozitásokban lévő D3-at „dense core vezikulák”-hoz (DCV) asszociáltan azonosították. Vizsgálatainkat D3 topológiájának az EM külső zónájában lokalizálódó DCV-ken történő pontos meghatározásával folytattuk. Egyes immunfluoreszcens jelölést N-STORM szuperrezolúciós mikroszkópiával vizsgálva megmutattuk, hogy a D3 C-terminális része 83.9 nm nagyságú immunreaktív klasztereket alkot melyek szignifikánsan nagyobbak mint a vezikula belsejét kitöltő, 65.6 nm-es, GnRH klaszterek, míg a DCV felszínét fedő RAB3 fehérjét jelölő immunreaktív klasztereket 81.4 nm-nek mértük. Tehát N-STORM mikroszkópiával bebizonyítottuk, hogy a D3 C-terminális aktív centruma a DCV külső felszínén kívül helyezkedik el és a citoplazmával érintkezik, ezért ez a határfelület lehet az axon terminálisok fő PMH inaktíváló szegmense. Patkány hipofiziotróp neuronok axonális kompartmentjeit tartalmazó mikrodisszekált EM mintákban D3 enzim aktivitást is találtunk ami igazolta, hogy a DCV asszociált D3 katalitikusan és funkcionálisan is aktív az axon terminálisokban, ráadásul az aktivitás mértéke 4-szeresére emelkedett hipertireózis hatására.

2.2 *D3-immunoreaktív hipofiziotróp terminálisok fenotípusa és D3 eloszlása a neuroszekretoros neuronokban patofiziológias körülmények között*

Az EM-ban lévő D3 tartalmú axon terminálisok fenotípusának meghatározásához kettős immunfluoreszcens jelölést követően konfokális mikroszkópiát használtunk és vizsgáltuk a D3 és hipofiziotróp releasing és inhibiting hormonok kolokalizációját. A D3 immunreaktív képletek kis szigetként jelentek meg az axon varikozitásokban. D3 immunreaktivitást mutattunk ki a GnRH (71.8±3.8%), CRH (63.2±7.5%), GHRH (64.2±2.7%) and TRH (26.6±5.0%) axon terminálisokban, főként disztális varikozitásokban és terminális szegmensekben. A TRH axonok alacsonyabb D3 tartalma szignifikánsan különbözött a GnRH, CRH és GHRH axonokban észlelttől, valamint a SST-immunreaktív varikozitásokban és magnocelluláris neuronokban nem találtunk D3-at.

Megmutattuk, hogy a monokarboxilát transzporter 8 (MCT8) PMH transzporter minden axon fenotípus esetében jelen van, így a T3 felvétele minden vizsgált hipofiziotróp axon terminális által lehetséges.

Ismert, hogy a D2-mediált PMH aktiváló kapacitás növekszik az MBH-ban LPS kiváltott „alacsony T3 szindróma” modellben. Célunk volt megvizsgálni, hogyan változik a parvocelluláris neuronok T3 lebontó kapacitása ebben a modellben, ezért 12 órával az *i.p.* LPS

injekciót követően megvizsgáltunk a parvocelluláris axon terminálisok D3 megoszlását. Az LPS szignifikánsan csökkentette a D3 pozitív varikozitások számát a GHRH (10%) és CRH (25%) tartalmú axonokban, ami csökkent T3 bontást és emelkedett T3 szintet valószínűsít ezen neuronokban. Ezzel szemben sem a TRH, sem a GnRH tartalmú axonok esetében nem történt változás. Az LPS kezelést követő változatlan axonális D3 tartalom és a változatlan számú MCT8 pozitív terminális a TRH neuronokon arra utal, hogy ezen neuronok sejten belüli T3 tartalmukat nem tudják számottevően befolyásolni, így a hipotalamusz T3 tartalmának követésére vannak programozva.

3. Pajzsmirigyhormon jelátvitel indikátor egérmódel létrehozása és jellemzése

3.1 Létrehozás

A PMH jelátvitel egy összetett molekuláris szabályozó mechanizmus eredője, ami magába foglalja a PMH transzportot, metabolizmust és a TR-mediált magi folyamatokat. Létrehoztunk egy PMH jelátvitel indikátor (THAI) egérmódellet, aminek segítségével emlősben, *in vivo* környezetben tanulmányozhatjuk a szövetspecifikus PMH jelátvitelt. A módellet felhasználtuk a hipotalamusz és a BAT PMH jelátvitelének vizsgálatára. Az egerek a szövetspecifikus PMH jelátvitelt firefly luciferáz riporter gén expressziójával jelzik, amit a humán DIO1 gén promotereből származó TRE válaszlemek tripletje tesz PMH érzékennyé. (A targeting DNS konstrukció részletes leírását ld. a III/1.2-ben.) A targeting DNS konstrukció genomba juttatását *in vitro* átírt Sleeping Beauty transzpozáztt kódoló mRNS jelenlétében pronukleáris injektálással végeztük.

Három transzgenikus egérvonalat hoztunk létre (#4, #18 és #23). Fluoreszcens *in situ* hibridizációval kimutattuk, hogy a homozigóta egyedek minden vonal esetében két kópia THAI transzgent tartalmaznak azaz a „founder” egyedekbe egy kópia épült be. Mindhárom vonal szérum FT4 és FT3 szintje alapján eutireóta továbbá testtömege sem különbözik a vad-típusétól. Splinkerette PCR-el megmutattuk, hogy a riporter kazetta a #4-es THAI vonal esetében az L1 repeat családba tartozó genomiális régióba illeszködött be, így nem változtatta meg egyetlen endogén gén szerkezetét sem. Ennek megfelelően az állatok semmilyen azonosítható fenotípust nem mutattak és a #4-es THAI állatok esetében a PMH státusztól erősen függő szisztémás paraméterek (zsírmentes testtömeg, zsírtömeg, légzési hányados /RER/, oxigén fogyasztás /VO2/) sem különböztek szignifikánsan a vad-típusú kontroll állatokéitól.

3.2 THAI-egervonalak PMH válaszkészségének jellemzése

Megváltoztatott PMH státuszú homozigóta hím THAI egerek különféle szöveteiből vett mintákat luciferáz aktivitás mérésével vizsgáltuk. A különböző szövetekben mért alap luciferáz aktivitás széles skálán mozgott minden vonalnál. Hat nagyságrendnyi különbséget találtunk a máj és a here esetében, de a legtöbb szövet értékei két nagyságrendnyi intervallumba estek. Ezek a különbségek valószínűleg a transzgen DNS inzerciós helyének sejt specifikus, alap transzkripcionális aktivitását tükrözik. A #4-es vonal szöveteinek PMH válaszkészsége nagy változatosságot mutatott L-T4 hatására, tekintve, hogy a here 0.8-szoros, az agyterületek (hipotalamusz, hipokampusz, kisagy és agykéreg) 1.5-2-szeres luciferáz aktivitás emelkedést mutattak, míg az iBAT 64-szeres indukciót jelzett. Ezen kívül erősen érzékeny szövetek voltak a vázizom, szív, nyálmirigy és bőr (4-11-szeres emelkedés). A PMH érzékenységi mintázata a másik két vonal esetében különböző volt, ugyanis a #23-as vonalban az iBAT már csak ~7-szeres növekedést mutatott L-T4 hatására, amíg a #18-as vonalban nem volt detektálható aktivitás ebben a szövetben. A #23-as és a #18-as vonal erős PMH válaszkészséget mutatott a hipofízisben, illetve a #18-as vonal esetében mértük a legmagasabb agyi riporter alapaktivitás értékeket.

Az adatok ismeretében elmondható, hogy #4-es vonal a szövetek széles skáláján nyújt lehetőséget a PMH jelátvitel tanulmányozására, míg a másik két vonal további lehetőségeket tartogat speciális esetek vizsgálatára, amikor előnyös a hipofízis nagyobb PMH érzékenysége (#18 és #23), vagy a magasabb agyi riporter alapaktivitás (#18).

A #4-es THAI-egervonal estében PMH jelátvitel válaszkészségét megvizsgáltuk csökkent PMH szintek mellett is. A hipotiroiddá tett állatokban a luciferáz aktivitást számos szövet és agyterület lizátumában vizsgáltuk. Megközelítőleg 2-3-szoros PMH jelátvitel csökkenést mértünk különböző agyterületeken (pl. hipotalamusz és agykéreg), májban és fehérvérsejtekben, míg 4-6-szoros csökkenést észleltünk az iBAT-ban, hipofízisben, szívben és csontban, valamint 10-szeres csökkenést a vékonybélben. Tehát a THAI-egér számos szövetében jól detektálhatók a hipotiroidizmus szövetspecifikus tulajdonságai.

3.3 A PMH jelátvitel élő THAI-egérben

A PMH jelátvitel élő állatban is vizsgálható *in vivo* biolumineszcens képalkotó eljárással a THAI-egér bizonyos szöveteiben, pl. az iBAT-ban, a vékonybélben, nyálmirigyben, bőrben és a *saccus caecum*-ban. Hipo- eu-, és hipertiorid (#4 vonalba tartozó) egereket altatásban, 15 perccel D-luciferin *i.p.* beadást követően vizsgáltunk. A hipotiroidizmus ~80%-al csökkentette a luciferáz aktivitást a duodenumban és jejunumban, valamint 24 órával a felvétel készítését

megelőzően adott egyszeri L-T3 injekció 9-szeresre növelte az iBAT és 3-szorosra a vékonybél luciferáz aktivitását, és csak kisebb mértékben növelte az enzim aktivitást a talppárnák és a farok bőrében.

3.4 THAI-egér felhasználása szövetspecifikus PMH jelátvitel vizsgálatára

A THAI-egér segítségével lehetőségünk nyílt az „alacsony T3 szindróma” patogenezisének tanulmányozására, mivel a modell biztosítja a különböző agyterületek PMH jelátvitelének közvetlen vizsgálatát. #23-as vonal mikrodisszekált EM mintáiban az LPS ~2-szeres D2 mRNS szint növekedést váltott ki, minden vizsgált időpontban (6, 8, 10 órával *i.p.* LPS injekció után). Ezt a luciferáz expressziójának növekedése is követte ami 8 óra után vált szignifikánssá, abban az időpontban, amikor a TRH expresszió ~50%-al csökkent a PVN-ben. Eredményeink rámutatnak, hogy az „alacsony T3 szindróma” kialakulása során a D2-mediált lokális PMH aktiváció növekedése hatással van a PMH jelátvitelre az MBH-ban, ez pedig hozzájárul a HHP tengely gátlásához és a TRH expresszió csökkenéséhez a PVN-ben.

Az iBAT működését noradrenerg és PMH jelátvitel együttesen befolyásolja és a központi idegrendszer szabályozása alatt áll. Élő THAI-egerek (#4) iBAT-jában 9 és 24 órás hidegstressz után, biolumineszcens képalkotással PMH jelátvitel emelkedést detektáltunk, tehát ki tudtuk mutatni a PMH elérhetőség fiziológiás stimulusra bekövetkező változását. Az iBAT biolumineszcenciája 24 óra után 3.2-szeres növekedést mutatott, míg a talpbőr értéke nem változott. Hasonló indukciót mértünk iBAT szövetminták lízátumában is.

A modell felhasználásával tanulmányoztuk az iBAT PMH jelátvitelének noradrenerg szabályozását. Az iBAT egyoldali szimpatikus denervációja nem befolyásolta az alap D2 aktivitást és luciferáz riportert mRNS szintjét, jelezve hogy az alap PMH jelátvitel kevésbé függ a szimpatikus bemenetektől. A denerválás csökkentette az iBAT hidegstresszre adott választát, és gátolta a 9 órás hideg kezelés által indukált ~2-szeres NA szint növekedést, a 9-szeres D2 expresszió és a 18-szoros D2 aktivitás növekedést, ezzel ellentétben az intakt iBAT lebenyben ~2.7-szeres luciferáz mRNS expresszió növekedés következett be. Ennek alapján megállapítható, hogy a szimpatikus idegrendszer az alap és hideg-indukált PMH jelátvitelt eltérő módon szabályozza.

A PMH-k előnyös hatásainak (pl. koleszterin szint és testsúly csökkentő) kiaknázásra fejlesztett, de a nem kívánatos kardiális mellékhatásokat mellőző, TR izoforma-specifikus PMH analógok, vagy tiromimetikumok tesztelésére a THAI-egér rendkívül hasznos modellt kínál. A #4-es vonal állatain GC24 TR β izoforma-specifikus hatóanyagot tesztelve ~2.5-

szeresre nőtt a luciferáz aktivitás a TR β domináns májban, viszont a PMH jelátvitel nem növekedett a TR α domináns szívben.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

Bemutatott eredményeink és a vizsgálatokhoz létrehozott új transzgenikus egérmodell a fejlődő és felnőtt agyban valamint a perifériás szövetekben zajló PMH jelátviteli folyamatokat támogató mechanizmusok jobb megértéséhez járulnak hozzá.

Annak ellenére, hogy a PMH-mediált hipotalamikus „set point” beállítás alapvetően fontos a megfelelő PMH háztartás és a szöveti működés szempontjából és az élőlény egész élettartamára kiterjedő hatással bír, kialakulásának mechanizmusa kevésbé ismert. Vizsgálataink során csirke modellt használva meghatároztuk a „set point” kialakulás időszakát és megmutattuk, hogy a D2-mediált hipotalamikus T3 előállítás drámai növekedése a fejlődés során meghatározó a helyi PMH jelátvitel szigorú szabályozásában, és a TRH neuronokon végbemenő negatív visszacsatolás kialakulásában. Az anyai PMH státusz befolyásolja a magzati PMH elérhetőséget, és a fejlődés során megváltozott PMH szintek eltolódott HHP tengely „set point”-ot és tartós defektusokat eredményeznek. Adataink új érvekkel szolgálhatnak azon vita eldöntéséhez, ami a PMH szintek ellenőrzésének rutin terheiről vizsgálatokba történő ellenőrzéséről folyik, különös tekintettel arra az időszakra, amikor a HHP tengely „set point”-ja kialakul. Hasznos lenne a vizsgálatok kiterjesztése főemlősökre, hogy a bemutatott folyamatok jelentőségét igazolni tudjuk magasabb rendű gerincesekben is.

A neuroszekretoros neuronok a PMH-k fő célpontjai a hipotalamuszban. A hipofiziotróp parvocelluláris neuronok axon terminálisainak dense core vezikulái felszínén bőségesen jelenlévő, működőképés D3 a neuroendokrin tengelyek PMH-mediált szabályozásának új útjára utalnak. D3 tartalmuk alapján kétféle axon terminálist különítettünk el (D3-at tartalmazó és D3 nélküli axon terminális). A D3 pozitív axon varikozitások száma erősen eltérő volt a különböző neuroendokrin axisok neuronjaiban számuk bakteriális LPS által kiváltott gyulladás során eltérően változott. Tehát létezik egy axon-típus specifikus intracelluláris T3 elérhetőség szabályozás a neuroszekretoros neuronok terminálisaiban. A hipotalamikus T3 fő forrását az EM-ban lévő tanciták nyúlványai jelentik, viszont a hipofiziotróp neuronok sejttestjei ettől távolabb, különböző idegmagvakban helyezkednek el. Ez arra enged következtetni, hogy a T3 az EM-ba nyúló axon terminálisokba kerül felvételre és az axonokban retrográd transzporttal juthat el a sejttestbe és éri el a sejtmagot. Az axonális D3-mediált T3 inaktiválás gátat vet a T3

szabad intracelluláris áramlásának és dinamikusan szabályozza a retrográd transzporttal magba jutó T3 mennyiségét. Továbbá a D3-nak az axonális neuroszekréciót szabályozó helyi hatása is elképzelhető a mitokondriális biogenezis és működés befolyásolása által, ennek alátámasztása azonban további vizsgálatokat igényel. Monokarboxilát transzporter 8-mediált axonális T3 felvétel és az intracelluláris T3 szintek neuron-típus specifikus D3 általi szabályozása a rágsáló EM területén a szaporodás, növekedés, stressz és metabolizmus hipotalamikus irányításának új módját jelentheti.

A létrehozott PMH jelátvitel indikátor (THAI)-egér egyedülálló *in vivo* modellként szolgál a szövetspecifikus PMH jelátvitel tanulmányozására és jelentősen hozzájárulhat az ilyen irányú vizsgálatokhoz. A THAI-egér működése firefly riporter expresszió alapul és teljes mértékben a PMH jelátvitel endogén szabályozó elemeit használja. A modell elsőként teszi lehetővé a PMH jelátvitel kvantifikálást élő állatban, valamint különböző agyrégiókból és perifériás szövetekből származó szövetmintákban. Az endogén PMH érzékeny géneket más, nem PMH eredetű tényezők is irányítják, ezzel szemben a THAI-egér hitelesen és kizárólagosan jelzi a PMH jelátvitelt. A modell segítségével kimutathatóak az endogén PMH elérhetőségben bekövetkező változások és az agyban illetve perifériás szövetekben is detektálható a szöveti hiper- és hipotiroidizmus. A modell segítségével megmutattuk, hogy fertőzés indukált „alacsony T3 szindróma” kialakulása során a PMH jelátvitel szövetspecifikusan szabályozódik a különböző hipotalamikus almagokban. THAI modellt használtuk a hideg-indukált iBAT PMH szabályozásának részletesebb megértéséhez is ami rámutatott az iBAT-on belüli PMH jelátvitel noradrenerg szabályozásának új vonatkozásaira. Továbbá vizsgálataink igazolták, hogy a THAI-egér felhasználásával endogén receptorális környezetben tesztelhetők TR izoforma-szelektív vegyületek, és így segítségül szolgálhat az elhízás és magas koleszterin szint kezelésére alkalmazható tiroimimetikumok fejlesztésében. A modell segítségével, szöveti hipotiroidizmusról nyerhető új adatok nagyon hasznosak lehetnek a PMH pótlási terápiák témájában folyó viták megválaszolásában is, ami világszerte emberek tízmillióinak kezelését teheti hatékonyabbá.

VI. PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Mohácsik, P., Füzesi, T., Doleschall, M., Szabó, AS., Vancamp, P., Hadadi, É., Darras, VM., Fekete, C., Gereben, B. 2016. Increased thyroid hormone activation accompanies the formation of thyroid hormone dependent negative feedback in developing chicken hypothalamus. *Endocrinology* 157(3):2111-211.
2. Kalló, I*, Mohácsik, P*, Vida, B., Zeöld, A., Bardóczy, Z., Zavacki, AM., Farkas, E., Kádár, A., Hrabovszky, E., Arrojo e Drigo, R., Dong, L., Barna, L., Palkovits, M., Borsay, B.A., Herczeg, L., Bianco, A.C., Liposits, Z., Fekete, C., Gereben, B. 2012. A novel pathway regulates thyroid hormone availability in rat and human hypothalamic neurosecretory neurons. *PLoS One* 7: (6) Paper e37860. 16 p. *equally contributed
3. Mohácsik, P., Zeöld, A., Bianco, AC., Gereben, B. 2011. Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target. *Journal of Thyroid Research, Special issue: Thyroid Hormones and Their Receptors: From Development to Disease* Article ID 215718, 16 pages doi:10.4061/2011/215718
4. Mohácsik, P, Erdélyi, F., Szabó, G., Fekete, Cs. and Gereben, B. (Inst. of Exp Med., Hung. Academy of Sciences) 2016. Thyroid hormone action indicator transgenic mouse and recombinant DNA construct Hungarian Patent Claim #P1400563, International Patent Application No. PCT/HU2015/050020

2. További publikációk

1. Wittmann, G., Szabon, J., Mohácsik, P., Nouriel, S., Gereben, B., Fekete, C., and Lechan, R. 2015. Parallel regulation of thyroid hormone transporters OATP1c1 and MCT8 during and after endotoxemia at the blood-brain barrier of male rodents. *Endocrinology* 156(4):1552–1564
2. McAninch, E., Jo, S., Preite, N., Farkas, E., Mohácsik, P., Fekete, C., Egri, P., Gereben, B., Li, Y., Deng, Y., Patti, M., Zevenbergen, C., Peeters, R., Mash, D., and Bianco, A. 2015. Prevalent polymorphism in thyroid hormone-activating enzyme leaves a genetic

fingerprint that underlies associated clinical syndromes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100(3): 920-33

3. Wittmann, G., Mohácsik, P., Balkhi, MY., Gereben, B., Lechan, RM. 2015. Endotoxin-induced inflammation down-regulates L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression at the blood-brain barrier of male rats and mice. *Fluids and Barriers of the CNS* 12: p. 21.

4. Fonseca, TL., Fernandes, GW., McAninch, EA., Bocco, BM., Abdalla, SM., Ribeiro, MO., Mohácsik, P., Fekete, C., Li, D., Xing, X., Wang, T., Gereben, B., Bianco, AC. 2015. Perinatal deiodinase 2 expression in hepatocytes defines epigenetic susceptibility to liver steatosis and obesity. *PROC NATL ACAD SCI USA* 112(45):14018-23

5. Rafael Arrojo e Drigo, Fonseca, TL., Castillo, M., Salathe, M., Simovic, G., Mohácsik, P., Gereben, B., and Bianco, AC. 2011. Endoplasmic reticulum stress decreases intracellular thyroid hormone activation via an eIF2 α -mediated decrease in type 2 deiodinase synthesis. *Molecular Endocrinology* 25(12): 2065-2075

Σ IF: 33,426

VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Gereben Baláznak, aki fáradhatatlanul támogatta szakmai fejlődésemet, széleskörű tudásával valamint derűs, higgadt életfelfogásával és tudományos látásmódjával irányította munkámat, miközben önálló munkavégzésemet is támogatta.

Hálával tartozom továbbá Dr. Fekete Csabának kísérletek kivitelezésében és metodikai ismereteim bővítésében nyújtott segítségéért.

Köszönetemet szeretném nyilvánítani Liposits Zsolt professzor úrnak, az Endokrin Neurobiológiai Osztály vezetőjének, amiért támogatta fejlődésemet a tudományos kutatás területén.

Köszönetemet szeretném kifejezni Antonio C. Bianco professzor úrnak (Chicago, USA), Veerle M. Darras (KU Leuven, Belgium) professzor asszonynak és kutatócsoportjaiknak az együttműködésért.

Külön hálával tartozom Juhász Andreának, Farkas Erzsébetnek, Szilvász-Szabó Anettnek, és Dr. Molnár Csillának, a barátságos légköréért és a rengeteg segítségért.

Köszönettel tartozom csoportom, a Molekuláris Sejt Metabolizmus Kutatólaboratórium tagjainak: Egri Péternek, Dr. Zeöld Anikónak, Sinkó Richárdnak és Dr. Kollár Annának.

Szeretném megköszönni a Lendület Integratív Neurobiológiai Laboratórium, valamint az Endokrin Neurobiológiai Laboratórium tagjainak, hogy kutatásaimat együttműködésükkel támogatták: Dr. Kádár Andreának, Zséli Györgyinek, Dr. Tóth Mónikának, Dr. Varga Edinának, Dr. Vida Barbarának, Dr. Füzesi Tamásnak, Simon Ágnesnek, Maruzs Veronikának, Dr. Hrabovszky Eriknek, Dr. Farkas Imrének, Dr. Kalló Imrének, Dr. Sárvári Miklósnak, Dr. Vastagh Csabának, Bardóczy Zsuzsannának, Bálint Flórának, Dr. Skrapits Katalinnak, László Barnának, Turek Mártának

Külön köszönöm Barna Lászlónak, a Nikon Mikroszkóp Központ tagjának, hogy támogatott és technikai tanácsokkal látott el különböző mikroszkópiai módszerek terén.

Továbbá szeretném megköszönni az Orvosi Géntechnológiai Részleg munkatársainak, különösképpen Erdélyi Ferencnek, Erdélyi Zsuzsának, Kaziné Szűcs Máriának, Szafner Rozáliának, hogy segítettek a laboratóriumi állatokkal végzett munka elsajátításában.