

A HHP tengely centrális szabályozása

Doktori tézisek

Kővári Dóra

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Fekete Csaba, M.D., D.Sc.
tudományos tanácsadó
- Hivatalos bírálók: Tóth Dániel, Ph.D.
egyetemi adjunktus
Dr. Nagy Endre, M.D., D.Sc.
egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Csillag András, D.Sc.
egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila, M.D., Ph.D.
egyetemi docens
Dr. Gaszner Balázs, M.D., Ph.D.
egyetemi docens

Budapest
2022

1. Bevezetés

A pajzsmirigy hormonok (PH), melyeket a pajzsmirigy termel, szerepet játszanak a legtöbb szervünk és fiziológiai folyamatunk szabályozásában, illetve felelősek a szervek normális működésének fenntartásáért és fejlődéséért, beleértve a csontokat, májat, keringési rendszert és az agyat. Emellett a PH-ok fontos szerepet játszanak a táplálékbevitel és az energia homeosztázis szabályozásában is.

A PH-ok két fő formája a tiroxin (T4) és a trijód-tironin (T3). A pajzsmirigy fő terméke a T4, ami egy prohormon. Az aktiváció során a T4-nek át kell alakulnia T3-má, mely folyamatban a külső gyűrűről egy jód molekula távozik. Ezt az aktivációt dejodináz enzimek katalizálják. Eutiroid állapotban az aktiváció első sorban a 2-es típusú dejodináz (D2) által valósul meg. A központi idegrendszerben a D2 az egyetlen dejodináz, ami a PH aktivációjáért felel. A dejodinázok által katalizált lokális PH aktiváció vagy inaktiváció biztosítja, hogy a PH hatás a különböző szövetekben a keringő PH szinttől függetlenül változzon. A dejodináz enzimek szövetspecifikus szabályozása befolyásolja a lokális TH hatást az egyes szövetekben az igényeknek megfelelően, attól függetlenül, hogy a keringő PH szint változatlan vagy épp csökkent-e.

A keringő PH-ok relatív állandó szinten tartása szükséges az agy és a perifériás szervek normális működésének fenntartásáért, melyet a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy (HHP) tengely biztosít. Ennek a neuroendokrin tengelynek a központi szabályozója a hipotalamikus paraventriculáris magban (PVN) található tireotropin felszabadító hormon (TRH)-szintetizáló neuronok. Ezek a hipofizeotróf TRH neuronok TRH-t bocsátanak a hipofízis portális keringésébe az eminentia mediana (EM) külső zónájában, ahol a TRH axonok végződnek. A TRH ezután eléri az elülső hipofízis tireotróp sejtjeit, ahol a tireoidea-stimuláló hormon (TSH) szintézisét, glikozilációját és szekrécióját fokozza, ezáltal a pajzsmirigy PH termelését stimulálva. A PVN-ben nem az összes TRH neuron vesz részt a HHP tengely negatív *feedback* regulációjában, csak a hipofizeotróf TRH neuronok, melyek az EM külső zónájába projektálva szabályozzák a pajzsmirigyét. A HHP tengely negatív *feedback* regulációja felelős a keringő PH szint állandóságáért. A PH negatív *feedback* hatása a hipofizeotróf TRH neuronokon közvetlen módon valósul meg.

A taniciták a hipotalamusz speciális glia sejtei, melyek a 3. agykamra ventrolaterális oldalait és az alapját bélelik a chiasma opticum mögött. A taniciták fontos szerepet játszanak a HHP

tengely negatív *feedback* szabályozásában. A mediobazális hipotalamuszon (MBH) belül csak a taniciták termelnek D2-öt, ezért csak ezek a sejtek felelnek a T4-T3 átalakításáért ebben az agyi régióban. Emellett a taniciták szintetizálnak egy TRH degradáló enzimet, a piroglutamil-peptidáz II-öt (PPII). A TRH neuronok a tanicita nyúlványok által vannak körül véve, így a PPII még azelőtt degradálja a felszabadult TRH-t, mielőtt eljutna a portális keringésbe.

Az endokannabinoidok az agyban széleskörűen elterjedt retrográd neurotranszmitterek, melyek a posztzinaptikus neuronokból szabadulnak fel és a preszinaptikus axon terminálisokon hatnak. Az egyik legfontosabb endokannabinoid a 2-arachidonoilglicerol (2-AG), amit a posztzinaptikusan termelődő diacilglicerol lipáz α (DAGL α) szintetizál. A csoportunk nemrég leírt egy új mikro körfolyamatot a hipofizeotróf TRH axonok és taniciták között, melyben az endokannabinoidok befolyásolják a TRH felszabadulást. A taniciták DAGL α -át expresszálnak. Az endokannabinoid szintézis gátlása jelentősen növeli a TRH felszabadulást az EM explantokban, amely felveti, hogy a taniciták tónikusan gátolják a TRH felszabadulást a hipofizeotróf axonokból. A glutamát szabályozza az endokannabinoid szintézist és felszabadulást a posztzinaptikus neuronokon a DAGL α stimulációja által. Ezáltal a hipofizeotróf TRH neuronok által felszabaduló glutamát stimulálhatja a taniciták endokannabinoid szintézisét.

A HHP tengely a keringő PH szinteket állandó értéken tartja a negatív *feedback* reguláció által. A fejlődés során kialakul a HHP tengely *feedback* regulációjának a *set point*-ja, ami jellemző lesz az egyénre az egész élete során. Ez a *set point* határozza meg az egyén számára az optimális értékét a TRH és szabad T4 (fT4) közötti összefüggésnek. Minden eltérés ettől a TRH-fT4 összefüggéstől a *feedback* mechanizmust aktiválja. Ez a *set point* születés környékén alakul ki, de jelenleg még keveset tudunk a kialakulás mechanizmusáról. A *set point* kialakulásának az ideje különböző az egyes fajokban. Az anyai tiroid státusz mellett a környezeti tényezők is befolyásolják az utódok HHP tengelyének fejlődését az érzékeny periódusban. A környezeti faktoroknak és zavarásoknak a hosszútávú hatása a perinatális időszak körül a gének epigenetikai módosulásai által valósulhatnak meg. Ezek a metiláció általi génexpressziós módosulások elősegítik az adaptációt a változó környezethez. A PH státusz változásai a korai, posztnatális időszakban, amikor a HHP tengely *set point*-ja kialakul, epigenetikai módosulásokat okozhatnak a PH-függő génekben, de ennek a mechanizmusa jelenleg még kevésbé ismert.

2. Célok

A kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a HHP tengely *set point*-jának a kialakulását, illetve a HHP tengely negatív *feedback* szabályozásának a centrális regulációját egérben, ezért a konkrét céljaink voltak:

1. Megvizsgálni, hogy a taniciták az endokannabinoid rendszeren keresztül hogyan befolyásolják a hipofizeotróf TRH neuronokban a TRH felszabadulást, illetve a HHP tengely aktivitását.
2. Feltárni, hogy a korai, perinatális időszakban a PH státusz megzavarása hogyan befolyásolja a HHP tengely működését és a metabolizmust felnőtt egerekben.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok és kezelésük

A kísérletek során újszülött és felnőtt egereket használtunk. Az állatokat standard körülmények között tartottuk (12 óra világos/sötét szakasz, hőmérséklet $22 \pm 1^\circ\text{C}$, a táp és a víz szabadon hozzáférhető). A felhasznált egértörzsek és a kísérleti elrendezés az 1. táblázatban találhatóak. Minden kísérlet a Magyar Tudományos Akadémia Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézete Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével történt (PE/EA/1102-7/2020).

1. **Táblázat:** A kísérleti elrendezés és a kísérletekben felhasznált egértörzsek összefoglalása.

	Törzs	Kezelése	Kezelés időtartama	Kor a kezelés alatt	Leölés
1. kísérlet	CD1	-	-	-	55-65
	Rax-CreERT2 Rax-CreERT2//Dagla ^{fl/fl}	175µg/ttg Tamoxifen	4 nap	45-55	55-65
2. kísérlet	TRH-IRES- tdTomato	200 ng/ttg T4 vagy vehikulum	1 nap	1,2,3,4,5,6 ,7,10	1,2,3,4,5, 6,7,10
	FVB/Ant	200 ng/ttg T4 vagy vehikulum	1 nap	1,3,4,7	1,3,4,7
3. kísérlet	TRH-IRES- tdTomato	1 µg/ttg T4 vagy vehikulum	5 nap	2-6	55-70
	THAI	1 µg/ttg T4 vagy vehikulum	5 nap	2-6	55-70

3.2. Szövetek előkészítése

3.2.1. Szövetek előkészítése gén expressziós vizsgálatokhoz

Az utolsó tamoxifen kezelés után 1 héttel dekapitáltuk a felnőtt Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egereket (1. kísérlet) és összegyűjtöttük a vérüket a szabad PH szintek meghatározásához, a hipofízisüket qPCR analízishez, illetve a teljes agyukat a TRH *in situ* hibridizációhoz (ISH). 12 µm vastag koronális metszeteket készítettünk a PVN régióból kriosztát segítségével.

FVB/Ant és TRH-IRES-tdTomato újszülött egereket (2. kísérlet) dekapitáltunk 8 órával a T4 illetve vehikulum kezelés után, majd összegyűjtöttük a teljes agyakat a TRH ISH-hoz, illetve májat és hipofízist a qPCR analízishez. 12 µm vastag koronális metszeteket készítettünk a PVN régióból kriosztát segítségével.

Posztnatálisan kezelt, felnőtt tiroid hormon hatás indikátor (thyroid hormone action indicator, THAI) egereket (3. kísérlet) dekapitáltunk és máj, barna zsírszövet, vékonybél, hippokampusz, és hypothalamusz mintákat gyűjtöttünk a qPCR mérésekhez.

A posztnatálisan kezelt, felnőtt TRH-IRES-tdTomato egereket (3. kísérlet) elaltattuk ketamin és xylazin keverékével (ketamin 50 mg/kg, xylazin 10 mg/kg testtömeg, i.p.). Máj mintákat gyűjtöttünk a qPCR analízishez, míg vért a szabad PH szintek méréséhez. Az ISH vizsgálathoz az elaltatott egereket transzkardiálisan perfundáltuk 10 ml RNáz-mentes 0.01 M foszfát pufferes sóoldattal (phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4) majd 50 ml RNáz-mentes 0.01 M PBS-ben oldott 4% paraformaldehid (PFA) oldattal. Az agyak az eltávolítás után 4 % PFA oldatban inkubálódtak 2 órán át, majd RNáz-mentes 0.01 M PBS-ben oldott 20%-os cukoroldatban egész éjjel 4 °C-on, ezt követően porított szárazjégen fagyasztásra kerültek. 18 µm vastag koronális metszeteket készítettünk a PVN régióból kriosztát segítségével.

3.2.2. Szövetek előkészítése immunhisztokémiai vizsgálatokhoz

Az utolsó tamoxifen kezelés után 1 héttel a felnőtt Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egereket (1. kísérlet) elaltattuk ketamin és xylazin keverékével (ketamin 50 mg/kg, xylazin 10 mg/kg testtömeg, i.p.). Az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk 10 ml RNáz-mentes 0.01 M PBS-sel pH 7.4, majd 50 ml 0.1 M foszfát pufferben oldott 4% PFA oldattal. Az agyak az eltávolítás után 4 % PFA oldatban inkubálódtak 2 órán át, majd 0.01 M PBS-ben oldott 30%-os cukoroldatban egész éjjel 4 °C-on, ezt követően porított szárazjégen fagyasztásra kerültek. 25 µm vastag koronális metszeteket készítettünk fagyasztó mikrotóm segítségével.

3.2.3. Szövetek előkészítése lézeres mikrodisszekcióhoz (LCM)

A posztnatálisan kezelt, felnőtt TRH-IRES-tdTomato (3. kísérlet), CD1, Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} (1. kísérlet) egereket elaltattuk a fent leírt módon. A taniciták LCM-es izolációjához az állatokat transzkardiálisan perfundáltuk 30 ml jéghideg 0.01 M RNáz-mentes PBS-ben oldott RNAlater oldattal, majd az agyakat lefagyasztottuk -40°C-os izopentánban. 12 µm vastag koronális metszeteket készítettünk az EM régióból kriosztát segítségével. A metszeteket 0.6%-os krezil ibolya oldattal festettük meg.

1. táblázat: A szövetek előkészítése és metszése az egyes kísérletekben

Kísérlet	Törzs	Fixálás	Metszés
DAGL α immunhisztokémia (1. 1. kísérlet)	Rax-CreERT2 Rax-CreERT2//Dagla fl/fl	4% PFA 30% cukor	fagyasztó mikrotóm EM 25 μ m
<i>In situ</i> hibridizáció (1,2,3. kísérlet)	posztnatális korban kezelt, felnőtt TRH-IRES-tdTomato	4% RNáz- mentes PFA 20% RNáz- mentes cukor	kriosztát PVN 18 μ m Superfrost Plus slide
	Rax-CreERT2 Rax-CreERT2//Dagla fl/fl FVB/Ant újszülöttek	-	kriosztát PVN 12 μ m zselatinos tárgylemez
Lézeres mikrodisszekció (1,3. kísérlet)	CD1 Rax-CreERT2 Rax-CreERT2//Dagla fl/fl posztnatális korban kezelt, felnőtt TRH-IRES-tdTomato	10% RNAlater	kriosztát EM 12 μ m PenSlide

3.3. DAGL α immuncitokémia az eminentia mediana-ban

A tamoxifen kezelt Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} (1. kísérlet) egerek EM metszeteit 0.01 M PBS-ben oldott 0,5% Triton X-100 és 0,5% H₂O₂ keverékében inkubáltuk 20 percre, majd PBS-ben oldott 2%-os normál lószérumba helyeztük 20 percre. A metszeteket 1:4000 hígításban DAGL α -elleni tengerimalac antitesttel inkubáltuk, ezután biotinilált szamár anti-tengerimalac IgG-vel, majd avidin-biotin-peroxidáz komplex-szel kezeltük. A DAGL α immunreaktivitás kimutatása Ni-DAB előhívóval történt.

3.4. Vércukor szint és szabad PH szint mérése

A Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egerek (1. kísérlet) vércukor szint meghatározásához egy csepp vért gyűjtöttünk a farkukon ejtett kisebb bemetszéssel.

A perfúzió előtt a már elaltatott TRH-IRES-tdTomato egerek vena cava inferior-jából, illetve a Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egerekből a dekapitáció során vért gyűjtöttünk.

A tamoxifen kezelt Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egerekből (1. kísérlet) az AccuBind ELISA FT3 és FT4 kit-ekkel határoztuk meg a szabad PH szinteket, míg a felnőtt TRH-IRES-tdTomato egereknél (3. kísérlet) AccuLite CLIA FT3 és FT4 kit-eket használtunk és a mérés luminométerrel történt.

3.5. Radioaktív ISH a proTRH mRNS szint meghatározásához PVN-ben

A PVN-ből minden 3. metszetet a T4 kezelt, illetve kontroll 1, 3, 4 és 7 napos FVB/Ant egerekből (2. kísérlet), illetve a posztnatális korban kezelt, felnőtt TRH-IRES-tdTomato egerekből (3. kísérlet), továbbá minden 4. PVN metszetet a Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} és a kontroll Rax-CreERT2 egerekből (1. kísérlet) egyszálú [35S]UTP-jelölt mTRH cRNS próbával hibridizáltattunk. Mosási lépéseket követően a metszeteket dehidráltuk felszálló alkoholsorban, levegőn megszáritottuk, majd Kodak NTB autoradiográfiás emulzióba mártottuk. A kísérletekben használt jelölt próbák koncentrációja és az expozíciós idők a **3. táblázatban** találhatóak.

3. Táblázat: Az mTRH próba koncentrációja és az expozíciós idők az ISH kísérletekben.

Kísérlet	Törzs	próba (cpm/μl)	Expozíciós idő
1. kísérlet	Rax-CreERT2 Rax-CreERT2//Dagla fl/fl	30000	7 nap
3. kísérlet	Felnőtt TRH-IRES-tdTomato	60000	20 nap
2. kísérlet	P1 FVB/Ant	50000	18 nap
	P3 FVB/Ant		15 nap
	P4 FVB/Ant		15 nap
	P7 FVB/Ant		11 nap

3.6. A DAGL α , Dio2, PPII, glutamát transzporterek és receptorok génexpressziós vizsgálata LCM-mel izolált tanicitákban

3.6.1. Taniciták izolációja LCM-mel

CD1, Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} (1. kísérlet) egerekből izoláltuk a β 2-taniciták sejttestjét, míg felnőtt TRH-IRES-tdTomato egerekből (3. kísérlet) az α - és β -tanicitákat. A disszekciót a Zeiss Microbeam Laser Capture Microdissection rendszer használatával végeztük 20X objektívvel, majd a mintákat lézernyaláb segítségével segítségével 0,5 ml-es adhezív csövek kupakjába katapultáltuk.

3.6.2. RNS izolálás és az RNS minőség meghatározása

Az RNS izolációhoz Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit-et és DNáz kezelést alkalmaztunk az RNase-Free DNase Set használatával. Az izolált RNS mintákból meghatároztuk az RNS Integritását (RNA Integrity Number, RIN) és a koncentrációját, melyekhez az Agilent 2100 Bioanalyzer-t használtuk a Agilent RNA 6000 Pico Kit-tel. Azok a mintákat melyeknek a RIN értéke 4 alatt volt, kizártuk a további vizsgálatokból.

3.6.3. Reverse transcription and amplification

Az RNS minták transzkripcióját ViLO Superscript III cDNA Reverse Transcription Kit-tel végeztük. Az egyszálú komplementer DNS (cDNS) koncentrációját Qubit Fluorométerrel és Qubit ssDNA Assay Kit-tel határoztuk meg. A cDNS-t Preamp Master Mix Kit-tel preamplifikáltuk a vizsgált génekkel és a housekeeping génekkel.

3.6.4. Custom TaqMan Gene Expression Array Card

A CD1-es egerekből (1. kísérlet) izolált β 2-tanicitákban vizsgáltuk az egyes glutamát transzporterek és receptor alegységek expresszióját 384-well Custom TaqMan Gene Expression Array Cards segítségével. A mikrofluid kártyák az előzetesen általunk kiválasztott receptor, transzporter és housekeeping génekkel lettek feltöltve a gyártó által. ViiA 7 real-time PCR platformot használtunk Array Card Block-kal és összehasonlító CT metodikával a qPCR ciklusaihoz. Pozitív kontrollként a diacilglicerol lipáz alpha (Dagla) és a 2-es típusú dehidrogenáz (Dio2) gének szolgáltak, míg negatív kontrollként a metabotróp glutamát receptor 1 (Grm1) és a metabotróp glutamát receptor 5 (Grm5).

3.6.5. TaqMan quantitative PCR analysis

A cDNS-ből egyforma (10 ng) mennyiséget használtunk minden TaqMan reakcióban a Taqman Fast Universal PCR Mastermix mellett. A qPCR analízishez a ViiA 7 real-time PCR platformot használtuk Fast-96 well block-kal és összehasonlító CT metodikával.

3.7. A PH szenzitív gének expressziójának meghatározása különböző szövetekben

Hipofízis mintákból az RNS izolálása Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit-tel történt, a DNáz kezelést RNase-Free DNase Set-tel végeztük.

Az RNS-t MBH mintákból az RNeasy lipid tissue mini kit segítségével izoláltuk.

NucleoSpin RNA kit-et és DNáz kezelést alkalmaztunk a máj, barna zsírszövet, vékonybél, hypothalamus és hippocampus minták totál RNS izolálásához. Az RNS koncentrációkat Qubit fluorométer és Qubit hs-RNA assay kit használatával, vagy Smart Spec Plus spektrofotométerrel határoztuk meg. A reverz transzkripciót High-capacity cDNA reverse transcription kit-tel végeztük, ezután a cDNS koncentrációt Qubit fluorométerrel és Qubit ss-DNA assay kit-tel határoztuk meg. A THAI egerek MBH, máj, barna zsírszövet, hypothalamus és hippocampus mintáit preamplifikáltuk a luciferáz (luc) gén expressziójának a meghatározásához. A TaqMan qPCR analízis a **3.6.5.** fejezetben leírtak alapján történt.

3.8. Testösszetétel analízis és indirekt kalorimetria

Hím TRH-IRES-tdTomato újszülött egereket (3. kísérlet) kezeltünk T4-gyel vagy vehikulummal, majd 2 hónap múlva testösszetétel és indirekt kalorimetria méréseket végeztünk. Ugyanezeket a méréseket elvégeztük Rax-CreERT2 és Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egereken (1. kísérlet) egy héttel az utolsó tamoxifen kezelés után. A testösszetételt EchoMRI egész test mágneses rezonancia méréssel határoztuk meg. A táplálékbevitelt, lokomotoros aktivitást és a kalorimetriai paramétereket 72 órán keresztül monitoroztuk a TSE PhenoMaster rendszer segítségével. A metabolikus adatokat TSE PhenoMaster szoftverrel elemeztük.

4. Eredmények

4.1. A taniciták endokannabinoid termelésének szerepe a HHP tengely regulációjában

4.1.1. A β 2-taniciták glutamát receptorokat és transzportereket expresszálnak egerekben

CD1-es egerekben vizsgáltuk a gén expressziót β 2-tanicitákból hogy meghatározzuk, hogy a tanicitákat befolyásolhatja-e a hipofiziotróf TRH neuronokból felszabaduló glutamát és TRH. A β 2-tanicitákat LCM-mel izoláltuk, majd TaqMan génexpressziós array card-dal meghatároztuk a DAGL α , Dio2, glutamát receptor alegységek, glutamát transzporterek és TRH receptorok gén expresszióját. Az SLC1A3 glutamát transzporter expressziója magas volt a β 2-tanicitákban. Főként AMPA és kainát receptor alegységek expresszázódtak a β 2-tanicitákban, míg az NMDA receptor alegységek és a metabotróp glutamát receptorok kisebb mértékben voltak jelen. Mindkét TRH receptor, a TRHR1 és a TRHR2 is hiányzott a β 2-tanicitákból. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a glutamát a β 2-tanicitákban elsősorban a kainát és AMPA receptorokon, illetve a glutamát transzporter SLC1A3 keresztül hat.

4.1.2. A DAGL α tanicita specifikus hiányának validálása Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egerekben

Megvizsgáltuk, hogy a genetikai manipulációnk csökkentette-e a DAGL α expressziót a β 2-tanicitákban. A Rax-CreERT2 egerekben jól látszik a DAGL α immunreaktivitás a β 2-taniciták sejttestjeiben és bazális nyúlványaiban az EM régióban, ehhez képest a tamoxifen-kezelt Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egerekben (T-DAGL α KO) jelentős csökkenés látható a DAGL α immunreaktivitás intenzitásában. A többi agyrégióban nem befolyásolta a DAGL α immunreaktivitást a genetikai manipulációnk. A DAGL α mRNS expresszió az LCM-mel izolált β 2-tanicitákban szignifikánsan csökkent a T-DAGL α KO egerekben a kontrollokhöz képest, alátámasztva, hogy a Rax-CreERT2//Dagla^{fl/fl} egér alkalmas modell a tanicitákban expresszázó DAGL α szerepének a vizsgálatára.

4.1.3. A DAGL α tanicita specifikus hiánya befolyásolja a HHP tengelyt

Vizsgáltuk, hogy a DAGL α tanicita specifikus hiánya hogyan befolyásolja a HHP tengelyt. ISH-val kimutattuk, hogy a proTRH mRNS expresszió nem változott szignifikánsan a T-DAGL α KO egerekben a kontrollokhöz képest. Az autoradiogramok denzitometriai analízise szintén nem mutatott szignifikáns különbséget a proTRH mRNS integrált denzitásában a két csoport között. Ezzel szemben a TSH β mRNS szintje 2-szeres növekedést mutatott a T-DAGL α

KO egerekben a kontrollokhöz képest. Ennek megfelelően hogy a TSH termelés növekedett a hipofízisben, a keringő FT4 szint ~20%-os növekedést mutatott a T-DAGL α KO egerekben a kontrollokhöz képest. Habár az FT3 szintet nem befolyásolta a genetikai manipulációnk.

LCM-mel izolált β 2-tanicitákban a Dio2 expresszió szignifikáns csökkenést mutatott a T-DAGL α KO egerekben, ami mutatja, hogy a taniciták csökkentik a lokális T3 termelést a megnövekedett TSH β és FT4 szint hatására. Habár a TRH degradáló PPII enzim szintje nem változott szignifikánsan.

4.1.4. A DAGL α tanicita specifikus hiányának hatása a testösszetételre és a metabolizmusra

A PH-ok fontos szerepet játszanak a fejlődés és az energia homeosztázis szabályozásában, ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a genetikai manipulációnk a testösszetételt és a metabolizmust, melyet indirekt kalorimetriával mértünk. A 3 napos mérés előtt és után megmértük az állatok testtömegét, ennek alapján a T-DAGL α KO egerek szignifikánsan többet gyarapodtak, mint a kontroll állatok. Emellett a sovány testtömeggel (lean body mass, LBM) normalizált zsírtömeg is szignifikánsan nőtt ezekben az egerekben, míg az LBM-mel normalizált teljes testtömeg illetve a hidratációs arány nem változott szignifikánsan. Érdekes módon a T-DAGL α KO egerek vércukor szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollokéhoz képest. A T-DAGL α KO egereknél az LBM-mel normalizált táplálék bevitel megnövekedett tendenciát mutatott, ami összefügg azzal, hogy a magasabb vércukor szint csökkenti a táplálék felvételt. A T-DAGL α KO egerek XY aktivitása szintén szignifikánsan nőtt. Az energia ráfordítás, a nyugalmi energia ráfordítás, illetve a légzési hányados (respiratory exchange ratio) RER értéke nem változott szignifikánsan a két csoport között.

4.2. A HHP tengely negatív feedback szabályozásnak fejlődése

4.2.1. A PH-ok egerekben már újszülött kortól regulálják a TRH expressziót a PVN-ben és a TSH β expressziót a hipofízisben

A HHP tengely *set point*-ja születés környékén alakul ki, de a kialakulás pontos ideje egerekben még nem ismert, így megvizsgáltuk a HHP tengely negatív *feedback* szabályozásának fejlődését újszülött egerekben. A hipofízis TSH β mRNS expressziója a T4-kezelt TRH-IRES-TdTomato egerekben szignifikánsan csökkent minden korcsoportban a kontrollokhöz képest, melyből következik, hogy a *feedback* reguláció a hipofízis szintjén már kifejlődött a születés környékére.

Megismételtük a kezeléseket egy új csoport 1, 3, 4 és 7 napos FVB/Ant egéren és meghatároztuk a proTRH mRNS szintet ISH-val a PVN középső régiójában. A reprezentatív képek mutatják, hogy a proTRH mRNS szintje minden korcsoportban szignifikánsan csökkent a T4-kezelt egerekben a kontrollokéhoz képest. A kiválasztott képek denzitometriai analízise szintén szignifikáns csökkenést mutatott a 3, 4 és 7 napos T4-kezelt egerekben. Ezzel szemben az 1 napos korcsoportban csak tendencia volt megfigyelhető a proTRH expresszió csökkenésére a T4 kezelt állatokban.

4.2.2. A korai, posztnatális hipertiroidizmus hatása a máj Dio1 expresszióra

1-7 és 10 napos TRH-IRES-TdTomato egerek májában vizsgáltuk a Dio1 expresszióját, mely erős PH szenzitivitást mutat, ezért megfelelő markere a keringő PH szinteknek. A Dio1 mRNS expresszió a májban szignifikánsan nőtt a T4-kezelt állatokban az összes korcsoportban a kontrollokhoz képest, ami mutatja a kezelt állatok hipertiroid állapotát.

4.3. A korai, posztnatális hipertiroidizmus hatásának vizsgálata a HHP tengelyre, metabolizmusra és szövetspecifikus PH hatásra felnőtt egerekben

4.3.1. A korai, posztnatális hipertiroidizmus élethosszig tartó változásokat okoz a HHP tengelyben

A korai, posztnatális hipertiroidizmus felnőttkori hatásainak vizsgálatához hím TRH-IRES-TdTomato és THAI egereket kezeltünk 2-6 napos kor között naponta $1\mu\text{g}/\text{ttg}$ T4-gyel vagy vehikulummal, bőr alá adagolva, majd 2 hónap múlva mintákat gyűjtöttünk. A korai, posztnatális T4 kezelésünk jelentős csökkenést eredményezett a felnőtt TRH-IRES-TdTomato egerek proTRH mRNS expressziójában a PVN-ben a kontroll csoportéhoz képest. A képek analízise alapján a posztnatális T4 kezelésünk körülbelül 30%-os csökkenést eredményezett a proTRH mRNS jel denzitásában a felnőtt egerek PVN-jében. Habár a hipofízisben a TSH β mRNS expressziója nem változott szignifikánsan, de a keringő fT4 szint szignifikáns csökkenést mutatott a T4-kezelt csoportban a kontrollokhoz képest. A csökkent TRH expresszió és fT4 szint mutatja, hogy centrális hipotiroidizmus alakult ki a korai T4-kezelt egerekben. Habár az fT3 szintet nem befolyásolta a kezelésünk, amiből következik, hogy a perifériás változások a PH metabolizmusban normalizálni tudják az fT3 szintet a csökkent fT4 szint ellenére.

4.3.2. A taniciták nem vesznek részt a HHP tengely set point-jának regulációjában a korai hipertiroidizmus hatására

Mivel a taniciták PH aktiváló képessége befolyásolja a TRH neuronok *feedback* regulációját, illetve a Dio2 az MBH területén csak a tanicitákban expresszálódik, ezért LCM-mel külön izoláltuk az α - és β -tanicitákat a posztnatális korban kezelt TRH-IRES-TdTomato felnőtt egerekből. A Dio2 mRNS expressziója nem változott szignifikánsan sem az α -, sem a β -tanicitákban. A taniciták képesek befolyásolni a HHP tengely aktivitását aztáltal is, hogy az EM területén degradálják a TRH-t a PPII enzim segítségével. A PPII expresszióban sem az α -, sem a β -tanicitákban nem volt szignifikáns különbség a kontroll és posztnatálisan T4-kezelt felnőtt TRH-IRES-TdTomato egerekben. Mivel a D2 aktivitás poszttranszlációs erősen regulált, ezért megvizsgáltuk, hogy az MBH-ban a PH hatást befolyásolja-e a posztnatális T4 kezelés. Ehhez THAI egereket használtunk, mely modellben a luc expresszió erősen regulált a PH-ok által. A posztnatálisan T4-kezelt felnőtt THAI egerek MBH-jában a luc expresszió – ami a PH hatás indikátora – nem változott a kezelésünk által. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a taniciták nem vesznek részt a HHP tengely *set point*-jának a regulációjában a korai hipertiroidizmus során.

4.3.3. A korai, posztnatális hipertiroidizmus befolyásolja egerekben a felnőttkori testösszetételt

A PH-ok fontos szerepet játszanak a fejlődés és az energia homeosztázis szabályozásában, ezért tanulmányoztuk a korai, posztnatális hipertiroidizmus hatását a testösszetételre és az energia homeosztázisra felnőtt TRH-IRES-tdTomato egereken. A felnőtt, posztnatális korban T4-kezelt állatok testtömege szignifikánsan csökkent a kontrollokhoz képest. Ezen felül a testhosszuk a T4-kezelt állatoknak szintén szignifikánsan kisebb volt. Az egerek testösszetételét EchoMRI egész test mágneses rezonancia méréssel vizsgáltuk. Sem a zsírtömeg/LBM, sem az LBM/testtömeg arány nem különbözött szignifikánsan a két csoport között. Az LBM-mel normalizált táplálék bevitel szintén nem változott szignifikánsan. Ezekből következik, hogy a csökkent testsúly nem a megváltozott testösszetételnek köszönhető, hanem a fejlődési retardációnak, mivel a PH státusz befolyásolja a csontok növekedését.

4.3.4. A korai, posztnatális hipertiroidizmus befolyásolja az aktivitást és az energia homeosztázist felnőtt egerekben

A felnőtt TRH-IRES-TdTomato egerek lokomotoros aktivitását és energia homeosztázisát indirekt kalorimetriával vizsgáltuk. A csökkent fT4 szint ellenére a posztnatális T4 kezelésünk megnövelte a felnőtt állatok lokomotoros aktivitását, beleértve az XY aktivitást, a megtett távot és a sebességet. A magasabb aktivitás együtt járt a szignifikánsan magasabb energia ráfordítással is. Továbbá, a nyugalmi energia ráfordítás is szignifikánsan magasabb volt a posztnatális korban T4-kezelt egerekben, ami mutatja, hogy a centrális hipotiroidizmus a szövetek szintjén kompenzálódott ezekben az állatokban. A RER nem különbözött szignifikánsan a két csoport között.

4.3.5. A korai, posztnatális hipertiroidizmus hatása a szöveti PH hatásra felnőtt egerekben

THAI egereket kezeltünk 1µg/ttg T4-gyel vagy vehikulummal 2-6 napos kor között naponta, majd felnőttkorban mintákat gyűjtöttünk. A szövetspecifikus PH hatás meghatározásához vizsgáltuk a különböző szövetekben a luc expressziót (ami a PH hatás markere THAI egérben). Sem a hipotalamuszban, sem a hippocampusban nem volt szignifikáns változás a luc expresszióban a T4-kezelt és kontroll állatok között. Szintén mértük a luc expressziót perifériás szövetekben is. A luc expresszió egyedül a vékonybélben csökkent a T4-kezelt felnőtt egerekben, azonban a barna zsírszövetben nem változott a luc mRNS szintje.

4.3.6. A korai, posztnatális hipertiroidizmus befolyásolja a PH-függő gének expresszióját a felnőtt egerek májában

Mivel a máj az egyik legfontosabb célszerve a PH-oknak, ezért TaqMan qPCR-ral vizsgáltuk a PH-függő gének expresszióját a posztnatális korban T4-kezelt felnőtt TRH-IRES-TdTomato egerek májában. A korai T4 kezelés jelentős, körülbelül 90%-os szignifikáns csökkenést eredményezett a máj Dio1 expressziójában. A szövetspecifikus PH hatás meghatározásához vizsgáltuk a posztnatális korban T4-kezelt felnőtt THAI egerek májában a luc expressziót. A luc expresszió ami a markere a PH hatásnak nem változott szignifikánsan a májban, ami jelzi az eutiroid állapotát a szövetnek. A PH receptor α és β (THRA, THRB) expressziója szintén nem változott szignifikánsan a májban. Ismert, hogy a PH-érzékeny (Spot14) gén gyorsan reagál a PH-okra és szerepe van a lipid metabolizmus és a lipogén gének szövetspecifikus szabályozásában májban. Érdekes módon az alacsonyabb fT4 szint a posztnatális korban T4-kezelt állatokban nem járt együtt a Spot14 expressziójának változásával. Szintén tanulmányoztuk más gének expresszióját is, melyek pozitívan reguláltak a PH-ok által és

szerepük van a zsírsav metabolizmusban a májban. Mind a **malic enzyme 1** (ME1), mind a zsírsav szintáz (FASN) szignifikáns csökkenést mutatott a T4-kezelt csoportban a kontroll állatokhoz képest. A glükóz-6-foszfátáz katalitikus alegységének (G6PC) expressziója – ami fontos az endogén glükóz produkcióban – nem változott szignifikánsan.

4.3.7. A korai, posztnatális hipertiroidizmus hatása a DNS metiltranszferáz enzimek expressziójára májban

Megvizsgáltuk a DNS metilációban részt vevő gének expresszióját 2 és 6 napos korban T4-kezelt újszülött egerek májában hogy meghatározzuk, hogy a PH-függő gének expressziós változásai a májban epigenetikai szabályozásnak köszönhetőek-e. A 2 napos T4-kezelt egerekben a DNS-metiltranszferáz 1 (Dnmt1) szint kis mértékben növekedett, de ez a növekedés nem volt szignifikáns, míg a DNS-metiltranszferáz 3A (Dnmt3a) és DNS-metiltranszferáz 3B (Dnmt3b) expressziója szignifikánsan magasabb volt a kontrollokéhoz képest. Azonban ennek a 3 génnek a szintje a 6 napos egerekben nem mutatott szignifikáns eltérést a csoportok között. Az eredményekből következik, hogy a 2 napos korú egerek még a szenzitív periódusban vannak, melynek során a PH státusz befolyásolja a PH-függő gének *set point*-ját a májban és epigenetikai módosulásokat okoz a DNS metiláció által, azonban 6 napos korban ez a hatás már nem mutatkozik.

5. Konklúziók

Vizsgálataink arra irányultak, hogy jobban megérthessük, hogy az endokannabinoid rendszer hogyan befolyásolja a HHP tengelyt, illetve hogy a PH státusz zavara hogyan képes élethosszig tartó változásokat előidézni ebben az érzékeny rendszerben.

Az már eddig is ismert volt, hogy a taniciták a HHP tengely működését számos folyamaton keresztül befolyásolják. A csoportunk nem rég feltárt egy új regulációs mikro körfolyamatot, amiben szerepe van a taniciták endokannabinoid termelésének. Jelen vizsgálatainkban megmutattuk, hogy a DAGL α tanicita specifikus hiánya megnövekedett TSH szintézist és FT4 szintet eredményezett, támogatva azt, hogy a TRH felszabadulást a taniciták endokannabinoid termelése tónikusan gátolja. A megnövekedett FT4 szint ellenére a T-DAGL α KO egerek energia ráfordítása nem nőtt, ami azt mutatja, hogy a megnövekedett PH szint a szövetek PH metabolizmusa által kompenzálódik. Érdekes módon a T-DAGL α KO egerekben a vércukor szint csökkent, ami felveti a taniciták 2-AG termelésének szerepét a glükóz homeosztázis szabályozásában, de ennek a hatásnak a vizsgálatához még további kísérletek szükségesek.

A kísérleteink során feltártuk, hogy a tiroid státusznak kritikus szerepe van a HHP tengely *feedback* regulációjának a kialakulásában a korai posztnatális periódusban. A hipertiroidizmus ebben a kritikus időszakban élethosszig tartó változásokat okoz a *feedback* reguláció *set point*-jában, ami felveti, hogy a HHP tengely PH-függő génjeiben epigenetikai változások történnek. Ezt a hipotézist támogatja az eredményünk, hogy 2 napos egerekben a PH-ok szabályozzák a DNMT enzimeket.

A felnőtt egerekben a korai posztnatális hipertiroidizmus miatt kialakult későbbi hipotiroidizmus ellenére a legtöbb szövet eutiroid és magasabb az állatok energia ráfordítása is, ami azt mutatja, hogy a perifériás szövetek képesek kompenzálni az alacsonyabb FT4 szintet ebben a modellben. Habár a taniciták fontos szerepet játszanak a HHP tengely regulációjában, az eredményeink azt mutatják, hogy ezek a sejtek nem vesznek részt a korai posztnatális hipertiroidizmus által kiváltott változásokban a HHP tengelyen.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy nem csak a hipotiroidizmus, de a hipertiroidizmus az érzékeny fejlődési periódusban is élethosszig tartó változásokat okozhat.

6. Publikációs lista

6.1. Publikációk a doktori értekezés témájában

Kővári D, Penksza V, Szilvásy-Szabó A, Sinkó R, Gereben B, Mackie K, Fekete C. (2021) Tanycyte specific ablation of diacylglycerol lipase alpha stimulates the hypothalamic-pituitary-thyroid axis by decreasing the endocannabinoid mediated inhibition of TRH release. *Journal of Neuroendocrinology*, 2022;34:e13079. IF:3,27

Farkas E, Varga E, Kovács B, Szilvásy-Szabó A, Cote-Vélez A, Péterfi Z, Matziari M, Tóth M, Zelena D, Mezriczky Z, Kádár A, Kővári D, Watanabe M, Kano M, Mackie K, Rózsa B, Yvette R, Tóth B, Máté Z, Erdélyi F, Szabó G, Gereben B, Lechan RM, Charli JL, Joseph-Bravo P, Fekete C. (2020) A glial-neuronal circuit in the median eminence regulates thyrotropin-releasing hormone-release via the endocannabinoid system. *iScience*, 27;23(3):100921 IF:5,458

6.2. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

Varga E, Farkas E, Zséli G, Kádár A, Venczel A, Kővári D, Németh D, Máté Z, Erdélyi F, Horváth A, Szenci O, Watanabe M, Lechan RM, Gereben B, Fekete C. (2019) Thyrotropin-releasing-hormone-synthesizing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus are inhibited by glycinergic inputs. *Thyroid*, 29:12 pp. 1858-1868 IF: 5,227

Ruska Y, Szilvásy-Szabó A, Kővári D, Kádár A, Mácsai L, Sinkó R, Hrabovszky E, Gereben B, Fekete C. (2021) Expression of glucagon-like peptide 1 receptor in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus in mice. *Brain Structure & Function*, 227, pages 77-87(2022) IF: 3,27

Cumulative IF: 17,225