

A pajzsmirigyhormonok számos biológiai folyamat, így a fejlődés, a növekedés és az anyagcsere alapvető fontosságú tényezői. A tiroxin (T4) pro-hormon, melynek a pajzsmirigyhormon aktiváció során deiodációval T3-á kell alakulnia ahhoz, hogy kötődni tudjon a pajzsmirigyhormon magreceptorhoz és biológiai hatásait kifejthesse. A T4 aktivációt az agyban a kettes-típusú deiodáz enzim (D2) katalizálja. A pályázat célkitűzései a központi idegrendszeri pajzsmirigyhormon aktiváció celluláris és molekuláris vonatkozásainak vizsgálatához kapcsolódtak. Munkánk főbb eredményeit az alábbiakban foglaljuk össze.

Egyik célunk az alacsony T3 szindróma (nonthyroidal illness syndrome, NTIS) molekuláris pathogenezisének vizsgálata volt. Az NTIS egy olyan rendkívül gyakori endokrin kórkép, amit csökkenő keringő pajzsmirigyhormon szintek és erre aktivációval nem válaszoló centrális agyi pajzsmirigyhormonszabályozás jellemez. Előzetes eredményeink valószínűsítették, hogy a *dio2* gén terméke, a D2 fehérje a idegrendszeri T3 szintézisen keresztül jelentős szerepet játszik a szindróma kialakulásában, így célunk az emberi *dio2* gén citokinek általi transzkripciós szabályozásának molekuláris biológiai vizsgálata volt.

A *dio2* gén különböző szakaszait rekombináns luciferáz riporter gén elé helyeztük és aktivitását p65 NF- κ B alegységet kódoló plazmid jelenlétében HC11 sejtvonalban vizsgáltuk. transzfektáltuk. A gén válaszkészségét a 3' ~ 1 kb-ra lokalizáltuk. Ebben a szakaszban a TESS adatbázis használatával 6 feltételezett NF- κ B kötőhelyet azonosítottunk. HeLa sejtekben NF- κ B fehérjét expresszáltunk s ezt gélretardációs assay-ben alkalmaztuk a kötőhelyek jellemzésére. Megállapítottuk, hogy a 2-es (-683 bp 5' a transzkripciós indítóhelytől /TSS/) és az 5-ös számú hely (-198 a TSS-től) köti az NF- κ B. A 2-es és 5-ös kötőhelyének NF- κ B kötési kapacitása megegyező volt. A kötőhelyeket helyirányított mutagenézissel mutáltuk és a transzaktivációs képességüket riporter assay-vel tesztelve bizonyítottuk, hogy a *dio2* gén NF- κ B válaszkészségében 2-es hely nem vesz részt, tehát azért az 5-ös hely felelős. Vizsgáltuk továbbá, hogy a másik fő citokin effektor, a STAT fehérje család képes-e befolyásolni a *dio2* gén expresszióját. A STAT3 és STAT5 nem változtatta meg a *dio2* gén válaszkészségét a HC11, HEK293 és COS7 sejtekben.

Összefoglalva, az NF- κ B a *dio2* gént transzkripcionálisan szabályozza az 5-ös sz. kötőhelyen keresztül. Vizsgálatainkat kiterjesztve MSTO-211H megállapítottuk, hogy az NF- κ B mediált jelátviteli útvonal az endogén D2 expressziót is képes szabályozni. E feltárt mechanizmus az alapját képezheti a hipotalamuszban fertőzés során bekövetkező D2 expresszió növekedésnek. Az ennek következtében létrejövő T3 túlsúly szupresszálni képes a TRH termelést, s e lokális T3 többlet miatt a hipotalamusz-hipofízis tengely nem képes válaszolni az NTIS-ben létrejövő alacsony keringő pajzsmirigyhormon szintre.

Eredményeinket előadás formájában is bemutattuk a Pajzsmirigy Világkonferencián majd az Endocrinology-ban közöltük (1).

Az alacsony T3 szindróma pathogenezisét magyarázni kívánó kiindulási hipotézisünk alapján tehát a D2-t termelő hipotalamikus tanicitákban lejátszódó D2 aktivitás növekedés s azt követő T3 szint emelkedés szupresszálná a hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy tengelyt a TRH neuronok megnövekedett T3 inputján keresztül. Mivel a D2 fehérje instabil és ubikvitinálódik, így megvizsgáltuk, hogy az NF- κ B útvonal képes-e befolyásolni a D2 aktivitást e poszt-transzlációs útvonalon is.

Az USP33 (VDU-I) a D2 deubikvitináza, ami képes csökkenteni a D2 lebomlást és ezáltal megnövelni a D2 aktivitást. Ehhez először képet akartunk alkotni a a D2 szelektív proteolízisének idegrendszeri jelentőségéről, így megvizsgáltuk két kulcsszereplő, a WSB1 ubikvitin ligáz és az USP33 deubikvitináz jelenlétét a patkány agy D2-t expresszáló sejtjeiben. Míg a D2-t expresszáló asztrociták expresszáltak WSB1-et, USP33 nem volt jelen ezekben a sejtekben. Ezzel ellentétben a harmadik agykamra falában elhelyezkedő, D2-t termelő taniciták ko-expresszálták a WSB1-et és az USP33-at. Ez arra utal, hogy míg feltehetően mindkét sejt-típusban működőképes a D2 ubikvitináció, addig ennek USP33 általi reverzibilis formája csak tanicitákban működik. Real-time PCR-el vizsgáltuk a WSB1 és USP33 expresszió pajzsmirigyhormon függését *in vivo* patkány agy különböző területein és azt találtuk, hogy e fehérjék expressziója nem szabályozódik T3 függő módon. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a D2 ubikvitinációs szabályozásának fő feladata nem a pajzsmirigyhormon homeosztázis fenntartása, inkább stimulusokra történő rapid T3 szint befolyásolása lehet. Eredményeink az Endocrinology-ban jelentek meg (2).

Mivel bizonyítottuk, hogy az USP33 jelen van tanicitákban, megvizsgáltuk, hogy az NF- κ B hat-e az USP33 expressziójára. Ez azt jelentené, hogy a NF- κ B a D2 aktivitást nem kizárólag transzkripcionálisan, hanem poszt-transzlacionálisan, az ubikvitinált D2 mennyiségének csökkenésén keresztül is szabályozhatná. Klónoztuk az emberi USP33 promoterének, ennek *in vitro* és *in vivo* vizsgálata nem erősítette meg, hogy az USP33 expressziója NF- κ B érzékeny lenne.

A deiodázok alacsony T3 szindrómában betöltött szerepéről alkotott aktuális képet a Cellular and Molecular Life Science-ben összefoglaló cikkben tekintettük át (3).

Jellemeztük továbbá a Teb4-et, a D2 új ubikvitin ligázát. A Teb4 felgyorsítja a D2 lebomlását az ubikvitin-proteaszóma útvonalon, de e hatás nem gyorsítható tovább WSB1-el, a D2 elsőként megismert ubikvitin ligázával. Megmutattuk, hogy a D2 fehérje korábban általunk leírt ubikvitinációs hurkának eltávolítása meggátolja a Teb4 D2 aktivitás csökkenésére kifejtett hatását. Adataink rámutatnak, hogy a WSB1 és a Teb4 nem egymást erősítő, hanem helyettesítő szerepet játszik a D2 mediált T3 képződés ubikvitinációs útvonalon történő szabályozásában. Ennél fogva a két ligáz szövet-, ill. sejt-típus specifikus expressziója határozhatja meg a WSB1 ill. Teb4 mediált D2 lebomlás érvényre jutását. Ezért megvizsgáltuk a Teb4 szöveti eloszlását patkány szövetekben. Míg a barna zsírszövetben a WSB1 dominál a Teb4-el szemben, addig pajzsmirigyben egyik ligáz sem volt kimutatható, de az agyban mindkét gén expresszálódott. A továbbiakban patkány agy D2-t expresszáló sejt-típusaiban térképeztük fel a Teb4 jelenlétét. Míg a mediobazális hipotalamusz T3 generáló centrumát képező tanicitákban mindkét ubikvitin ligáz jelen volt, addig asztrocitákban az agyterület-függetlenül jelenlévő WSB1-el ellentétben a Teb4 csak a kisagyban expresszálódott. Ez arra utal, hogy míg a hipotalamuszban mindkét ubikvitin ligáz képes befolyásolni a D2 mediált T3 szintézist, addig erre a kiemelten T3 érzékeny hipokampuszban csak a WSB1 képes a két ligáz közül.

A Teb4-el kapcsolatos eredményeinket az Endocrine Society konferenciáján mutattuk be, majd a Mol Cell Biology-ban közöltük (4).

Tanulmányoztuk továbbá a D2 ubikvitinációjának strukturális vonatkozásait és a fehérje intracelluláris eloszlásának egyes aspektusait is. Megállapítottuk, hogy a D2 endoplazmatikus retikulumbéli (ER) lokalizációja stabil retenciával jön létre, majd különböző sejt-kompartimentumokban (ER és plazmamembrán) vizsgáltuk a D2

lebomlás működését kiméra fehérjék (D2-Sec62 /ER/ ill. D2-NIS /plazmamembrán/) segítségével és behatároltuk a D2 fehérjében azokat az aminosavakat, amelyek szükségesek lebomlásához.

Eredményeinket előadás formájában bemutattuk az Európai Pajzsmirigy Társaság konferenciáján, majd közöltük a J. Biol. Chemistry-ben (5).

Tanulmányoztuk az idegrendszeri T3 termeléséért felelős kettes-típusú dehidáz (D2) enzim lebomlásának strukturális és funkcionális vonatkozásait. Ennek során megállapítottuk, hogy D2 homodimerek mindkét monomerje katalitikusan aktív és homodimerizáció során veszi fel azt a térszerkezetet, ami szükséges a dehidázreakcióhoz. Megállapítottuk, hogy az emberi D2 fehérje 237 és 244-es pozíciójában lévő lizineken végbemenő ubikvitináció olyan konformáció változásokat hoz létre, ami a katalitikus aktivitás elvesztéséhez vezet. Megmutattuk, hogy ennek háttérben az Elongin BC-Cul5- Rbx1-WSB1-USP33 fehérje komplex D2 homodimerekkel való folytonos asszociációja áll. Az USP33 (régi nevén VDU1) a D2 deubikvitinázaként képes az ubikvitináció okozta tranziens konformáció változás megszüntetésére. Így ez a mechanizmus lehetővé teszi, hogy az ubikvitináció nem kizárólag a D2 proteasomális lebomlása által hat a T3 szintézisre, hanem a D2 homodimerek inaktivációján keresztül képes a T3 előállítás gyors és visszafordítható szabályozására. Ez a feltárt mechanizmus az ubikvitináció-mediált fehérje funkciószabályozásnak egy eddig ismeretlen útvonalát képviseli. Ez a mechanizmus az ubikvitináció által a fehérjék működésében előidézett változások egy teljesen új útvonalának első példája lehet.

Munkánkat az Amerikai Pajzsmirigy Társaság éves konferenciájának kiemelt "short call" szekciójában előadás formájában mutathattuk majd az megjelent a Mol Cell Biology-ban (6)

Az idegrendszeri T3 termeléséért felelős kettes-típusú dehidáz (D2) enzim strukturális és funkcionális vizsgálata során feltártuk a homodimerizációnak az enzim térszerkezetének kialakításában játszott szerepét. E vizsgálatainkat most kiterjesztettük az enzimes család másik két - a D2-vel ellentétben nem ubikvitinálódó és nem az endoplazmatikus retikulumban, hanem plazmamembrán lokalizált - tagjára, a pajzsmirigyhormon inaktivációban szerepet játszó 1-es (D1) és 3-as (D3) típusú dehidáz enzimre. Megmutattuk, hogy mindkét fehérje homodimerizálódik, a dimert

egy transzmembrán és egy globuláris dimerizációs felszín tartja össze, ami eredményeink szerint a teljes dehidrogénáz enzimesaládra jellemző tulajdonság. Érdekes módon a D3 heterodimerizációra is képes a másik két dehidrogénáz enzimmel, aminek biológiai jelentősége jelenleg még nem világos. Munkánk megjelent a *Molecular Endocrinology*-ban (7).

A *dio2*/PORF lokusz vizsgálata során megkíséreltük promoter assay-vel felkutatni a D2 3'UTR potenciálisan PORF promoterként működő szakaszait, de az ezirányú kísérletek nem tudtak aktív transzkripciós komplexet azonosítani. A jelenleg elérhető egyetlen PORF1 antiszérumban citokémiában nem működött így a peptid *in vivo*, sejtszintű azonosítása jelenleg nem megoldható. PORF1-et expresszáló konstrukciót állítottunk elő, amire mesterséges epitópot is fuzionáltattunk. A PORF-1-et HEK293 sejtekben expresszáltuk, lokalizációja magi és mag körüli volt. Eredményeinkből egy egyetemi szakdolgozat született (8)

Az idegrendszeri T3 képződés és a centrális pajzsmirigyhormon szabályozás közötti összefüggések fejlődéstani vonatkozásainak jobb megértését célzó vizsgálatainkhoz klónoztuk a csirke *dio2* (*cdio2*) promotert és jellemeztük a 3.6 kb-os *cdio2* határoló régiót. Megállapítottuk, hogy a promóter cAMP és NF- κ B érzékeny, továbbá hogy az emberi *dio2*-höz hasonlóan, ill. a patkány *dio2* promotérral ellentétben, érzékeny az Nkx2.1 (TTF-1) transzkripciós faktorra. A csirke promotérnek csak a proximális szakasza konzervált az emberi *dio2* promotérral összehasonlítva. *In situ* hibridizációval ki tudtuk mutatni az Nkx2.1 expresszióját csirke tunicitákban. Emellett elvégeztük a tunicitális D2 expresszió ontogenetikus behatárolását is 13 napos csirke embrió, ill. újszülött, egy napos patkány mediobazális hipotalamuszában nagy érzékenységgel *in situ* hibridizációval sikerült kimutatnunk a D2 expresszióját, annak ellenére, hogy e területen ilyen fejlődési stádiumban az expresszió a korábbi módszerekkel nem volt detektálható. Meglepő módon a harmadik agykamra alatti béta-tuniciták expresszálják a fejlődés e stádiumában az enzimet, míg a kamra falának alfa-tunicitái nem. Ez a tuniciták al-típusainak eltérő expressziós mintázatára világít rá, és arra enged következtetni, hogy a közeli paraventriculáris magban elhelyezkedő TRH neuronok T3 feed-backjéhez szükséges T3 megtermelésében az eltérő tuniciták al-típusok az egyedfejlődés folyamán eltérő mértékben vesznek részt. A tunicitális D2

expresszió szabályozása csirkében adataink szerint függhet az Nkx2.1-től. A feltárt jelenség szerepet játszhat a hipotalamikus T3 képződés beindulásában és ezáltal a centrális pajzsmirigyhormon szabályozás kialakulásához szükséges T3 feed-back biztosításában (kézirat előkészületben).

Egy együttműködés keretében proteomikai vizsgálatokat végeztünk deiodáz-interakciós partnerek azonosítása céljából. Megmutattuk, hogy a 3-as típusú deiodáz (D3) enzim kapcsolódik egy Peroxiredoxin 3 (Prx3) nevű fehérjével. Prx3 hiányában a D3 aktivitás csökken, de a D3 fehérje mennyisége nem változik. Mivel a Prx3 fehérje redukáló hatást fejt ki, feltételezzük hogy az a D3 szelenoenzim eddig ismeretlen *in vivo* redox kofaktora lehet. Eredményeinket az Endocrine Society konferenciáján mutattuk be, majd az Endocrinology-ban közöltük (9).

A D1 enzim mRNS-ének daganatokban feltárt új poliformizmusai kapcsán a Thyroid felkérésére összefoglaltuk a poliformizmusok pajzsmirigyhormon aktivációban betöltött szerepével kapcsolatos aktuális ismereteket (10).

Felkérésre az Endocrine Reviews-ban, a legidézettebb endokrinológiai - és a biomedikai újságok felső egy százalékába tartozó - szaklapban egy nagyobb terjedelmű összefoglaló munkában tekintettük át pajzsmirigyhormon metabolizmus szabályozásának vizsgálata során elért eredményeinket, továbbá a terület legújabb fejleményeit (11).

- (1) Anikó Zeöld, Márton Doleschall, Michael C. Haffner, Luciane Capelo, Judit Menyhért, Zsolt Liposits, Antonio C. Bianco, Imre Kacs Kovics, Csaba Fekete and Balázs Gereben (2006)
Characterization of the NF- κ B responsiveness of the human dio2 gene
Endocrinology, 147(9):4419-29
IF: 5,236
- (2) Csaba Fekete, Beatriz C. G. Freitas, Anikó Zeöld, Gábor Wittmann, Andrea Kádár, Zsolt Liposits, Marcelo A. Christoffolete, Praful Singru, Ronald M. Lechan, Antonio C. Bianco and Balázs Gereben (2007)
Expression patterns of WSB-1 and USP-33 underlie cell-specific post-translational control of type 2 deiodinase (D2) in the rat brain
Endocrinology 148(10):4865-4874
IF: 5,045

- (3) Balázs Gereben, Anikó Zeöld, Monica Dentice, Domenico Salvatore, Antonio C. Bianco (2008)
Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences
Cell Mol Life Sci. 65(4):570-90.
IF: 5,511
- (4) Ann Marie Zavacki, Rafael Arrojo e Drigo, Beatriz C. G. Freitas, Mirra Chung, John W. Harney, Péter Egri, Gábor Wittmann, Csaba Fekete, Balázs Gereben, Antonio C. Bianco(2009)
The E3 ubiquitin ligase *teb4* mediates the degradation of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2)
Molecular Cell Biology 29(19):5339-47
IF: 5,942
- (5) Anikó Zeöld, Livia Pormüller, Monica Dentice, John W. Harney, Cyntia Curcio-Morelli, Susana M. Tente, Antonio C. Bianco, and Balázs Gereben (2006)
Metabolic instability of type 2 deiodinase is transferable to stable proteins independently of subcellular localization
J Biol Chem, 281(42):31538-31543
IF: 5,808
- (6) G. D. Vivek Sagar, Balázs Gereben, Isabelle Callebaut, Jean-Paul Mornon, Anikó Zeöld, Wagner S. da Silva, Cristina Luongo, Monica Dentice, Susana M. Tente, Beatriz C. G. Freitas, John W. Harney, Ann Marie Zavacki and Antonio C. Bianco (2007)¶
Ubiquitination-induced conformational change within the deiodinase dimer is a switch regulating enzyme activity.
*megosztott első szerzők
Mol Cell Biol. 27(13):4774-83
IF: 6,42
- (7) G. D. Vivek Sagar*, Balázs Gereben*, Isabelle Callebaut, Jean-P. Mornon, Anikó Zeöld, Cyntia Curcio-Morelli, John W. Harney, Cristina Luongo, Michelle A. Mulcahey, P. Reed Larsen, Stephen A. Huang and Antonio C. Bianco (2008)
The thyroid hormone inactivating deiodinase functions as homodimer
*megosztott első szerzők
Mol Endocrinology 22(6):1382–1393
IF: 5,389
- (8) Pormüller Livia (témavezető: Gereben Balázs) (2008)
A *dio2*/porf-1 génlókuszt vizsgálata
ELTE TTK, disszertáció

- (9) Goele Aerts, Rafael Arrojo e Drigo, Stijn L. J. Van Herck, Eva Sammels, Delphine M. Prunier, Balázs Gereben, Anikó Zeöld, John W. Harney, Stephen A. Huang, Michelle A. Mulcahey, Serge Van der Geyten, Gert Van den Bergh, Lut Arckens, Veerle M. Darras, Ann Marie Zavacki (2009)
Knock down of the Type 3 Iodothyronine Deiodinase (D3) Interacting Protein Peroxiredoxin 3 Decreases D3-Mediated Deiodination in Intact Cells
Endocrinology 150(11):5171-80
IF: 4,945
- (10) Balázs Gereben and Antonio C Bianco (2009)
Covering the Base-Pairs in Iodothyronine Deiodinase-1 Biology, Holes Remain in the Lineup
Thyroid 19(10):1027-1029
IF: 3,0
- (11) Balázs Gereben, Ann Marie Zavacki, Scott Ribich, Brian W. Kim, Stephen A. Huang, Warner S. Simonides, Anikó Zeöld and Antonio C. Bianco (2008)
Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling
Endocrine Reviews 29(7): 898-938
IF: 18,562

Válogatott előadások a pályázat témájában

Aniko Zeöld, Marton Doleschall, Imre Kacs Kovics, Csaba Fekete, Balazs Gereben (2005)
Characterization of the NF- κ B responsiveness of the human dio2 gene
Thyroid 15 Suppl 1 #O68, International Thyroid Congress, Buenos Aires, Argentina

Balázs Gereben, Anikó Zeöld, Monica Dentice, John W Harney, Susana M. Tente, Antonio C. Bianco (2006)
D2 metabolic instability is independent of subcellular localization and confined to six amino acids
#O6, 31st Annual Meeting of the European Thyroid Association, Naples

Gereben Balázs (2005)
Az idegrendszeri pajzsmirigyhormon aktiváció szabályozásának új mechanizmusai
Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekklinika, Budapest

Balázs Gereben, Anikó Zeöld, Monica Dentice, John W Harney, Susana M. Tente, Antonio C. Bianco (2006)
D2 metabolic instability is independent of subcellular localization and confined to six amino acids
#O6, 31st Annual Meeting of the European Thyroid Association, Naples

Gereben Balázs (2006)
A deiodázok szerepe: a T3 szint szabályozásának új mechanizmusai
Országos Gyógyintézeti Központ Budapest, Endokrinológiai Továbbképzés

Balázs Gereben, G. D. Vivek Sagar, Isabelle Callebaut, Jean-Paul Mornon, Anikó Zeöld, Beatriz C. G. Freitas, Cyntia Curcio-Morelli, John W. Harney, Ann Marie Zavacki and Antonio C. Bianco (2006)

Ubiquitination-Induced Dimer Destabilization Is A Switch Regulating Enzymatic Activity of the type 2 deiodinase,
#216, 77th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Phoenix AZ

Ann Marie Zavacki, John W. Harney, Jing Li, Balázs Gereben, Csaba Fekete, Antonio C. Bianco (2007)

TEB4 is an endoplasmic reticulum ubiquitin ligase that mediates type 2 iodothyronine deiodinase (D2) degradation.
OR7-1, 89th Annual Meeting of the Endocrine Society

Balázs Gereben (2007)

Thyroid hormone metabolism via deiodination: local action, general consequences.
Arbeitstagung Experimentellen Schilddrüsen-Forschung, Lübeck, Germany

Balázs Gereben (2008)

Regulation of thyroid hormone activation by type 2 deiodinase
Annual Meeting of the Hungarian Society of Endocrinology and Metabolism
Symposium: New aspects in thyroidology: from the bench to bedside, Eger