

CHAPTER 8

Summary/Samenvatting

<http://hdl.handle.net/1765/119488>

8

SUMMARY

Thyroid hormone (TH) is indispensable for normal growth, development, and metabolic homeostasis. The principal action of TH is transcriptional gene regulation (genomic actions), which is mediated by binding of TH to thyroid hormone receptors (TRs). Two major forms of TH are produced from the thyroid gland under tight regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis, namely 3,3',5,5'-tetraiodothyronine or thyroxine (T4), and 3,3',5-triiodothyronine (T3). T3 is the bioactive hormone, whereas T4 is a prohormone, since T3 binds to TRs with a higher affinity than T4. However, the mechanism underlying this difference in affinity has received marginal attention.

There are three functional isoforms of TRs that are capable of binding T3 and controlling gene transcription, namely TR α 1, TR β 1, and TR β 2. TR α 1 is encoded by the *THRA* gene on chromosome 17, and TR β 1 and TR β 2 are encoded by the *THRB* gene on chromosome 3. TRs mainly heterodimerize with the retinoid X receptor (RXR) and bind to thyroid hormone response elements (TREs) to regulate gene transcription. In the absence of T3, the TRs recruit corepressor proteins to repress transcription of positively regulated genes. In the presence of T3, TRs then release the corepressors and recruit coactivators to induce gene transcriptional activation. Mutations of the TRs cause resistance to thyroid hormone (RTH) that results in two distinct disorders; RTH α and RTH β , dependent on *THRA* and *THRB* mutations, respectively.

This thesis focuses on the complexity of the genomic actions of TH. **Chapter 1** provides a general introduction of TH actions, especially the function of TRs and genetic abnormalities that cause RTH. The general aims and outline of this thesis are also presented in this chapter. **Chapter 2** describes the role of Leu341 in TR β function, prompted by the identification of a novel mutation, TR β 1-L341V, as a cause of RTH β . By using an *in silico* prediction model and a pipeline of *in vitro* studies (T3 binding assays, electromobility shift assays, transcriptional activity assays, and protein-protein interaction [two-hybrid] assays). Our study shows that the direct interaction between Leu341 and T3 and the microarchitecture formed by interactions between Leu341 and its surrounding residues are required for optimal T3 binding affinity and T3-induced transcriptional activity of TR β 1. **Chapter 3** unravels the molecular and structural mechanism underlying the differences in biological activity of T3 and T4, prompted by the identification of a novel TR α 1-M256T mutation and the previously reported TR β 1-M310T mutations in RTH α and RTH β patients, respectively. We found that these mutations have a greater impact on the affinity of T3 than of T4 for the receptors. This finding suggests that Met256 in TR α 1 and the equivalent Met310 in TR β 1 are important for T3 versus T4 discrimination and may partially explain the underlying molecular and structural basis for the role of T4 as a prohormone and T3 as a biologically active hormone in a widely accepted concept of TH physiology.

To date, 25 mutations (in a total of 40 patients) have been identified as a cause of RTH α . The increase in the number of patients allowed us to study the variability in patients' phenotype. So far, the underlying molecular mechanisms to explain this variation have not yet been clearly established. In **chapter 4**, we investigate the factors that contribute to the differential impaired transcriptional activity of seven TR α missense mutations, four of which are derived from RTH α patients. The results show that reduced T3 binding affinity is the predominant factor that determines the severity of impaired transcriptional activation and defective interactions with the cofactor NCoR1 and SRC1. In addition, the degree of reduced T3 binding affinity and impaired transcriptional activation of the mutants seems to be related to the phenotype of the patients. In **chapter 5**, we study the difference of the neurological phenotype found in two RTH α patients carrying TR α 1-C380fsx387 and TR α 1-F397fsx406 truncating mutations that both entirely abolish T3 binding affinity. The transcriptomes of these two mutants in a human neuronal cell line show that the TR α 1-C380fsx387 mutant alters baseline gene expression to a larger and different extent than the TR α 1-F397fsx406 mutant, which is in agreement with the more severe cognitive impairment of the patient carrying the TR α 1-C380fsx387 mutation. This finding suggests that the effect of the mutants on gene expression is not only due to the reduced T3 binding, but that other defects in receptor function may contribute to the differences in the phenotype of patients.

As mentioned previously, nuclear coregulatory proteins are important in transcriptional gene regulation by TRs. Understanding the complexity of TR-cofactor interactions will gain more insight into mechanisms of disease in RTH. In **chapter 6**, we used an unbiased approach using a tandem-affinity TR purification technique to identify the interactomes of TRs. **Chapter 6a** focuses on the cell-type specific coregulatory protein recruitment of TR α 1 by performing the experiments in human liver and neuronal cell lines. In general, TR α 1 uses common nuclear coregulatory proteins to regulate gene transcription in these two cell types. However, some proteins are likely to interact with TR α 1 in a cell-type specific manner. **Chapter 6b** focuses on the isoform-dependent (TR α 1 versus TR β 1) coregulatory protein recruitment by TRs in a human neuronal cell line in order to understand the complexity of TR actions in the brain. We show that the majority of identified proteins were associated with both TR α 1 and TR β 1, suggesting that both TR isoforms associate with common nuclear coregulatory proteins to regulate gene transcription. However, a subset of nuclear proteins interacts with TRs in an isoform-specific manner. These findings expand the knowledge about the interaction between TRs and coregulatory proteins in transcriptional gene regulation and may provide more understanding about the impact of TR mutations in RTH syndromes.

Finally, in **chapter 7**, we discuss the findings presented in this thesis in light of the currently available literature. The possible implications of these studies and future perspective are also suggested.

SAMENVATTING

Schildklierhormoon (TH) is onmisbaar voor normale groei, ontwikkeling en metabole homeostase. De belangrijkste actie van TH is transcriptionele genregulatie (genomische acties) dat wordt gemedieerd door binding van TH aan schildklierhormoonreceptoren (TRs). Twee belangrijke vormen van TH worden geproduceerd door de schildklier onder strikte regulering door de hypothalamus-hypofyse-schildklier (HPT) as, namelijk 3,3',5,5' tetraiodothyronine of thyroxine (T₄), en 3,3',5- triiodothyronine (T₃). T₃ is het biologisch actieve hormoon, terwijl T₄ een prohormoon is, aangezien T₃ met een hogere affiniteit aan de TR bindt dan T₄. Het mechanisme dat aan dit verschil in affiniteit ten grondslag ligt heeft echter slecht beperkte aandacht gekregen.

Er zijn drie functionele TR isovormen die in staat zijn om T₃ te binden en gentranscriptie te reguleren, namelijk TR α 1, TR β 1 en TR β 2. TR α 1 wordt gecodeerd door het THRA-gen op chromosoom 17 en TR β 1 en TR β 2 worden gecodeerd door het THRB-gen op chromosoom 3. TRs heterodimeriseren voornamelijk met retinoïde X-receptoren (RXR) en reguleren gentranscriptie via binding aan schildklierhormoon respons elementen (TRE's). Bij afwezigheid van T₃ binden de TRs aan corepressor-eiwitten waardoor de transcriptie van positief gereguleerde genen wordt onderdrukt. In de aanwezigheid van T₃ worden de corepressoren uitgewisseld voor co-activatoren, wat vervolgens gentranscriptie te induceert. Mutaties in de TRs zijn de oorzaak van twee verschillende vormen van resistentie tegen schildklierhormoon (RTH), namelijk RTH α en β door mutaties in respectievelijk THRA en THRB.

Dit proefschrift gaat over de complexiteit van de genomische acties van TH. **Hoofdstuk 1** geeft een algemene inleiding over TH werking, met name de functie van TRs en genetische afwijkingen in TRs die RTH veroorzaken. De algemene doelstellingen en de rode draad van dit proefschrift worden ook in dit hoofdstuk gepresenteerd. **Hoofdstuk 2** beschrijft de rol van Leu341 in de werking van TR β , naar aanleiding van de identificatie van een nieuwe mutatie, TR β 1-L341V gevonden in een RTH β patiënt. Deze mutatie is getest door gebruik te maken van een voorspellend in silico model en een pijlprijs van in vitro-onderzoeken (T₃-bindingsassays, elektroforetische mobiliteit shift assay, transcriptionele activiteit assays en eiwit-eiwit interacties [twee-hybride] assays). Onze studie toont aan dat de directe interactie tussen Leu341 en T₃ en de microarchitectuur gevormd door interacties tussen Leu341 en de omliggende residuen vereist zijn voor een optimale bindingsaffiniteit voor T₃ en T₃-geïnduceerde transcriptionele activiteit van TR β 1. **Hoofdstuk 3** ontrafelt het moleculaire en structurele mechanisme dat ten grondslag ligt aan de verschillen in de biologische activiteit van T₃ en T₄, naar aanleiding van de identificatie van respectievelijk een nieuwe TR α 1-M256T mutatie en de eerder gemelde TR β 1-M310T-mutatie in RTH α - en RTH β -patiënten. We vonden dat deze mutaties een grotere impact hebben op de affiniteit van de receptoren voor T₃ dan voor T₄. Deze bevinding suggereert dat Met256 in TR α 1 en de equivalente Met310 in TR β 1 belangrijk zijn voor het T₃- versus T₄-onderscheid en kan deels de onderliggende moleculaire

en structurele basis voor de rol van T4 als een prohormoon en T3 als een biologisch actief hormoon verklaren, binnen een algemeen geaccepteerd concept van TH fysiologie.

Tot op heden zijn 25 mutaties (in totaal 40 patiënten) geïdentificeerd die RTH α veroorzaken. Een toename van het aantal patiënten stelt ons in staat de variabiliteit van het fenotype van de patiënten te bestuderen. Tot dusverre is het onderliggende moleculaire mechanisme om de variatie te verklaren nog niet duidelijk opgehelderd. In **hoofdstuk 4** hebben we de factoren onderzocht die bijdragen aan de differentieel gestoorde transcriptionele activiteit van zeven TR α -mutaties, waarvan er vier zijn afgeleid van RTH α -patiënten. De resultaten tonen aan dat verminderde T3-bindingsaffiniteit de belangrijkste factor is die de mate van de verminderde transcriptionele activiteit en interacties met de cofactoren NCoR1 en SRC1 bepaalt. Bovendien lijkt de mate van verminderde bindingsaffiniteit voor T3 en verminderde transcriptionele activiteit van de mutanten gerelateerd te zijn aan het fenotype van de patiënten. In **hoofdstuk 5** bestuderen we het verschil in het neurologisch fenotype gevonden in twee RTH α -patiënten, één met een TR α 1-C380fsx387 mutatie en één met een TR α 1-F397fsx406 truncerende mutatie, die beide de binding van T3 volledig opheffen. De transcriptomen van deze twee mutanten in een menselijke neuronale cellijn laten zien dat de TR α 1-C380fsx387 mutant de baseline genexpressie in een grotere mate verandert dan de TR α 1-F397fsx406 mutant, wat in overeenstemming is met de ernstigere cognitieve stoornissen van de patiënt met de TR α 1-C380fsx387 mutatie. Deze bevinding suggereert dat het effect van de mutanten op genexpressie niet enkel wordt veroorzaakt door een verminderde T3-binding, maar dat andere defecten in receptor functie kunnen bijdragen aan de verschillen in het fenotype van patiënten.

Zoals eerder vermeld, zijn nucleaire coregulatorische eiwitten belangrijk voor de transcriptionele regulatie door TRs. Het begrijpen van de complexiteit van de TR-cofactor interacties kan verder inzicht geven in de impact van TR-mutaties bij RTH-syndromen, naast het effect op T3-binding. In **hoofdstuk 6** hebben we een hypothese vrije benadering gebruikt door middels een tandem-affiniteitszuiveringstechniek de interactomen van TRs te identificeren. **Hoofdstuk 6a** is gericht op de celtype specifieke associatie van coregulatorische eiwitten met TR α 1 door de identificatie van de interactomen in zowel een menselijke lever als neuronale cellijn. Over het algemeen gebruikt TR α 1 dezelfde nucleaire coregulatorische eiwitten om gentranscriptie in deze twee celtypen te reguleren. Het is echter waarschijnlijk dat sommige eiwitten interacties aangaan met TR α 1 op een celtype specifieke manier. **Hoofdstuk 6b** is gericht op de isovorm-afhankelijke (TR α 1 versus TR β 1) coregulatorische eiwit interacties in een menselijke neuronale cellijn, om de complexiteit van TR-werking in de hersenen te begrijpen. We laten zien dat de meerderheid van de geïdentificeerde eiwitten geassocieerd was met zowel TR α 1 als TR β 1, wat suggereert dat beide TR-isovormen associëren met dezelfde nucleaire coregulatorische eiwitten om gentranscriptie te reguleren. Een aantal nucleaire eiwitten bindt echter aan TRs op een isovormspecifieke manier. Deze bevindingen vergroten de kennis over de interactie tussen TRs en coregulatorische eiwitten tijdens transcriptionele genregulatie en kunnen meer inzicht verschaffen in het effect van TR-mutaties bij RTH-syndromen, naast het effect op T3-binding.

Tot slot bespreken we in **hoofdstuk 7** de bevindingen uit dit proefschrift in het kader van de momenteel beschikbare literatuur. De mogelijke implicaties van deze studies en het toekomstperspectief worden ook besproken.

