

A Hsp90 és az adipogenezis kapcsolatának vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Nguyen Minh Tu

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sőti Csaba egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Zsuzsanna klinikai kutatási munkatárs, Ph.D.
Dr. Patócs Attila laboratórium vezető, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hably Csilla egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Horváth Ibolya tud. főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés	7
1.1. A hősokkfehérjék	8
1.2. A Hsp90 chaperon	8
1.2.1. A Hsp90 fehérje szerkezete	8
1.2.2. A Hsp90 sejten belüli elhelyezkedése	10
1.2.3. A Hsp90 transzkripciós szabályozása	11
1.2.4. A Hsp90 ATPáz ciklusa.....	11
1.2.5. A Hsp90 chaperon ciklusa és szabályozása.....	13
1.2.5.1. Ko-chaperonok általi reguláció.....	13
1.2.5.2. Poszt-transzlációs szabályozás.....	15
1.2.6. A Hsp90 biológiai funkciója és kliensei	16
1.2.7. Hogyan ismeri fel a Hsp90 a klienseit?	18
1.2.8. A Hsp90 szerepe a kliens fehérjék degradációjában	19
1.2.9. A Hsp90 gátlószerei	20
1.3. Az elhízás és a metabolikus szindróma.....	21
1.4. A zsírszövet	21
1.5. A fehér zsírszövet és a metabolikus szindróma.....	22
1.6. Az adipogenezis	23
1.7. Az adipogenezis modellje	25
1.8. Az adipogenezis effektorai	25
1.8.1. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok családja	25
1.8.2. A PPAR γ	28
1.8.3. C/EBP transzkripciós faktorok.....	32
1.8.4. Kruppel-szerű transzkripciós faktorok.....	33
1.8.5. További effektorok.....	34
1.9. Metabolikus szindróma és fehérje homeosztázis	34
2. Célkitűzések	36
3. Módszerek.....	37
3.1. Anyagok, konstruktok	37
3.2. Sejtkultúra (3T3-L1, HepG2).....	37
3.3. Adipocita differenciáció és kezelések	37
3.4. Oil red O festés, fénymikroszkópia és abszorpció mérés.....	39
3.5. Sejtek lízise	39
3.6. Fehérje koncentráció meghatározás	40
3.7. A Hsp90-PPAR γ in vivo komplexének vizsgálata immunprecipitációval	40
3.8. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE).....	40
3.9. Western blot	41
3.10. Sejtek viabilitásának vizsgálata.....	41
3.11. Az mRNS expresszió vizsgálata qRT-PCR módszerrel	41
3.12. Statisztikai elemzés.....	42
4. Eredmények	43
4.1. A Hsp90 gátlása gátolja 3T3-L1 sejtek differenciációját és túlélését	43
4.2. A Hsp90 gátlása csökkenti a PPAR γ fehérje szintjét 3T3-L1 sejtekben.....	47

4.3. A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatás gátlása a PPAR γ destabilizációját és proteasomális lebontását idézi elő	53
4.4. A Hsp90 működése szükséges a PPAR γ transzkripciós funkciójához.....	55
4.5. A Hsp90 funkció biztosítja az érett adipociták túlélését.....	57
4.6. A proteotoxikus stressz felfüggeszti a PPAR γ stabilizációját és leállítja az adipogenezist	59
4.7. A stresszből való felépülés helyreállítja a PPAR γ stabilitást és az adipocita differenciációs programot.....	64
5. Megbeszélés.....	70
5.1. A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatással kapcsolatos szerkezeti megfontolások	70
5.2. A Hsp90 szerepe a zsírsejtek élettani folyamataiban	73
5.3. A Hsp90-PPAR γ komplex stabilitása összekapcsolja a proteosztázist az adipogenezissel	74
5.4. Terápiás vonatkozások	76
6. Következtetések.....	79
7. Összefoglalás	80
8. Summary	81
9. Irodalomjegyzék	82
10. Saját publikációk jegyzéke	105
11. Köszönetnyilvánítás	107

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3T3-L1: rágcsáló NIH-3T3 fibroblasztokból származtatott preadipocita sejtvonal
ACBP: acil-KoA-kötő fehérje
ACC: acetyl-CoA karboxikináz
ACS: acil-KoA szintetáz
ADP: adenzin-5'-difoszfát
Aha1: "activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1", ko-chaperon
Akt: protein-kináz B
AMPK: 5'-AMP-aktivált protein kináz
AP-1: aktiváló protein 1
aP2: adipocita protein 2
ATTC: American Type Culture Collection, sejtbank
bZIP: bázikus leucin cipzár
C/EBP α , C/EBP δ és C/EBP β : CCAAT/ enhancer-kötő α , δ és β fehérjék
CAP: c-Cbl-asszociált fehérje
CBP: CREB-kötő fehérje
CD36: "cluster of differentiation 36" fehérje
Cdc2: ciklin-dependens kináz 1
Cdc37: ko-chaperon
CDK1, 5: ciklin-dependens kináz1, 5
CHIP: "C terminus of Hsp70-interacting protein" ubikvitin ligáz
Cigl: ciglitizon
cRaf: celluláris "Rapidly Accelerated Fibrosarcoma" fehérje kináz
CRE: cAMP reszponzív elem
CREB: cAMP reszponzív elem kötő fehérje
Dex: dexametazon
DLK-1: delta-szerű protein 1
DMSO: dimetil-szulfoxid
DTT: D,L-ditiotreitol
eIF4E: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E
eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid szintáz

ERK-1: extracelluláris szignál regulált kináz-1
FGF1, 21: fibroblaszt növekedési faktor 1, 21
GA: geldanamycin
GATA faktor: a DNS "GATA" szekvenciáit kötő transzkripció faktor
GCN5: hiszton acetiltranszferáz GCN5
GLUT4: 4-es típusú glükóz-transzporter
GR: glükokortikoid receptor
GSK-3: glikogén szintáz kináz-3
GyK: glicerín-kináz
HDAC1: hiszton deacetiláz 1
HepG2: human hepatóma sejt vonal
HIF1 α : "hypoxia-inducible factor 1 α " fehérje
Hop: Hsc70 and Hsp90-organizáló fehérje (p60)
HSF1: hő sokk transzkripció faktor 1
Hsp90: hő sokk fehérje 90
IBMX: 3-izobutil-1-metilxantin
IC50: a maximális gátlóhatást okozó koncentráció fele
IGF1: inzulin-szerű növekedési faktor 1
IKK: kappaB kináz inhibitor
IP: immunprecipitáció
IRS-1, IRS-2: inzulin receptor szubsztrát 1, 2
JNK: c-jun N terminális kináz
KLF: Kruppel-szerű transzkripció faktor
LPL: lipoprotein lipáz
LY294002: PI3K gátlószer
MG132: proteaszóma gátlószer
MR: mineralokortikoid receptor
MYF5: miogén faktor 5
NB: novobiocin
NF κ B: "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells" fehérje
NP-40: Nonidet P-40
NR: nukleáris receptor szupercsalád

P-body: “processing body”

p23: ko-chaperon

PAX7: “paired box 7” fehérje

PBS: foszfát pufferolt sóoldat

PCAF: p300/CBP-asszociált faktor

PEPCK: foszfoenolpiruvát-karboxikináz

PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz

piRNS: Piwi-asszociált RNS

PKA: protein kináz A

PPAR γ FKO : zsírszövet-specifikus PPAR γ génkiütött egér

PPAR γ : peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor γ

PPRE : PPAR γ reszponzív elem

Ppt 1: protein foszfatáz 1

PREF-1 preadipocita faktor 1

qRT-PCR: kvantitatív valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció

RAB3A, 3B: kis GTP-áz

RISC: “RNA-induced silencing complex”

RXR : retinoid X receptor

SGT1: ko-chaperon

SREBP-1: “sterol regulatory element-binding protein 1”

STAT: “signal transducer and activator of transcription” fehérje

SUMO: “small ubiquitin-like modifier”

TERT: telomeráz reverz transzkriptáz

TGF β : transzformáló növekedési factor β

TPR: tetratrikopeptid ismétlődés

TZD: tiazolidindion

UCP1, 3: szétkapcsoló fehérje 1, 3

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

VHL: von Hippel-Lindau fehérje

WB: Western blot

Wnt: “Wingless-related integration-1” fehérje

1. BEVEZETÉS

Napjainkra az elhízás komoly egészségügyi problémává vált az egész világon. Az elhízás és a zsírszövet diszfunkciója számos betegség kóroki tényezője. Ilyen betegség például az inzulin rezisztencia, a 2-es típusú cukorbetegség, a magas vérnyomás, különböző szív- és érrendszeri betegségek, valamint a rák (1-3). A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) a zsírszövet mester regulátora, szükséges a zsírszövet fejlődéséhez, funkciójához és a szervezet adekvát inzulinérzékenységének kialakításához.

A fehérje konformációs homeosztázis (proteosztázis) folyamatos fenntartása és stresszek esetén fokozott védelme kiemelt jelentőséggel bír a sejt túlélésben és működésben. Az erre specializálódott javító-védő hőszokk fehérjék (molekuláris chaperonok) családjának egyik fontos tagja az esszenciális, konzervált szerkezetű Hsp90 hőszokk fehérje. A Hsp90 instabil fehérjékhez kötve tartja fent aktív konformációjukat. Instabil fehérjék lehetnek a különböző proteotoxikus stresszek következtében denaturálódott fehérjék, illetve olyanok, amelyek funkcionális konformációjuk és működésük fenntartásához stresszmentes körülmények között is igénylik a Hsp90 jelenlétét. Utóbbiakat klienseknek nevezük. A Hsp90-nek több száz kliense van, amelyek a jelátviteli hálózat csomópontjaiban, leginkább a daganatos transzformációban szerepet játszó növekedési és túlélési jelpályák kulcsfontosságú pontjaiban találhatók. Kevésbé tanulmányozott a Hsp90 differenciációs folyamatokban való részvétele.

Doktori munkám során arra kerestem választ, hogy vajon a Hsp90 és a proteotoxikus stressz hogyan befolyásolja a zsírsejtek differenciációját, és ennek mi a molekuláris mechanizmusa.

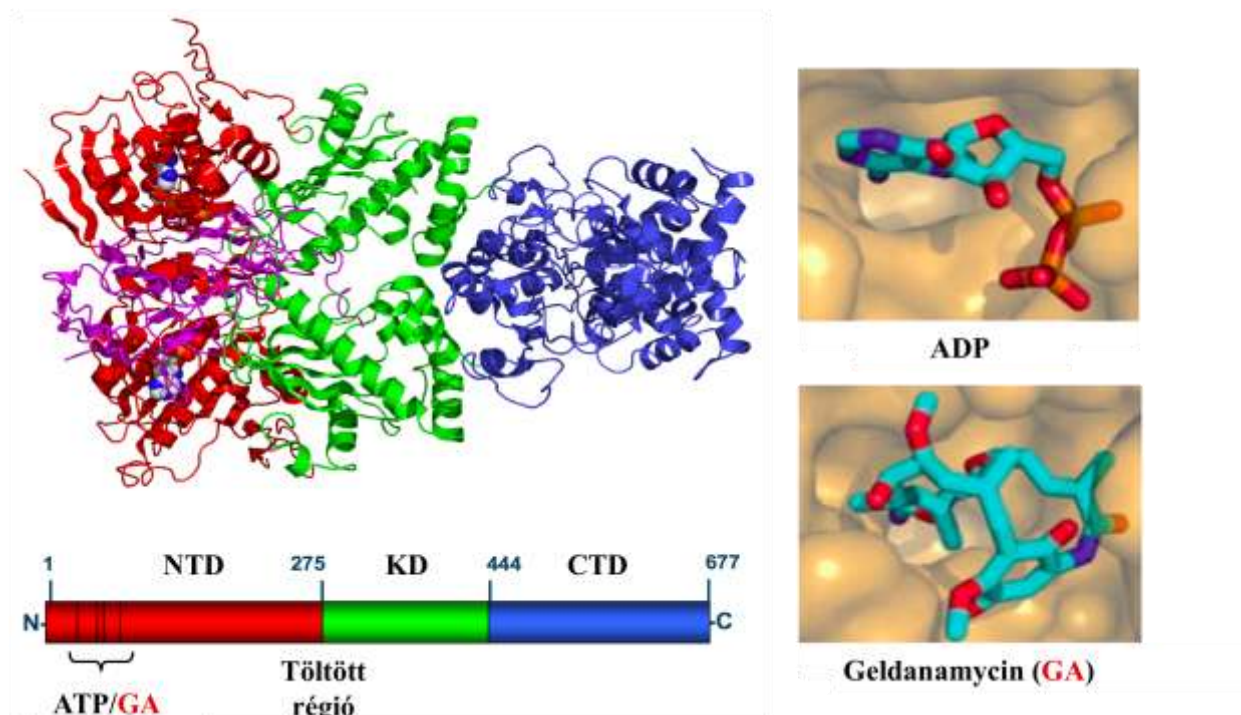
1.1. A hősokkfehérjék

A molekuláris chaperonok, más néven hősokkfehérjék nevüket onnan kapták, hogy hősokk hatására indukálódnak. A chaperonok segítenek az újonnan szintetizált fehérjéknek elérni a biológiailag aktív szerkezetüket és sejten belüli helyüket (4), részt vesznek a makromolekuláris komplexek összeszerelésében és szétszedésében (5), transzlokációjában, a denaturált fehérjékhez kötődve segítik újra elérniük natív szerkezetüket, ezáltal a fehérje aggregátumok kialakulását is megakadályozzák (6). A javíthatatlan szerkezetű fehérjéket az ubikvitin-proteaszóma rendszer felé irányítják (7).

1.2. A Hsp90 chaperon

1.2.1. A Hsp90 fehérje szerkezete

A Hsp90 egy 90 kDa molekulatömegű, rendkívül konzervált szerkezetű citoszolikus hősokkfehérje (8, 9). Két izoformája, a Hsp90 α és a Hsp90 β mintegy 86 %-os szekvencia azonosságot mutat (10). A Hsp90 fehérje három doménből áll. N-terminális ATP-kötő doménjét egy kb. 70 aminosavból álló erősen töltött, rendezetlen szerkezetű zsanér-régió kapcsolja a középső szubsztrátkötő doménhez, melyet a C-terminális dimerizációs domén követ (**1. ábra**).



1. ábra A Hsp90 szerkezete és nukleotidkötő helye.

(a) A Hsp90 dimer röntgen diffrakciós képe és a Hsp90 domén szerkezete. Az ábrán a teljes hosszúságú, zárt állapotú élesztő Hsp90 dimer látható egy ATP analóggal és a p23 ko-chaperonnal. A Hsp90 N-terminális domént (NTD), töltött régiót, középső domént (KD) és C-terminális domént (CTD) tartalmaz. (b) ADP és geldanamycin kötése az NTD-n lévő nukleotidkötő zsebbe. Taipale és munkatársai összefoglaló munkája alapján (9).

Az N-terminális nukleotid kötő domén az ATP kötésért és hidrolíziséért felelős (1. ábra). Szerkezete homológ a GHKL (giráz, hisztidin kináz, MutL) szupercsalád ATPáz doménjeivel (11). Az ATP kötőhely kétrétegű α/β szendvics motívumot tartalmaz (11), és helyet ad a Hsp90 természetes specifikus gátlószerének, a geldanamycinnek (12-14). Az N-terminális doménban levő konzervált aminosavak oldalláncai egy kis fedelet alkotnak, mely rázárul a nukleotid-kötőhelyre annak ATP-kötött állapotában és elősegíti a Hsp90 dimer két N-terminális doménjének dimerizációját (15). A hatékony ATP hidrolízishez szükség van a nukleotid kötőhely és a középső domén kölcsönhatására, valamint a homodimert alkotó monomerek N-terminálisának kapcsolatára is (16-18).

Az N-terminális domén a töltött régió keresztül kapcsolódik a középső doménhez. A töltött doménban fellépő mutációk nemcsak a kliens aktivációt gyengítik, hanem a ko-chaperonok általi szabályozást is gátolják (19-21). A középső doménnek fontos szerepe van az instabil fehérje szegmensek, így a kliensfehérjék felismerésben, bár ennek mikéntje ma sem ismert (9, 17).

A C-terminális domén szerkezetét tekintve kevésbé konzervált. Elsősorban a Hsp90 dimerizációjáért és bizonyos, tetratrikopeptid ismétlődést tartalmazó ko-chaperonokkal kialakított kölcsönhatásért felelős (22, 23). A 662-678. aminosav közötti hidrofób szegmens deléciója a dimerek szétesését okozza. Ugyanez a régió – feltehetően a dimerképzésen keresztül – a kliensfehérje kötésben is elengedhetetlen (24). A C-terminális domén szintén tartalmaz egy, az N-terminálistól eltérő szerkezetű és specificitású nukleotidkötőhelyet, melyhez a 662-678-as szegmens jelenléte szükséges (16, 25, 26). Ezen kötőhely élettani jelentősége a mai napig ismeretlen, azonban szelektíven megcélozható novobiocinnal és ciszplatinnal (16, 27, 28).

1.2.2. A Hsp90 sejtben belüli elhelyezkedése

A Hsp90 a citoplazma egyik legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjéje (8). Stresszmentes körülmények között a sejt összfehérje tartalmának mindegy 1-2%-át alkotja, mely stressz hatására 5% fölé emelkedhet (29). Ugyan a Hsp90 család számos kompartment-specifikus Hsp90 paralógból áll, különféle stimulusok illetve stressz hatására a Hsp90 önmaga is a sejtmagba vagy más sejtorganellekbe transzlokálódhat (30, 31). A Hsp90 fontos szerepet tölthet be a sejt alapvázának a fenntartásában is (32). A Hsp90 α szekrécióra képes, jelenlétét például az extracelluláris mátrixban is kimutatták, ahol a daganat metasztázisában fontos metalloproteináz-2 enzimet dajkálja (33). Ez a kölcsönhatás farmakológiásan is megcélozható (34).

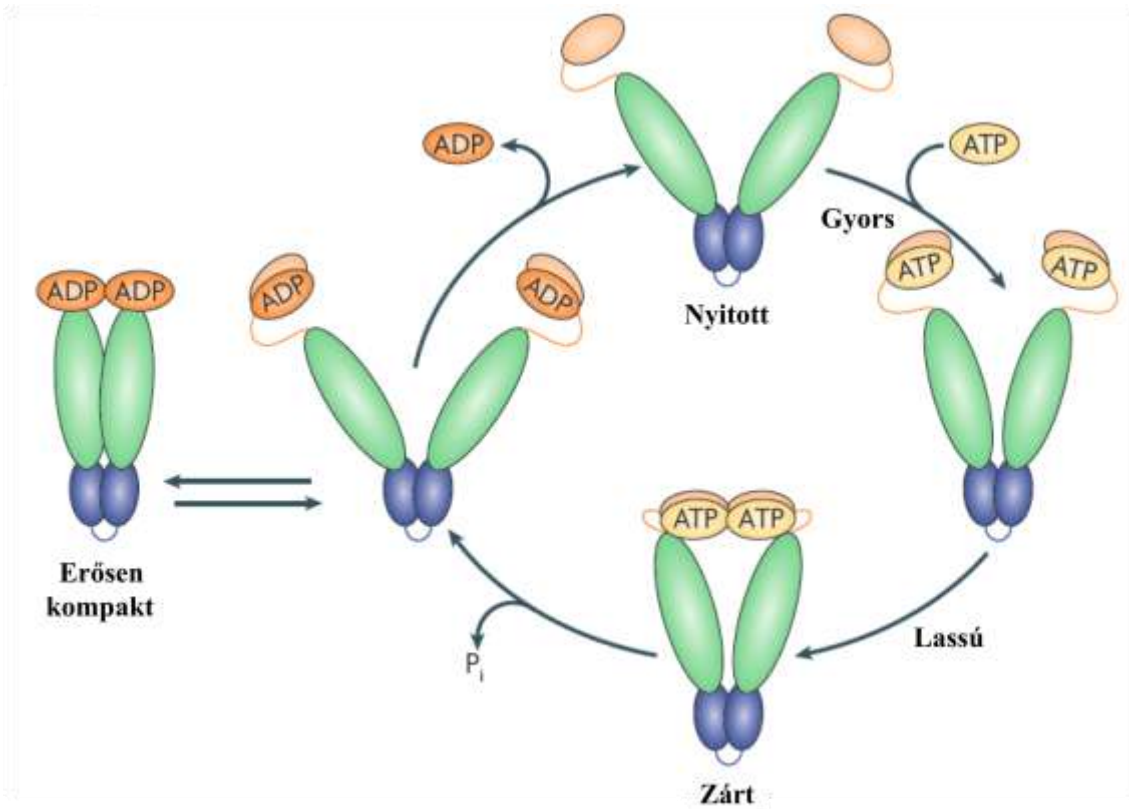
1.2.3. A Hsp90 transzkripció szabályozása

Az eukarióta sejtben a Hsp90 két izoformáját különíthetjük el, a konstitutívan termelődő, minden szövetben előforduló Hsp90 β -t és a stresszhatásra indukálódó Hsp90 α -t (35). Stresszmentes körülmények között a legfőbb hő sokk transzkripció faktor HSF1-et a Hsp90 egy inaktív komplexben tartja, amely megakadályozza a HSF1 inadekvát aktivációját (36). Stressz hatására a HSF1 ledisszociál a Hsp90-ról, majd a sejtmagba kerülve indukálja a Hsp90 α és több száz más fehérje transzkripcióját (37). A Hsp90 így saját transzkripciójának szabályozásában is részt vesz. A HSF1-en kívül más faktorok is regulálják a Hsp90 expresszióját. Ilyen faktorok például az immunválaszban résztvevő NF κ B (38), a C/EBP δ , valamint az interleukin-6 stimulációt követően a STAT3, illetve interferon- γ stimulációt követően a STAT1 (39). Ezek a transzkripció faktorok a HSF1-gyel eltérő módon kölcsönhatnak, például a STAT1 a HSF1-gyel szinergizál, míg a STAT3 és a HSF1 egymás működését antagonizálják (40, 41).

1.2.4. A Hsp90 ATPáz ciklusa

A Hsp90 klienseit egy ATP kötéséhez és hidrolíziséhez kapcsolt ciklikus folyamat során ismeri fel és stabilizálja (42). Az ATP ciklust a fehérje flexibilis szerkezete által lehetővé váló nagymértékű és dinamikus konformáció változások sorozata hajtja (**2. ábra**). Kezdetben úgy vélték, hogy az ATP kötése elősegíti a nyitott állapotból (ADP-kötött) a zárt állapotba (ATP-kötött) történő átmenetet, azonban számottevő ATP-áz aktivitást nem találtak (43-45). Később, szerkezet- és mutagenézis vizsgálatok alapján valószínűsítették, hogy a Hsp90 chaperon ciklusához a teljes, dimer fehérje és az ATP rendkívül lassú, koordinált hidrolízise is szükséges (15, 46, 47). Az ATP hidrolíziséhez a magasfokú konformációs rugalmasságot a sejtben különböző ko-chaperonokkal való kölcsönhatás facilitálja (48-50). Nemrégiben elektron mikroszkóp segítségével individuális *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* és humán Hsp90 molekulákat vizsgáltak (51). Meglepő módon kiderült, hogy a többi chaperonnal és a legtöbb nukleotid-kötő fehérjével ellentétben az ATP bekötése a Hsp90-et nem egy

specifikus konformációba hozza, hanem az egyensúlyt tolja el olyan konformációs állapotok felé, melyeknél a Hsp90 szerkezete zártabbá és aktívabbá válik. Ezen kívül különböző környezeti faktorok, úgy mint a hőmérséklet, a pH és átmenetifém anionok szintén befolyásolhatják a Hsp90 konformációs egyensúlyát (52-55).



2. ábra A Hsp90 ATP-áz ciklusa.

A Hsp90 ATP kötés hatására zárt konformációt vesz fel. Az ATP hidrolízise egy szerkezeti még nem tisztázott állapotot hoz létre. Az ADP disszociációjával helyreáll a nyitott állapot. Taipale és munkatársai összefoglaló munkája alapján (9).

A Hsp90 mutagenézise, gátlószerek, nemhidrolizálható ATP-analógok és kinetikai mérések elvezettek az ATPáz ciklus során bekövetkező konformációs átrendeződésekről alkotott jelen modellhez (42, 48, 56). ATP kötés hatására egy N-terminális molekuláris fedő rázárul a nukleotid kötőhelyre, ezt követi egy lassú átmenet a zárt konformáció irányába, melynek során a monomerek N-terminális doménjei kölcsönhatásba lépnek egymással (15). Az ATP γ -foszfátja a középső kliensköti doménnel is kapcsolatot teremt (16). Az ATP hidrolízise egy második állapothoz vezet,

melynek szerkezetét még nem sikerült egyértelműen beazonosítani. A molekula konformációváltozása az ATPáz ciklus sebesség meghatározó lépése (48, 56). Az ADP disszociációjával visszaáll a Hsp90 eredeti nyitott konformációja (**2. ábra**).

1.2.5. A Hsp90 chaperon ciklusa és szabályozása

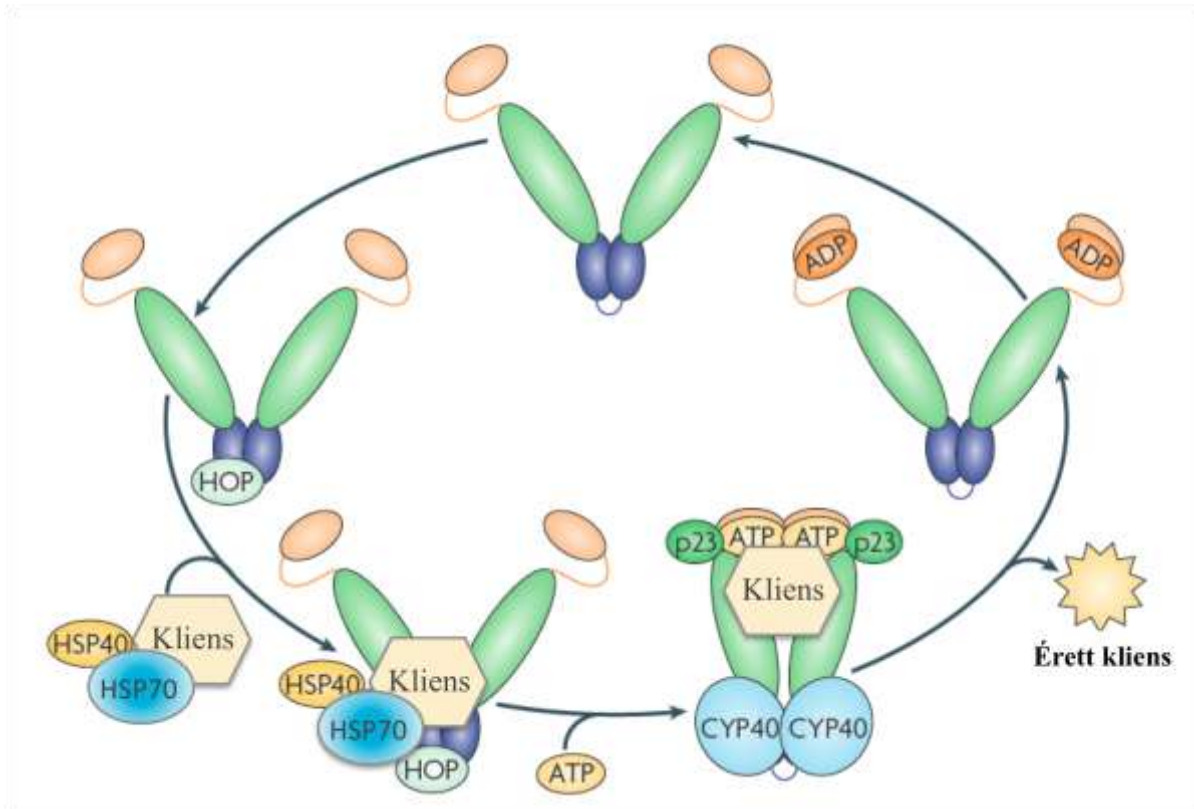
A Hsp90 chaperon működését, az ATP kötését és hidrolízisét változatos, több mint 20 ko-chaperonnal való kölcsönhatás és számos poszt-transzlációs módosítás szabályozza (57). A **3. ábrán** a chaperon ciklust és a legfontosabb ko-chaperonokat tüntettem fel. Összességében kijelenthetjük, hogy a rengeteg adat ellenére napjainkban még az elején járunk az igen összetett szabályozás megértésének.

1.2.5.1. Ko-chaperonok általi reguláció

Eukariótákban eddig több, mint 20 ko-chaperont azonosítottak (42). Sok esetben a biológiai funkciójukra még nem derült fény. Érdekes módon olyan ko-chaperonok is vannak, amelyek az egyik fajban elengedhetetlenek, de a másiktól hiányoznak (58). Eddigi ismereteink szerint négyféle módon képesek a Hsp90 funkcióját modulálni: összehangolják a Hsp90 és más chaperon rendszerek (például a Hsp70 rendszer) működését, fokozzák vagy gátolják a Hsp90 ATPáz aktivitását, speciális klienseket visznek a Hsp90-hez, illetve saját enzimatis aktivitásukkal a Hsp90-et vagy a kliensfehérjét módosítják.

A ko-chaperonok legnagyobb családja TPR doménokat tartalmaz, melyek a Hsp90 C-terminális doménjában lévő MEEVD motívumhoz kötődnek (23). A TPR domént tartalmazó ko-chaperonok egyik legfontosabb szerepe, hogy elősegítsék a Hsp40, Hsp70 és Hsp90 összehangolt, kooperatív működését a kliensen, annak megfelelő érése érdekében. Az egyik legismertebb ilyen ko-chaperon a több TPR domént tartalmazó Hsp70-Hsp90 szervező fehérje (Hop/p60), amely képes egyszerre kötni a Hsp70-et, a Hsp90-et és más ko-chaperonokat. Az egyik legjobban jellemzett Hsp90 kliens, a progeszteron receptor érési ciklusán keresztül mutatom be a Hop működését valamint a Hsp90 chaperon ciklusát (**3. ábra**). A progeszteron receptort a

Hsp40 szállítja egy ATP-kötött Hsp70-hez (59). A Hsp40 és a Hsp70 kapcsolódása a Hsp70-ben az ATP hidrolízisét indukálja, valamint szorosabbá teszi a Hsp70-ADP és a progesteron receptor kapcsolatát. A Hsp90-Hop ezután a Hsp70-ADP-hez kötődik, lehetővé téve a progesteron receptor átadását a Hsp90 felé. Utolsóként a p23 ko-chaperon és az ATP köt be, mely a Hop és a Hsp70 disszociációjához vezet (59) (3. ábra).



3. ábra A Hsp90 chaperon ciklusa.

A kliens a Hsp40 és Hsp70 fehérjékhez kötődik, azután a Hop közvetítésével átkerül a Hsp90-re. Utoljára a p23 ko-chaperon és az ATP kötődik a komplexhez, melyek a kliens érését és stabilizálását segíti elő. Az ATP hidrolízise a kliens disszociációjához és a komplex széteséséhez vezet. A CYP40 a kliens aktivitását szabályozza a ciklus végén, szerepe a komplexben jelenleg még nem teljesen tisztázott. Taipale és munkatársai összefoglaló munkája alapján (9).

A ko-chaperonok a Hsp90 ATPáz aktivitását egyaránt képesek fokozni (Aha1, Cpr6) vagy gátolni (Hop, Cdc37, p23) (60-62). A gátló ko-chaperonok nagy valószínűséggel a kliens kötésében és az érett Hsp90 komplexek kialakulásában játszanak szerepet. Ezzel szemben azok, amelyek növelik az ATPáz aktivitást, inkább a Hsp90 konformáció változását segítik elő. Az eddig beazonosított több, mint húsz ko-chaperon közül csupán négy (Aha1, Cdc37, p23, SGT1) esetében tárták fel a Hsp90 ATPáz aktivitására gyakorolt hatásának szerkezeti alapjait. Az Aha1 az N-terminális doménhez kötve a Hsp90 konformációját stabilizálja, így a hatékony ATP hidrolízist segíti elő (61). A Cdc37 a Hsp90-kináz kölcsönhatás specifikus ko-chaperonja (ld. később). A középső doménhez köt és gátolja a Hsp90 ATP-áz aktivitását (62). A p23 a chaperon ciklus késői szakaszában kapcsolódik a Hsp90 N-terminális doménjéhez és az érett kliens fehérjét stabilizálja. A p23 a kliens fehérjét úgy ejti csapdába, hogy csökkenti a Hsp90 konformációs hajlékonyságát, ami stimulálja az ATP-kötést és ezzel egy időben gátolja az ATPáz aktivitást (49).

1.2.5.2. Poszt-transzlációs szabályozás

A Hsp90 különböző poszt-transzlációs módosulásokon, többek között foszforiláción, acetiláción és S-nitroziláción eshet át (63). Már igen korán leírták a Hsp90 szerin-treonin, valamint tirozin foszforilációját (8). Bizonyos foszforilációk elősegítik, míg mások gátolhatják vagy gátolják a Hsp90-kliens kölcsönhatás kialakulását. Élesztőben a Hsp90 ko-chaperon protein foszfatáz 1 (Ppt1) deléciója a Hsp90 hiperfoszforilációjához vezet, melynek következménye több kliens érésének gátlása (64). Ezzel szemben, a Hsp90 300-as tirozinjának Src kináz általi foszforilációja szükséges kliensével, az eNOS-sal történő kapcsolódásához és a VEGF-receptor által történő eNOS aktivációhoz (65). A Hsp90 C-terminális 597-es ciszteinjének nitrozilációja ugyanakkor az N- és C-terminális domének kölcsönhatásait modulálva gátolja az ATPáz aktivitást és az eNOS érését (66, 67).

Az emlős Hsp90 több helyen is acetilálódhat. A középső doménen levő 294-es lizin p300/CBP általi acetilációja a kliens érését és a ko-chaperonok kötődését gátolja, melyet a hiszton deacetiláz 6 deacetilál (68, 69). Meglepő módon az acetilációra

képtelen mutánst kifejező élesztő csökkent életképességet és chaperon kapacitást mutat, ami az acetiláció-deacetiláció dinamikus szerepére hívja fel a figyelmet (68).

Az eddig említett poszt-transzlációs módosulásokon túl elvétele másokat, például oxidációt és ubikvitinilációt is azonosítottak a Hsp90 esetében, azonban ezek további megerősítésre várnak (63).

1.2.6. A Hsp90 biológiai funkciója és kliensei

A Hsp90 legfőbb funkciója a termodinamikailag instabil szerkezetű fehérjék felismerése, megkötése és stabilizálása. Ezek közé tartoznak a fehérje denaturáló stresszek (pl. hő sokk, nehézfémek) hatására kitekeredő fehérjéken túl többszáz, stresszmentes körülmények között is instabil, multidomén szerkezetű fehérje, melyeket összefoglalóan klienseknek nevezünk. Az általánosan denaturált fehérjéket a Hsp90 ATP-független módon a stressz végéig kötve tartja, majd vagy a Hsp70 rendszernek, vagy a proteaszómának továbbítja (70). Ezzel szemben a kliensek stabilizációja az ATPáz ciklushoz kötött. Nem meglepő, hogy a több konformációs állapot között változó multidomén kliensfehérjék a jelátviteli hálózat csomópontjaiként funkcionálnak. A kliens és a Hsp90 közti kölcsönhatás gyenge és átmeneti, a genetikai elemzések pedig zavarbaejtő eredménnyel szolgálnak, mivel nemcsak a Hsp90, hanem kliensei is egyszerre több szabályozási hálózatban érintettek, ami megnehezíti a Hsp90-kliens kapcsolat tanulmányozását. A klienseket tartalmazó naprakész lista a következő honlapon megtalálható: <http://www.picard.ch/downloads>.

Korai kísérletekben a Hsp90 klienseknek két nagy csoportját azonosították: a fehérje kinázokat és a magi szteroid receptorokat. Ezen és további eredmények alapján vált világossá az a két biokémiai kísérleti feltétel, melyek alapján egy adott fehérjéről kijelenthetjük, hogy Hsp90 kliens. Az első a Hsp90 szóban forgó fehérjével kialakított komplexének sejtlyázátumból történő kimutatása. A második pedig az, hogy a Hsp90 funkciójának gátlásával párhuzamosan csökkenjen az adott fehérje aktivitása. További, nem szükségszerű feltétel, hogy a Hsp90 gátlása egy idő után a kliens proteaszomális degradációjához vezet, azonban degradáció helyett néha aggregáció is előfordulhat.

A Hsp90-et eredetileg az első molekulárisan karakterizált onkogén, a fehérje tirozin kináz v-*Src* affinitás tisztítása során fedezték fel (71). Más virálisan kódolt *Src*-szerű tirozin kinázok (*Fes*, *Fps*, *Yes*) tisztítása során szintén találtak Hsp90-et (72). Valamivel később a Hsp90-et számos magi hormon receptorral találták fizikai komplexben (73-75). A szteroid receptorokkal ellentétben a Hsp90 nem szükséges a tiroid receptor működéséhez (76). Ennél is meglepőbb, hogy egy tanulmány szerint a Hsp90 gátlása a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR) α és β válaszelemének riporter aktivitását serkentette, míg a PPAR γ aktivitásra nem hatott (77), azt sugallva, hogy a Hsp90-kliens kapcsolatot nem lehet prediktálni az aminosav szekvencia homológia alapján.

A Hsp90 a növekedési, túlélési folyamatokat és a sejtciklust szabályozó jelpályák Ser-Thr kinázainak jelentős részét stabilizálja (pl. *c-Raf*, *Akt*, *CDK1*) (78-80). Bár a szteroid hormon receptorok és a fehérje kinázok a legjobban ismert kliensek közé tartoznak, rajtuk kívül számos más klienst is felfedeztek, például polimerázok, (telomeráz reverz transzkriptáz, *TERT*) (81), különböző transzkripciós faktorok és kromatin fehérjék (*p53*, *HSF1*, *HIF-1 α* , *STAT3*) (36, 82-84).

Gerincesekben a Hsp90 a veleszületett és a szerzett immunitásban és a gyulladásos válaszban játszik szerepet, az antigén prezentációban való részvétele valamint az NF κ B aktiválódását segítő IKK stabilizációja révén (85-87).

A Hsp90 kulcsszerepét a fehérjetranszportban és -szekrécióban is kimutatták (88). Kliensei között megtaláljuk többek között a Rab GTPáz ciklus egyes komponenseit (*RhoGDI α*) és különböző Rab fehérjéket (*RAB3A*, *RAB1B*) (89). Farmakológiai gátlása nemcsak az endoplazmás retikulum és a Golgi közti, valamint a Golgi-n belüli transzportot károsítja, hanem elégtelen fehérje szekrécióhoz is vezet élesztő és emlős sejtekben egyaránt, mely mutatja a Hsp90 konzervált és központi szerepét a fehérjék transzportjában.

Újabb eredmények igazolják a Hsp90 alapvető szerepét az mRNS-ek érésében és a génexpresszió poszt-transzkripciós szabályozásában. A kliens Argonauta fehérjék révén nemcsak a P-test kialakulását és az RNS duplexek RISC komplexre történő feltöltését, hanem a mikroRNS-ek és siRNS-ek kialakulását is biztosítja (90-92). Ezen túl a transláció iniciációban szerepet játszó eIF4E kapcsolódásában (93), valamint

Drosophilában a transzpozon aktivációban érintett Piwi-asszociált RNS-ek (piRNS-ek) képződésében is szerepet vállal (94).

A daganatsejtekben fokozott mértékben termelődő különböző aktivált vagy labilis onkoproteinek a Hsp90 támogatására szorulnak. Ilyen onkoproteinek például a különböző kinázok és transzkripciós faktorok mutáns, amplifikált, overexpresszált vagy transzlokált változatai. A daganatok életmódjával járó nagy mértékű sejtszintű stressz (intenzív proliferáció, hipoxia, szűkös tápanyagellátás, oxidatív stressz) miatt létfontosságú a Hsp90 pufferoló hatása. A daganatsejtekben a Hsp90 egyébként is fokozott mértékben termelődik és egy ún. aktivált multichaperon komplexben található, melyről napjainkban úgy véljük, hogy a malignus transzformációban és progresszióban esszenciális (95-97). Ugyan széles körben ismert a Hsp90 kritikus szerepe a sejtnövekedésben és onkogenezisben, a differenciációban betöltött szerepe egy, a TGF β receptor stabilizációját leíró munkán kívül jórészt tisztázatlan (98).

1.2.7. Hogyan ismeri fel a Hsp90 a klienseit?

Az eddig azonosított nagy számú kliens és számos próbálkozás ellenére sem sikerült a felismerést meghatározó közös szekvenciát vagy szerkezeti motívumot kimutatni (9). A rendkívül változatos klientúra miatt valószínű, hogy nem is létezik ilyen közös motívum. Sokkal valószínűbbnek tűnik, hogy a kliensek stabilitása és a ko-chaperonok fontos elemei a kliensfelismerésnek. Ugyan ezt közvetett eredmények alapján Ulrich Hartl már 1997-ben, majd William Pratt és David Toft 2003-ban valószínűsítette (31, 99), közvetlen alátámasztása olyan kihívást jelentett, melyet a klasszikus biokémia eszközeivel nem lehetett megoldani. Susan Lindquist csoportja 2012-ben szisztematikusan megvizsgálta a legtöbb fehérje kinázt és transzkripciós faktort arra vonatkozóan, hogy vajon kölcsönhatásban állnak-e a Hsp90-nel és annak ko-chaperonjával, a Cdc37-tel (100). Interakció esetén osztályozták a kliensek Hsp90-hez való affinitását is. Meglepődve tapasztalták, hogy a kinázok jóval nagyobb hányada (60%) kötődik a Hsp90-hez, mint a transzkripciós faktoroké (7%). A Cdc37 ko-chaperon pedig kizárólag csak a kinázokkal lép kapcsolatba, azaz a Hsp90 kináz-

specifikus felismerő segédjeként funkcionál. A Hsp90-kináz kölcsönhatást vizsgálva arra lettek figyelmesek, hogy a kliensek Hsp90-hez való affinitása között akár százszoros különbség is lehet. Tanulmányuk legfontosabb eredményeként kimutatták, hogy a Hsp90 termodinamikailag instabil kinázokhoz kötődik. A fehérje konformációjának stabilizációja akár aktív, akár inaktív formában csökkenti az asszociációt a Hsp90-hez. Úgy tűnik, hogy a Hsp90 kliensfelismerése egy összetett folyamat, melynek során a Cdc37 felismeri a kinázokat, a családon belül pedig termodinamikai tényezők határozzák meg a Hsp90-hez való affinitást (100).

1.2.8. A Hsp90 szerepe a kliens fehérjék degradációjában

Azok a fehérjék, amelyek több chaperon ciklus után sem érik el stabil szerkezetüket, nagyobb valószínűséggel ubikvitinálódnak az ubikvitin ligázok segítségével, ezt követően a proteaszómában bomlanak le. Mintegy féltucat ubikvitin ligázt azonosítottak, melyek közül legjobban a TPR-domént tartalmazó CHIP (carboxy terminus of Hsc70 interacting protein) jellemzett, és mind a kinázok, mind a magi receptorok degradációját meghatározza (101). Ebben az esetben a Hsp90 döntő, ám passzív szerepet játszik a proteolízisben. Judith Frydman munkatársai igazolták, hogy a Hsp90 nem szükséges a von Hippel-Lindau (VHL) fehérje stabilizációjához, viszont elengedhetetlen proteaszomális degradációjához, ami egy sokkal aktívabb, a fehérje minőségi kontroll felé mutatott elköteleződést sejtet (102). Továbbá, a Hsp90 a Lindquist tanulmány szerint az E3 ubikvitin ligázok 31%-ával (117/372 ligáz) képez komplexet (100). Ezek a felfedezések a Hsp90 jóval kiterjedtebb, aktívabb, rendszerszintű scaffold/szabályozó szerepét támogatják.

1.2.9. A Hsp90 gátlószerei

Whitesell és munkatársai 1994-ben azonosították a Hsp90 fehérjét az akkoriban tirozin kináz gátlószerként használt makrociklikus anzamicin antibiotikum, a geldanamycin célpontjaként (103). Kiderült, hogy a geldanamycin a Hsp90–v-Src komplexet megbontja, a v-Src destabilizálódik, lebomlik, ezáltal visszafordíthatóvá válik a tyúkszarkoma vírus által indukált malignus transzformáció. Azóta kimutatták, hogy a geldanamycin a Hsp90 hatékony, specifikus gátlószere. Hatását azáltal fejti ki, hogy a Hsp90 N-terminálisán megtalálható ATP-kötőhelyre köt be, így a Hsp90 chaperon ciklusát befagyasztja, a Hsp90 elengedi kliensét, ami denaturálódik és inaktiválódik. Hosszú távon a kliens proteasomális degradációja következik be.

A geldanamycintől eltérő szerkezetű radicicol is hasonló elven működik (104, 105). A kumarin származék novobiocin a Hsp90 C-terminálisában levő nukleotid-kötőhelyhez kötve a kliens disszociációját, majd degradációját idézi elő (26, 27). A Hsp90 kis molekulájú természetes gátlószerei fontos eszközök a Hsp90 kliensek azonosításában és a Hsp90 funkcióinak vizsgálatában, származtatott vegyületeik pedig rendkívül hatékony daganatellenes szerek (97).

1.3. Az elhízás és a metabolikus szindróma

Napjainkban a civilizált, táplálékdús és mozgásszegény életmódnak köszönhetően egyre gyarapodik az elhízott egyének száma. Az elhízás komoly közegészségügyi problémává vált a világ fejlett országaiban, köztük hazánkban is. A metabolikus szindróma részeként a viscerális elhízás általában 2-es típusú cukorbetegséggel, diszlipidémiával és magasvérnyomással jár együtt, melynek háttérében a zsírszövet komplex működészavara áll. Az elhízás fokozott kockázatot jelent a vezető halálokot képező szív- és érrendszeri megbetegedések előfordulására (106).

Az adipociták fejlődésének és élettanának vizsgálata intenzív kutatások tárgyát képezik az elmúlt években. Az adipocita differenciáció kiemelt jelentőségű különböző kórképek kialakulásában.

1.4. A zsírszövet

Az elmúlt két évtized felfedezései bebizonyították, hogy a zsírszövet adekvát működése számos szervezeti fiziológiás folyamatban és az egészség fenntartásában elengedhetetlen. A zsírszövet érett zsírsejtekből és az azt körülvevő fibroblasztokból, preadipocitákból, endotélsejtekből, ideg- és immunsejtekből áll (107, 108).

Két fajta zsírszövetet különböztetünk meg, úgymint fehér és barna zsírszövet. Míg a barna zsírszövet a hideg-indukált hőtermelésről ismert, a fehér zsírszövet jelentős szerepet játszik az energia homeosztázisban és a szisztémás inzulin érzékenységben (109). Korábban mind a barna, mind a fehér zsírsejtet a zsírszövetben levő mezenchimális őssejtből eredeztették, mégpedig azért, mert mindkét zsírszövet a PPAR γ transzkripciósi faktort igényli fejlődéséhez. Napjainkra kiderült, hogy a fehér- és a barna zsírsejt prekursorsejtjei még a korai embrionális fejlődés során váltak szét. A barna zsírsejt származását tekintve inkább a vázizommal áll közeli rokonságban. Mindkét sejt olyan prekursor sejtéből származik, mely a miogén faktor-5 (MYF5) nevű korai izom markert és a paired-box 7 (PAX7) fehérjét expresszálja, azonban a barna

zsírsejt a mitokondriális légzés regulált szétkapcsolását előidéző termogenin/UCP1 és UCP3 fehérjéket is expresszálja (109). Figyelemre méltó, hogy a hosszantartó hideg (110, 111), a PPAR γ krónikus aktivációja roziglitazonnal (112) vagy β 3-adrenerg stimulus hatására (113) a fehér zsírsejt képes a barna zsírsejthez hasonló működésű, ún. bézs sejt (adaptív barna zsírsejt) alakulni (112, 114) és UCP1-et valamint UCP3-at kifejezni.

1.5. A fehér zsírszövet és a metabolikus szindróma

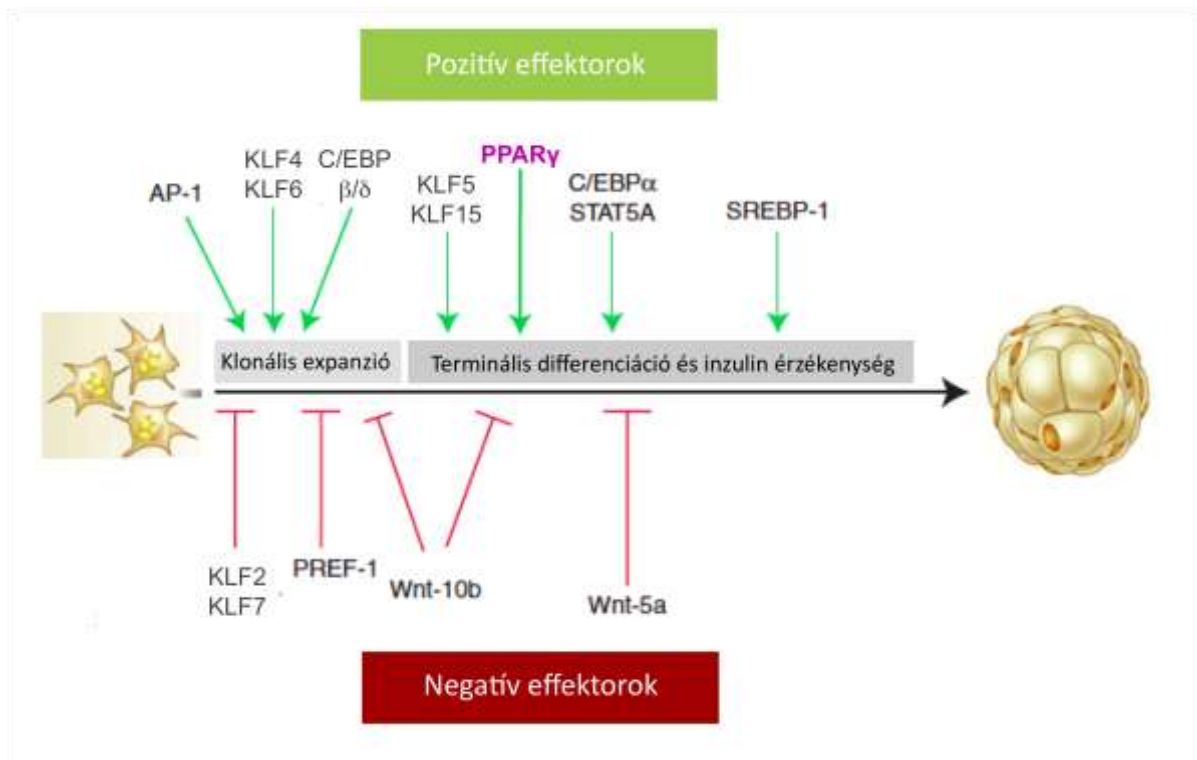
A fehér zsírszövet elhelyezkedését tekintve bőralatti zsírszövetre, vizcerális zsírszövetre, valamint az arcon levő zsírszövetre osztható. Kimutatták, hogy a hízáskor felszaporodó vizcerális zsírszövet mennyisége a kóros gyulladással és az inzulin rezisztenciával korrelál (115), míg a bőralatti zsírszövet transzplantációja megnövekedett glükóz toleranciához vezet (116).

A mechanikai védelem és a hőszigetelés mellett a fehér zsírszövet fő, passzív funkciója az energiaraktározás. Zhang és munkatársai 1994-ben jellemezték a jóllakottsáért felelős leptin hormont, ebből a tanulmányból derült ki először, hogy a zsírszövet egy hormonális szerv (117, 118). A soron következő zsírsejt-specifikus hormon az adiponektin volt (119, 120). Az adiponektin igen hatékonyan csökkenti a vércukorszintet. A leptinhez hasonlóan az AMP-aktivált fehérje kinázt (AMPK) aktiválja, mely foszforiláció révén gátolja az acetil-koenzim A karboxilázt (ACC), ezáltal az izomban a glükóz felhasználást és a zsírsav oxidációt fokozza, a májban pedig gátolja a glükóz szintézist (121, 122). A csökkent plazma adiponektin szint (hipoadiponektinémia) magasabb testtömeg index-szel (BMI), inzulin rezisztenciával, megnövekedett gyulladós markerszinttel párosul (123), valamint rizikót jelent a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában. Megállapították, hogy az alacsony adiponektin szint kapcsolatban áll a metabolikus szindróma kialakulásával. Kimutatták, hogy elhízás során csökkenő adiponektin szint a súlyfelesleg leadása után újra emelkedik, ezzel párhuzamosan nő az inzulin érzékenység is (124, 125). Az adiponektin ezenkívül kardioprotektívnek bizonyult egér és humán vizsgálatokban, valamint képes az agyban szabályozni a jóllakottság érzést (126). Az emberben főleg a zsírszövetben

levő monociták és makrofágok által szecernált rezisztin nevű hormonnól bebizonyosodott, hogy egérben és emberben egyaránt képes inzulin rezisztenciát és a zsírszöveti gyulladást előidézni (127).

1.6. Az adipogenezis

Az adipogenezis egy több lépésből álló folyamat, mely transzkripciós faktorok és sejtciklus fehérjék összehangolt működése révén zsírsejt képződéséhez vezet (3, 128) (4. ábra). A komplex differenciációs folyamat számos pozitív és negatív szabályozó koordinált működését igényli.



4. ábra Az adipogenezis pozitív és negatív effektorai.

AP-1, aktiváló protein 1; C/EBP α , δ és β , CCAAT/ enhancer-kötő α , δ és β fehérjék; KLF 2, 4, 5, 6, 7, 15, Kruppel-szerű faktor 2, 4, 5, 6, 7, 15; PREF-1, preadipocita faktor 1; SREBP-1 “sterol regulatory element-binding protein 1”; , STAT5A, “signal transducer and activator of

transcription” fehérje; Wnt 5a, 10b, “Wingless-related integration-5a, 10b” fehérje. Sarjeant és Stephens és Ahmadian és munkatársai összefoglaló közleményei alapján (129, 130).

Az adipogenezis korai szakaszában a hormonális stimuláció hatására indukálódó C/EBP β és C/EBP δ a PPAR γ promoteréhez kötve indukálja a PPAR γ -t (131, 132). A C/EBP β és C/EBP δ megjelenése a sejten egybeesik preadipociták klonális expanziójának késői fázisával. Klonális expanciónak nevezük azt a folyamatot, amikor a sejtek újra belépnek a sejtciklusba és mitózissal többször osztódnak (133). Ezeket az eseményeket különböző sejtciklus fehérjék koordinálják, például E2F és retinoblasztóma fehérje (Rb), melyek szükségesek az emlős zsírsejt terminális differenciációjához (134-136). A ligandkötéssel aktiválódó PPAR γ számos, az adipogenezisben alapvető célgén (pl. adiponektin, aP2, LPL, GLUT4, PEPCK) indukálása mellett a C/EBP α expresszióját is beindítja. A keletkező C/EBP α ezek után a PPAR γ promoterében levő C/EBP kötőhelyhez köt, ezzel válik teljessé a PPAR γ -C/EBP α pozitív visszacsatolási kör.

Az adipogenezis terminális szakaszának középpontjában a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) és a CCAAT/enhancer kötő fehérje α (C/EBP α) összehangolt működése áll. A PPAR γ az adipogenezis mesterregulátora, jelenléte *in vivo* és *in vitro* szükséges és elégséges az adipocita differenciációhoz (137-139). A PPAR γ ektópikus expressziója egér embrionális fibroblasztokban (MEFs) elindította az adipocita differenciációt a C/EBP α teljes hiányában is, míg a C/EBP α önmagában, PPAR γ nélkül nem volt képes adipogenezist indukálni (138). Ezt az eredményt megerősítve Zuo és munkatársai kimutatták, hogy a C/EBP α csak a PPAR γ -n keresztül képes aktiválódni. A C/EBP β csak akkor tudja indukálni a C/EBP α -t, ha az aktív PPAR γ a C/EBP α promoterén ülő represszor HDAC1-t kilöki (140). Fontos azonban megemlíteni, hogy a C/EBP α hiányos érett zsírsejteknek abnormálisan alacsony az inzulin érzékenysége (141). Ez arra utal, hogy a C/EBP α nem csupán a PPAR γ expresszió fenntartásával járul hozzá az adipogenezishez.

1.7. Az adipogenezis modellje

Az évek során különböző modell rendszert állítottak föl az adipogenezis és a zsírsejt funkciók vizsgálatára (142). Ezek a modellek két csoportra oszthatók. Az első csoportba azok a pluripotens fibroblasztok tartoznak, amelyek képesek izom-, porc-, vagy zsírsejtté differenciálódni. Ilyen például a 10T1/2, BALB/c-3T3 vagy a CHEF/18 fibroblaszt sejtvonalak. A másik csoportba a olyan fibroblaszt-szerű sejtek tartoznak, amelyek már elköteleződtek az adipocita differenciáció irányába. Ebbe a csoportba tartoznak a 3T3-L1, a 3T3-F422A, a TA1 vagy a 30A5 preadipociták.

A 3T3-L1 preadipocita, valamint a 3T3-F422A sejt a két legjobban tanulmányozott és karakterizált sejt vonal, melyet széleskörben használnak a kutatók. Mindkét sejtvonal 17-19 napos Swiss 3T3 egér embrióból származik (143, 144). Ez a két sejtvonal azért vált közkedvelt modellé, mivel a differenciáció során homogén érett zsírsejt populációt eredményez, melyek morfológiájukat és biokémiájukat tekintve az *in situ* zsírsejtekhez hasonlítanak (145, 146).

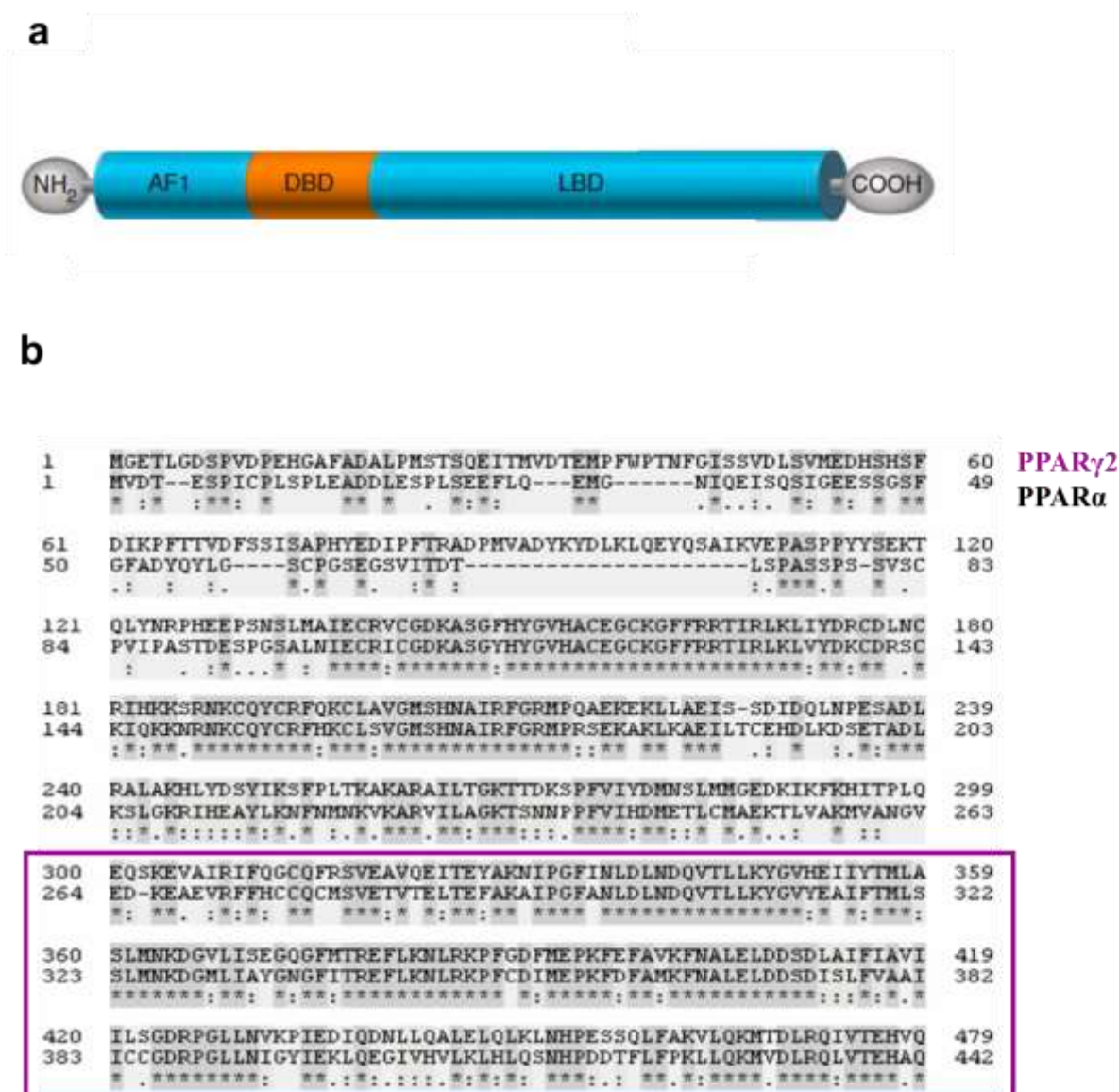
Az *in vitro* adipogenezis folyamatát a sejtek morfológiájának megfigyelésével is nyomon követhetjük. Maguk a preadipociták fibroblaszt jellegűek, a hormonális stimulációt követő klonális expanzió során a sejtek kisebbek és kissé orsószerűek lesznek, majd a differenciáció negyedik napjától kezdve már megfigyelhetők az adipociták citoplazmájában felhalmozódó lipid cseppecskék, melyek növekedésével a sejtek egyre inkább kikerekednek.

1.8. Az adipogenezis effektorai

1.8.1. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok családja

A PPAR transzkripciós faktorok a magi receptorok szupercsaládjának RXR-heterodimer 1-es csoportjába (NR1) tartoznak. Nevüket onnan kapták, hogy a család 1990-ben elsőként azonosított tagja (PPAR α) különböző természetes és szintetikus anyagok mediátoraként peroxiszóma proliferációt indukál (147).

Emlősökben három PPAR fehérjét különböztetünk meg: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) és PPAR γ (NR1C3). Szerkezetüket tekintve a következő elemekből állnak, N-terminális transzaktivációs domén (AF1), konzervált DNS-kötő domén (DBD), valamint C-terminális ligandkötő domén (LBD), mely a dimerizációért felel és ligandfüggő transzaktivációs aktivitással is bír (AF2) (**5. ábra**) (141). A PPAR-ok ligandjai közé tartoznak az étkezéssel bevitt többszörösen telítetlen zsírsavak, a különböző lipid metabolitok (prostaglandin J2 és különböző eikozanoidok), valamint oxidált foszfolipidek (131). Aktiválódás következtében a PPAR-ok a retinoid X receptorral (RXR) heterodimert alkotnak, majd a PPAR-reszponzív válasz elemhez (PPRE) való bekötés után az adipogenezisben, a lipid anyagcserében, a gyulladásban és a metabolikus homeosztázisban résztvevő gének expresszióját szabályozzák (141). A szerkezeti és működésbeli hasonlóságok dacára *in vivo* a PPAR fehérjék egyedi funkciókkal bírnak (147). A PPAR α a májban, a szívben és a barna zsírszövetben fejeződik ki a legnagyobb mennyiségben, ahol a zsírsav oxidációs útvonalak fő aktivátoraként működik, míg a PPAR β/δ hasonló hatást fejt ki a vázizomban, a májban és a szívben (147).



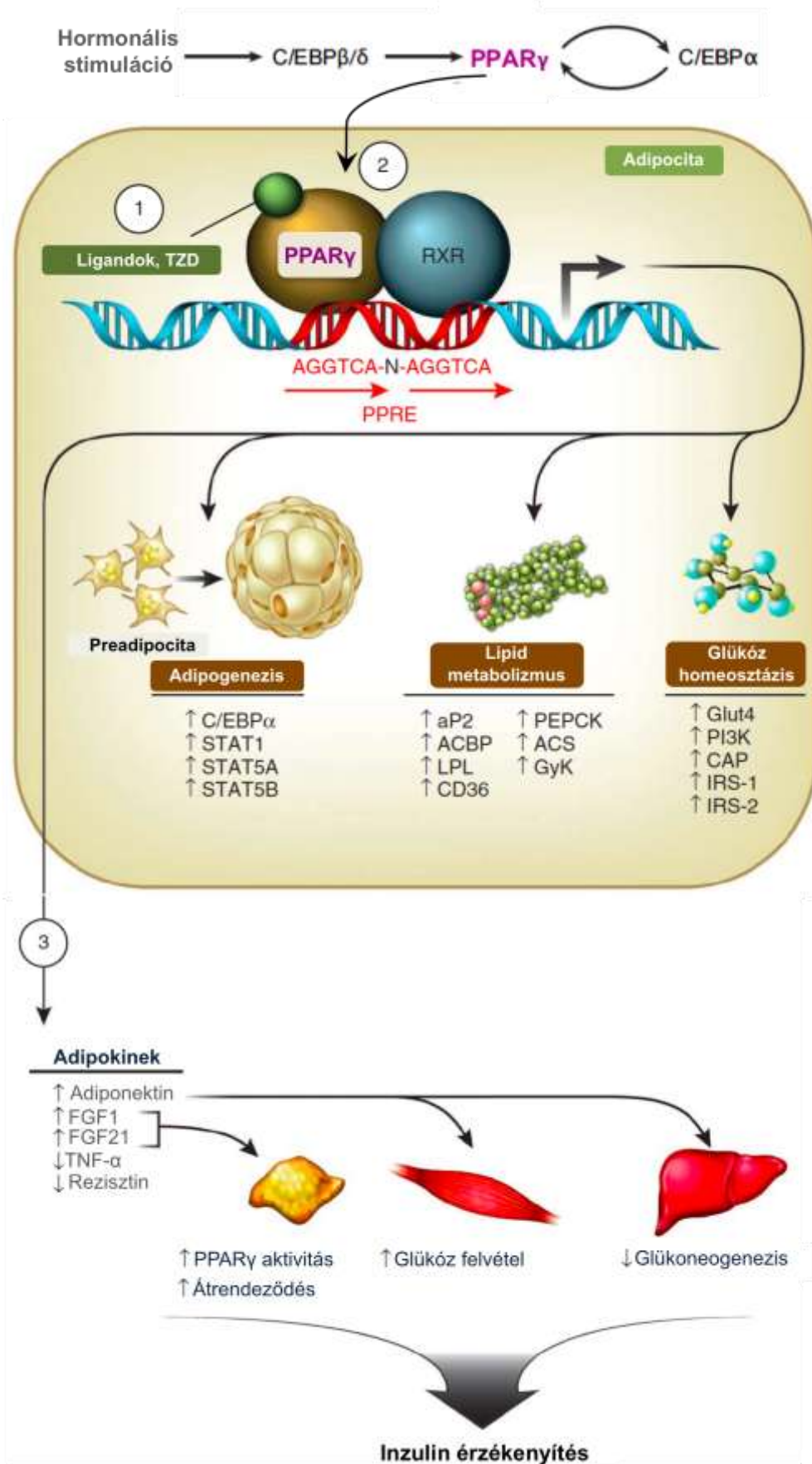
5. ábra A PPAR γ domén szerkezete valamint a PPAR α és PPAR γ 2 aminosav szekvencia homológia vizsgálata.

(a) A PPAR γ N-terminális transzaktivációs doménből (AF1), DNS-kötő doménből (DBD) és ligand-kötő doménből (LBD) áll. Ahmadian és munkatársai összefoglaló közleménye alapján (130). (b) Az egér PPAR α és a PPAR γ 2 ligandkötő doménje (lila keretben) 90%-os szekvencia homológiát mutat. Szekvencia illesztés a ClustalW programmal. A PPAR α a ligandkötő doménjével kötődik a Hsp90-hoz (77).

1.8.2. A PPAR γ

A PPAR γ -t a fehér- és a barna zsírszövet expresszálja a legnagyobb mértékben. Ezekben a szövetekben az adipogenezis mesterregulátoraként működik, ezentúl az egész szervezet lipid metabolizmusának modulálásában és az inzulinérzékenység kialakításában is jelentős szerepet vállal (**6. ábra**). Az alternatív transzkripció kezdőhelyek, illetve az alternatív splicing eredményeképpen a PPAR γ két izoformában expresszálódik, PPAR γ 1 és PPAR γ 2 (148). A PPAR γ 1 a legtöbb szövetben megtalálható, míg a PPAR γ 2 zsírsejt specifikus és N-terminálisának legelején a PPAR γ 1-hez képest 30 plusz aminosavat tartalmaz (149).

A PPAR γ expresszióját és aktivitását különböző poszt-transzlációs módosítások befolyásolhatják (150). Az egyik fontos regulátor az ubikvitin-proteaszóma rendszer. A PPAR γ fehérje ubikvitin-függő és ubikvitin-független módon is kerülhet a proteaszómába. Előbbihez szükséges a ligandkötő domén ubikvitinálódása (151, 152), utóbbihoz pedig a fehérje SUMOilációja szükséges. A SUMOiláció a PPAR γ 2-n a 107-es lizinen, a PPAR γ 1-n a 77-es lizinen történik, a ligandfüggő SUMOiláció pedig a 365-ös lizin oldalláncon következhet be (153, 154). Egy másik lehetséges módosítás a MAP kinázok által végrehajtott foszforiláció a 112-es szerinen, amely a PPAR γ -t transzkripciósan inaktívvá teszi (155). Bár széleskörben elfogadott az, hogy a PPAR γ foszforilációja gátolja annak aktivitását, az S112A pontmutáció, mely PPAR γ foszforilációt gátolja, nem befolyásolta a PPAR γ adipogenezisre gyakorolt hatását (156). A fehérje foszfatáz PP5 (TPR-tartalmú Hsp90 kochaperon) a 112-es szerint defoszforilálja. Hinds és munkatársai kimutatták, hogy a PP5 deficiens egér embrionális fibroblasztokban a PPAR γ hiperfoszforilálódik, mely a lipogenezis gátlásához vezet. A PPAR γ transzkripció aktivitását valamint a lipogenezist a S112A mutáns expressziója állította helyre (157). A PPAR γ -S112A egerek megőrzik az inzulinérzékenységüket tápanyag-indukált elhízás esetén (156). Ennek hátterében a kisebb zsírsejtek, az emelkedett szérum adiponektinszint és az alacsonyabb szabad zsírsavszint áll. Choi és munkatársai kimutatták, hogy a 273-as szerin CDK5 általi foszforilációja csökkenti a PPAR γ transzaktivációs képességét fontos adipocita géneken, beleértve az adiponektin génjét is (158).



6. ábra A PPAR γ aktivációja és élettani hatásai.

Hormonális stimuláció hatására indukálódik a PPAR γ transzkripciója. A PPAR γ aktiválja a C/EBP α -t, mellyel pozitív visszacsatolási kört alkot. Az aktivált PPAR γ az RXR-rel heterodimert képez, majd a PPAR γ -függő célgének PPAR γ rezponzív elemeihez (PPRE) kötve fejt ki transzkripciót szabályozó hatását. ACBP, acil-KoA-kötő fehérje; ACS, acil-KoA szintetáz; aP2, adipocita protein 2; CAP, c-Cbl-asszociált fehérje; C/EBP α , CCAAT/ enhancer-kötő fehérje α ; CD36, "cluster of differentiation 36" fehérje; FGF1, 21, fibroblaszt növekedési faktor 1, 21; GLUT4, 4-es típusú glükóz transzporter; GyK, glicerín-kináz; IRS-1, IRS-2, inzulin receptor szubsztrát 1, 2; LPL, lipoprotein lipáz; PEPCCK, foszfoenolpiruvát-karboxikináz; PI3K, foszfatidilinozitol-3-kináz; STAT1, STAT5a, STAT5b, "signal transducer and activator of transcription" 1, 5a, 5b fehérjék; TZD, tiazolidindion. Tontonoz és Spiegelman, valamint Ahmadian és munkatársai összefoglaló közleménye alapján (130, 131).

A homozigóta PPAR γ hiányos egerek még az embriogenezis alatt (10. nap) elpusztulnak a kialakuló placenta elégtelenség és következményes szívfejlődési rendellenesség következtében (159). Amennyiben a PPAR γ hiányos egereket vad típusú placentával párosították, a kardiális defektus megszűnik, azonban később az állatok a kialakuló lipodisztrófiába (a fehér- és barna zsírszövet teljes hiánya), máj szteatózisa és többszörös hemorrhágiába pusztultak bele (159, 160). A PPAR γ -hiányos egerekből származó embrionális fibroblasztok *in vitro* körülmények között nem képesek zsírsejtté differenciálódni (137, 138).

Nemrégiben Wang és munkatársai olyan zsírszövet-specifikus PPAR γ génkiütött egeret hoztak létre (PPAR γ FKO), amelynek szinte nincs látható fehér- és barna zsírszöve (161). A PPAR γ FKO egér hatalmas hasnyálmirigy szigetekkel, masszív zsírmájjal, drasztikus mértékben megemelkedett vércukorszinttel és szérum inzulinszinttel rendelkezik, melyhez extrém mértékű inzulinrezisztencia társul. A PPAR γ FKO egér bundájának kialakulása késleltetett, a bőralatti zsírszöve hiányzik, kárt szenved az emlőmirigyek fejlődése, hiányoznak az emlő zsírpárnák, a csontokban a csontvelői zsír hiánya a trabekuláris csontállomány felszaporodásával társul, melyek mind a zsírszöveti PPAR γ kritikus szerepére utalnak ezen szövetek esetében. Ezen eredmények szerint a zsírszövetben levő PPAR γ szükséges a zsírszövet kialakulásához, a teljes szervezet metabolikus homeosztázisához és a zsírtartalmú szövetek normál fejlődéséhez (161).

A zsírszövet-specifikus PPAR γ 2 szelektív deléciónja *ob/ob* egereken a zsírtömeg csökkenéséhez, β -sejt elégtelenséghez, súlyos inzulinrezisztenciához és diszlipidémiához vezet. Ugyanebben a rendszerben a PPAR γ 2 ektópikus (máj és izom) termelése a lipotoxicitást enyhíti (162).

A PPAR γ adipogenezisben és az inzulinérzékenység kialakításában tapasztalt központi helyzetének megfelelően azok az emberek, akik domináns negatív mutációt hordoznak az egyik PPAR γ allélben súlyos inzulinrezisztenciában és lipodisztrófiában, valamint magas vérnyomásban szenvednek (163). A Pro12Aa polimorfizmus a hordozó egyéneknek védelmet nyújt a súlygyarapodással és a diabetes mellitus-szal szemben (164). Ezzel összhangban a PPAR γ 2 és annak Pro12Aa variánsa szükséges az egerek normál élettartamához (165, 166).

A PPAR γ a glükóz homeosztázisban résztvevő géneket is szabályozza (132). Célgénjei között megtaláljuk a 4-es típusú glükóz transzportert (GLUT4) és a c-Cbl-asszociált fehérjét is (CAP). A PPAR γ a zsírszövet által szecernált, a metabolikus szindrómában jelentős szerepet játszó faktorok (adipokinek) expresszióját is ellenőrzése alatt tartja. Ilyen faktorok például a már említett hormonok, adiponektin, leptin, rezisztin, valamint a TNF- α . Ezen faktorok az inzulinérzékenységet is befolyásolják különböző útvonalakon keresztül.

1995-ben derült ki, hogy az antidiabetikus tiazolidindionok (TZD-k) a PPAR γ nagy affinitású ligandjai (167). A TZD általi PPAR γ aktiválás a zsírszövetben a lipidfelvételt és a raktározást segíti elő, az adipokinek expressziós mintázatának átalakítása révén az inzulin érzékenységet növeli. A TZD-k fokozzák a zsír és az izomszövet glükóz felvételét, csökkentik a máj glükóz újraszintézisét. Komoly mellékhatásaik a folyadékviSSzatartás, hízás és csontritkulás, mely új típusú, kevesebb mellékhatással rendelkező szerek kifejlesztésére inspirálja a kutatókat (130).

Nemrégiben fedezték fel a fehér zsírszövet perivaszkuláris tereiben azokat a dinamikus adipocita progenitor sejteket, melyek PPAR γ expressziója szerepet játszhat a zsírszövet/zsírsejt megújulásában (128). Ezen túlmenően a PPAR γ szükséges az érett zsírsejtek túléléséhez is. Egérben kimutatták, hogy az érett zsírsejtekben levő PPAR γ szelektív ablációja pár napra szűkíti le ezen sejtek élettartamát *in vivo* (168).

A PPAR γ többnyire tumorképződést gátló hatású, mivel a proliferációt gátolja és a differenciációt segítő elő (169). A PPAR γ több fajta daganatban expresszálódik,

például vastagbél-daganat, emlődaganat, vagy prosztatatarák esetében. Ezeknél a daganatoknál a PPAR γ ligandok antiproliferatív hatásúak (170). Kivételt képeznek azok a vastagbél-daganatok, ahol az APC génen mutációk következtek be, ezeknél a TZD-k a PPAR γ aktivációja révén a tumor növekedését serkentik (171, 172).

1.8.3. C/EBP transzkripciós faktorok

A C/EBP transzkripciós faktorok a bázikus leucin-cipzár (bZIP) transzkripciós faktorok közé tartoznak. Hat C/EBP izoformát ismerünk, ezek közül három, a C/EBP α , β és δ *in vivo* és *in vitro* az adipocita differenciációt segíti elő.

A C/EBP-k összehangolt indukciója nagyon fontos az adipogenezis alatt. A differenciációs koktélben szereplő 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) és a dexametazon a C/EBP β -t és C/EBP δ -t indukálja az adipogenezis kezdetén. Az IBMX az intracelluláris cAMP szint emelésével a PKA-t (protein kináz A) aktiválja, melyet a CREB (cAMP-reszponzív-elem kötő fehérje) aktiválása, majd CRE-hez (cAMP-reszponzív elem) kötése követ. Ennek eredménye a C/EBP β expresszió indukciója. A dexametazon nemcsak a glükokortikoid receptorokat (GR) aktiválja, hanem a mineralokortikoid receptorokhoz (MR) is köt, hatására mind a C/EBP β , mind a C/EBP δ pár óra alatt indukálódik (173). A C/EBP β inaktív állapotban a HDAC1-gyel egy transzkripciós ko-represszor komplexben található. Wiper-Bergeron és munkatársai kimutatták, hogy a glükokortikoid két mechanizmuson keresztül aktiválja a C/EBP β -t: egyrészt a HDAC1 proteasomális deplécióját idézi elő, másrészt indukálja a C/EBP β GCN5 (GCN5 hiszton acetiltranszferáz) és PCAF (P300/CBP-asszociált faktor) általi acetilációját (174, 175). A C/EBP δ aktiválódását szintén a glükokortikoidok stimulálják, azonban a pontos mechanizmus még nem tisztázott.

Bármely C/EBP transzkripciós faktor hiánya csökkent adipogenezist eredményez (176). A C/EBP β vagy C/EBP δ génkiütött egerek a normálhoz képest enyhén kisebb fehér zsírpárnákkal rendelkeznek. Mindkét fehérje kiütése esetén azonban már jelentősebb mértékben csökkent a fehér zsírszövet mennyisége (177). A C/EBP β és δ együttesen aktiválják a C/EBP α -t (178). A C/EBP α az adipocita differenciáció kulcsfontosságú eleme, a zsírszövet és a máj nagy mennyiségben

expresszálja. Két izoformája (p30 és p42) közül a p42 a hatásosabb transzaktivátor (179). Wang és munkatársai C/EBP α ^{-/-} egereken végzett munkájuk során kimutatták, hogy ezeknek az egereknek a máj- és zsírszövetjei nem képesek lipid felhalmozásra, valamint a májuk egyáltalán nem képes glikogén tárolásra, így hipoglikémia okozza a születés utáni nyolc órán belüli halálukat (180). Kimutatták továbbá, hogy a glikogén szintjük mRNS szintje körülbelül a normál szint 50-70%-a, valamint egyes, a glukoneogenezisben résztvevő enzimek transzkripciós indukciója is késleltetett volt. Eredményeik szerint a C/EBP α kritikus szerepet vállal az újszülöttek energiahomeosztázisának kialakításában és fenntartásában. Lindhart és munkatársai olyan transzgen egeret hoztak létre, melynek C/EBP α génje az albumin enhancer/promoter kontrollja alatt áll, így a máj C/EBP α expresszió megtartott. Megfigyelték a fehér zsírszövet hiányát annak ellenére, hogy ezeknek az egereknek magas volt a szérum lipid tartalma (181). Összegzésül elmondhatjuk tehát, hogy a C/EBP α szükséges a fehér zsírszövet kialakításához, azonban hatását a PPAR γ közvetíti (138).

2.8.4. Kruppel-szerű transzkripciós faktorok

A Kruppel-szerű faktorok (KLF) családja jelenleg 17 tagot számlál, a fejlődésben, a differenciációban és a sejtproliferációban vesznek részt (182). A KLF5 expressziója az adipogenezis korai szakaszában indukálódik, és szükséges az adipocita differenciációhoz *in vitro* és *in vivo* (183). A KLF5 siRNS csökkenti az adipocita differenciáció és a lipid akkumuláció mértékét, a KLF5^{+/-} heterozigóta egerek kisebb zsírpárnával rendelkeznek (Oishi 2005). A KLF15 az adipogenezishez nélkülözhetetlen, nagy mértékben expresszálódik a 3T3-L1 sejtek differenciációja során. Ektopikus expressziója NIH-3T3 sejtekben a PPAR γ aktiválása révén adipogenezist idéz elő (184). A fehér zsírszövet nagy mennyiségben tartalmazza a KLF4-t, az érett 3T3-L1 sejtekben azonban sokkal kisebb mértékben van jelen. Az adipogenezis korai szakaszában expresszálódik, siRNS-sel való csendesítése a lipid felhalmozódást csökkenti (185). A KLF6 szintén a 3T3-L1 sejtek differenciációjakor indukálódik és valószínűleg a DLK-1

(delta-szerű protein-1) génextpressziójának repressziója révén segíti elő a zsírsejt differenciációt (186).

1.8.5. További effektorok

Az adipocita differenciációt befolyásoló pozitív és negatív regulátorok főként a PPAR γ expresszióját vagy/és aktivitását modulálják. A teljesség igénye nélkül a pozitív regulátorok közé tartozik az AP-1 és a STAT-ok (STAT3, 5a, 5b). A Wnt glikoproteinek (Wnt10b, 5a), a GATA faktorok (GATA2, GATA3) valamint a Pref-1 az adipogenezist gátolják (129). Az eddigi eredmények szerint az adipogenezis szabályozása rendkívül komplex, és leginkább a mesterregulátor PPAR γ aktivitásának modulációjára épül.

1.9. Metabolikus szindróma és fehérje homeosztázis

A metabolikus szindróma esetén fennálló anyagcsere zavarok a fehérje homeosztázisra is erőteljes hatással vannak. Az elhízott Zucker patkányokban a magas glukózsztint által indukált oxidatív stressz a fehérjék denaturációjához és aggregációjához vezet, amellyel csak az autofágia tud megbirkózni (187). Diabéteszes majmok hasnyálmirigyében emelkedett Hsp90, HSF1 és Hsp70 szinteket mértek, amely feltehetően egy kompenzatorikus válasz a fehérje homeosztázist érő stresszhatásra (188). A diabétesz során károsodott inzulin jelátvitel a glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3), az extracelluláris szignál regulált kináz-1 (ERK-1) és a c-jun N terminális kináz (JNK) aktivációja révén csökkenti a HSF1-függő hőshock választ (189, 190). A fenti példák alapján a metabolikus szindrómát, mint általános proteotoxikus stresszort értelmezhetjük. Mindemellet a Hsp90-kliens kapcsolatra kifejtett hatásáról kevés adat van. Két közlemény is beszámol arról, hogy a hiperglikémia gátolja az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) Hsp90 általi stabilizációját közvetlenül, illetve paradox módon a Hsp90-kappaB kináz inhibitor (IKK) kölcsönhatás fokozása révén

(191, 192). Az így előálló eNOS aktivitáscsökkenés NO-deficiens állapothoz, illetve endotél diszfunkcióhoz vezet. Ezzel szemben az antidiabetikum metformin facilitálja a Hsp90-eNOS asszociációt és serkenti az NO-termelést (193).

A hősokkválasz indukciója visszahat a metabolikus állapotra. Magas zsírtartalmú étrenden tartott patkányok tizenkét hetes, heti egyszeri 41°C-os hőkezelése javítja a glükóz toleranciát és csökkenti a vázizmokban a metabolikus stresszt, többek között a stressz-aktiválta JNK és IKK aktivitást, amelyre az őket gátló Hsp72 és Hsp25 indukciója adhat magyarázatot (194). A Magyarországon kifejlesztett chaperon ko-induktor BRX-220 elhízott, diabetikus Zucker patkányokban és streptozotocinnal kezelt patkányokban egyaránt javítja az inzulin érzékenységet (195). Magas zsírtartalmú étrenden tartott rágcsálókban a Hsp70 globális vagy vázizmokban történő túltermeltetése, hősokk általi vagy farmakológias indukciója a chaperon ko-induktor BGP-15-vel egyaránt kivédi az elhízás által előidézett inzulin rezisztenciát (196). Ennek feltehető mechanizmusa a Hsp72 által létrehozott fokozott mitokondriális biogenezis és oxidatív metabolizmus (197). Mindezt humán klinikai vizsgálatok is alátámasztják. Inzulin rezisztens, nem diabéteszes betegeknél egy hónapnyi BGP-15 kezelés szignifikánsan javította az inzulin érzékenységet, így a szintén magyar vegyület ígéretes antidiabetikum lehet (198). A Hsp70 indukciója az inzulin rezisztencia által indukált endoteliális diszfunkció ellen is véd (199). Összefoglalva, számos adat támasztja alá, hogy a metabolikus stressz rontja a fehérje homeosztázist és hogy a hősokkfehérjék indukciója – elsősorban a vázizomban – javítja az inzulin érzékenységet. Azonban a metabolikus szindrómában szintén sarkallatos szerepet játszó zsírszövetről és a Hsp90 specifikus szerepéről nem rendelkezünk ismeretekkel.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám céljával az alábbi kérdések megválaszolását tűztem ki:

1. Milyen kapcsolat van a Hsp90 működése és az adipocita differenciáció között?
2. Milyen molekuláris mechanizmus áll a Hsp90 és az adipogenezis kapcsolatának hátterében?
3. Milyen hatást gyakorol a Hsp90 kapacitását csökkentő proteotoxikus stressz az adipogenezisre?
4. Reverzibilis-e ez a hatás, lehet-e ez egy új szabályozó mechanizmus?

3. MÓDSZEREK

3.1. Anyagok, konstruktok

A sejtek fenntartásához szükséges reagensek a Gibco-Invitrogen-től származtak. A kísérletek során a következő fehérjék elleni antitesteket használtam fel, PPAR γ (Abcam és Cell Signaling Technology), Akt, C/EBP α és adiponektin (Cell Signaling Technology), β -aktin (Sigma), Hsp90 α és β (Institute of Immunology Ltd.). A Complete proteáz gátló tabletták a Roche-tól, az előhíváshoz használt kemilumineszcens kit pedig a Perkin-Elmertől származtak. Amennyiben külön utalás nem történik, a kísérletek során felhasznált anyagokat vagy a Sigma, vagy a Fluka cégtől szereztük be.

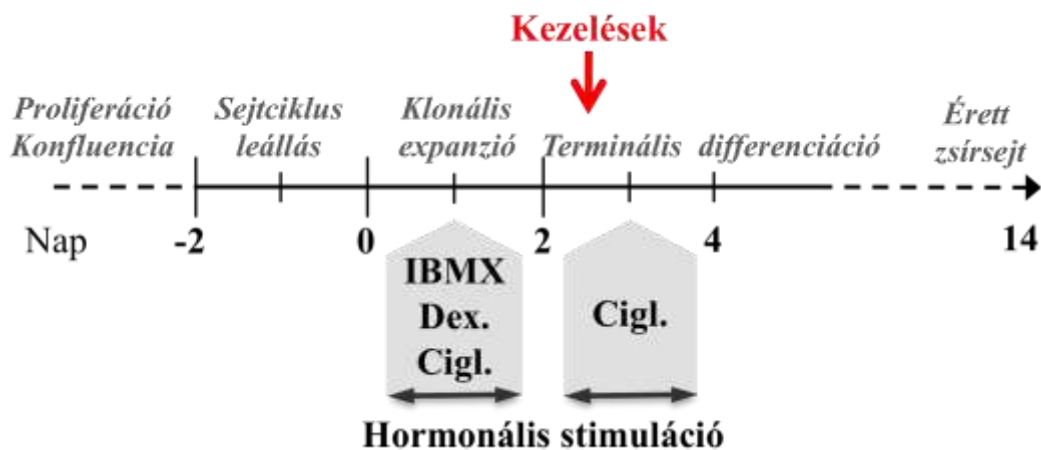
3.2. Sejtkultúra (3T3-L1, HepG2)

Az adipocita differenciáció vizsgálatára egy kiterjedten használt *in vitro* modellt, a 3T3-L1 sejtvonalat használtam (142). A 3T3-L1 egér fibroblaszt és HepG2 humán hepatoma sejtek az ATCC sejtbankból származtak. A sejteket izobárikus oxigénszint és 5% CO₂ jelenlétében, 37°C-on Dulbecco féle módosított Eagle médiumban (DMEM) (Life Technologies-Invitrogen) tenyésztettem. A médiumot a következő anyagokkal dúsítottam: 4,5 mg/ml glükóz, 2 mM L-glutamin, 1,5 g/l nátrium bikarbonát, 100 μ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin. 3T3-L1 sejtek esetén 10% marha szérumot, HepG2 sejtek esetén 10% magzati marha szérumot adtam a médiumhoz.

3.3. Adipocita differenciáció és kezelések

A preadipociták tenyésztése, differenciációja, valamint a differenciálódott adipociták fenntartása során mindvégig 4,5 mg/ml glükóz tartalmú DMEM-et használtam. A 3T3-L1 fibroblasztokat konfluenciáig tenyésztettem, majd 2 nappal a konfluencia elérése után (0. nap) differenciációs médiummal (DMEM, 10% magzati marha szérum, 1 μ M dexametazon, 0,5 mM 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) és 1 μ M

ciglitizon) indítottam el az adipocita differenciációt. 48 órával később a sejteken levő médiumot 10% magzati marha szérumot és 1 μ M ciglitizon tartalmú DMEM médiumra cseréltem (7. ábra). Újabb 48 óra elteltével a médiumot 10% marha szérumot tartalmazó adipocita médium váltotta fel, amit két naponta cseréltem a kísérletek végéig. Az adipocita differenciáció protokollját Student és munkatársai alapján módosítva alkalmaztam (200). A kezeléseket a differenciáció 3. napján, érett zsírsejtek esetén a 12. napon végeztem el különböző koncentrációjú geldanamycin, PI3K inhibitor LY294002 (Cell Signaling Technology), vagy proteaszóma gátlószer MG132 (Calbiochem) médiumhoz való hozzáadásával. A kezelési idő lejártakor a sejteken médiumot cseréltem. A kezelések időtartama, valamint a pontos koncentrációk a megfelelő ábraszövegekben találhatóak.



7. ábra Az adipocita differenciáció menete.

Az ábrán az adipogenezis fázisait, a hormonális indukció és a különböző kezelések (IBMX, dexametazon, ciglitizon) időtartamát tüntettem fel. Részletes leírás a Módszerek fejezetben megtalálható.

3.4. Oil red O festés, fénymikroszkópia és abszorpció mérés

Az Oil Red O törzsoldatot 0,5% Oil Red O izopropanolban történő feloldásával készítettem. A sejteket fedőlemezen tenyésztettem, majd kétszeri PBS mosás után legalább egy órán keresztül 10% formalinban fixáltam. További két desztillált vizes mosás után a sejteket 10 percig 60%-os izopropanolban inkubáltam, majd 10 percig festettem frissen készített Oil Red O oldatban, mely a törzsoldatot és desztillált vizet tartalmazta 3:2 arányban. A festést követően a sejteket ötször mostam desztillált vízzel. A fedőlemezeket Vectashield (Vector Laboratories) segítségével tárgylemezre vittem, majd egy Nikon Eclipse E400 mikroszkóp segítségével vizsgáltam és fényképeztem a mintákat. A lemezen tenyésztett sejteket Alpha XD2-2T inverz mikroszkóppal vizsgáltam, majd Alpha DMC-510 USB kamerával fényképeztem. A lipidakkumulációt kvantitatíve fotometriával határoztam meg. Fotometria céljából a megfestett sejteket száradni hagytam, majd tömény izopropanolban, enyhe billegtetéssel 10 perc alatt oldottam ki a sejtbe került Oil Red O-t. A minták optikai denzitását 500 nm-en mértem, előzőleg izopropanollal nullázott Thermo Varioskan Flash fotométer (Thermo Scientific) segítségével.

3.5. Sejtek lízise

Különböző koncentrációjú geldanamycin és/vagy MG132, illetve hősokk kezelés után a sejteket jéghideg PBS-es (1,54 mM KH_2PO_4 , 154 mM NaCl, 2,7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) mosás követően WB lízis pufferrel (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 20% glicerin, 1% NP40, 0,5 mM DTT, 2x Complete, pH 7,6) lízáltam 4°C-on, 20 percig. Erőteljes vortexelés után a mintákat 13,000 rpm-en, 10 percig 4°C-on centrifugáltam. A fehérje koncentrációt a felülúszóból Bradford módszerrel határoztam meg, majd azonos fehérjemennyiségeket (kísérlettől függően 20-50 μg -ot) vittem SDS-poliakrilamid géltre. Az aggregált PPAR γ vizsgálatához a szolubilis fehérjéket tartalmazó felülúszót a fent említett módon különítettem el egy új Eppendorf csőben. Az aggregált fehérjéket tartalmazó detergens inszolubilis pelletet a WB lízis pufferrel megegyező térfogatú urea pufferrel (2% SDS, 6

M urea, 30 mM Tris, pH 7,6) tettem oldhatóvá (201). A szolubilis és inszolubilis frakciókból azonos térfogatokat vittem SDS-poliakrilamid géltre.

3.6. Fehérje koncentráció meghatározás

A fehérjekoncentrációt Bradford módszere szerint (202), Bio-Rad reagenssel, vagy BCA protein assay kittel, marha szérumalbumin standarddel határoztam meg.

3.7. A Hsp90-PPAR γ in vivo komplexének vizsgálata immunprecipitációval

5×10^6 sejtet 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (446 nM) geldanamycinnel vagy DMSO-val 2 órán keresztül kezeltem. Háromszori mosást követően a sejteket jéghideg PBS-ben kapartam föl, a lizáláshoz IP lízis puffert (50 mM Tris, pH 7,5, 2 mM EDTA, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM Na_3VO_4 , 1% NP40, 2x Complete) használtam. Erőteljes vortexelés után a mintákat 13,000 rpm-en, 10 percig 4°C-on centrifugáltam. A fehérje koncentrációt a felülúszóból Bradford módszerrel határoztam meg. Az immunprecipitációhoz mindegyik mintából 1500 μg fehérjét használtam, valamint a gyártó utasításának megfelelő mennyiségű monoklonális anti-PPAR γ antitestet, majd 4°C-on 2 órát inkubáltam, ezt követően ekvilibrált protein G-kapcsolt Sepharose gyantát (GE Healthcare) adtam hozzá. 2 óra múlva a pelletet ötször mostam IP lízis pufferrel (12,000 rpm, 45 s, 4°C-on), majd 1x-es töménységű Laemmli pufferben vettem fel. 95°C-on, 5 perc forralást és rövid centrifugálást követően a felülúszót óvatosan egy új Eppendorf csőbe vittem át, majd SDS-gélre vittem.

3.8. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A fehérjéket denaturáló diszkontinuus 7,5-12%-os SDS-PAGE segítségével, Laemmli módszerét követve választottam el (203). A géltre mindegyik mintából azonos mennyiséget vittem föl. A géleket mérettől függően 160-200 mV konstans feszültséggel, szobahőn futtattam.

3.9. Western blot

Az elektroforetikus elválasztás után immunoblottal detektáltam a kimutatandó fehérjéket. Az elektroforézis befejeztével a fehérjéket félszáraz blotkészülékkel transzferáltam nitrocellulóz (TransBlot, Bio-Rad) vagy PVDF (ImmunBlot, Bio-Rad) membránra 1.25 mA/cm^2 , áramerősséggel 70 percig 4°C -on. A blotok kezelésének minden egyes lépése TBS-T (20 mM TrisHCl, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6) alappufferrel történt. Az aspecifikus kötőhelyeket 5% sovány tejpport tartalmazó TBS-T-vel legalább 60 percig blokkoltam. Az elsődleges antitesteket 1:1000-1:5000 hígításban, 5% BSA TBS-T-ben 4°C -on, éjszakán keresztül inkubáltam. A blotokat ezután 3×5 -10 percig mostam, majd 1:1000-1:5000 arányban hígított peroxidáz-konjugált másodlagos antitesttel (DAKO) szobahőn 45-60 percig sötétben inkubáltam. Alapos, 5×10 perces mosás után a reaktív fehérjéket kemilumineszcens kittel (Amersham Pharmacia Biotech) detektáltam, a gyártó utasításai alapján. A fehérje szintek meghatározását denzitometriával végeztem, amelyhez Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) programot használtam. A kapott denzitometriás értékeket a kontrollként használt megfelelő β -aktin értékekre normáltam.

3.10. Sejtek viabilitásának vizsgálata

Az élő sejtek arányát tripánkék festést követően a színtelen (élő) és kék (nekrotikus) sejtek Bürker-kamrában történő számolásával határoztam meg.

3.11. Az mRNS expresszió vizsgálata qRT-PCR módszerrel

Az mRNS-t GeneJET RNA Purification Kit segítségével izoláltam. cDNS-t a RevertAid™ cDNA Synthesis Kit (Fermentas) használatával a gyártó utasításai alapján szintetizáltam. A kvantitatív PCR reakció során használt primer párokat (egér PPAR γ 2, adiponektin, lipoprotein lipáz (LPL), GLUT4, aP2 és 28S rRNS) az alábbi publikáció alapján szintetizáltattam (204). A PCR-t az ABI 7300 System PCR

készülékében Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-szel (Fermentas) hajtottam végre a gyártó ajánlása alapján. Az mRNS-ek relatív mennyiségét komparatív CT módszerrel határoztam meg, és a 28S rRNS mRNS szintjére normáltam.

3.12. Statisztikai elemzés

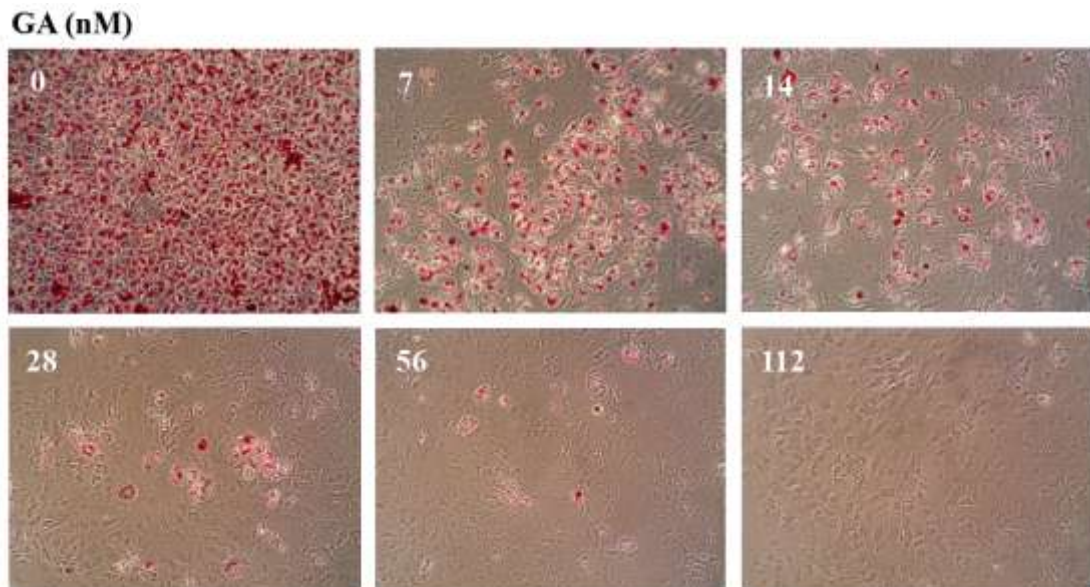
Az adatokat Student's párosítatlan kétmintás t próbával hasonlítottam össze. A grafikonokon számtani középérték \pm szórás (S.D.), a táblázatokban a számtani átlag \pm az átlag szórása (S.E.M.) szerepel. A szignifikancia határát $p < 0,05$ értékben állapítottam meg és a grafikonokon *-gal jelöltem. További jelölések: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A Hsp90 gátlása gátolja 3T3-L1 sejtek differenciációját és túlélését

A Hsp90 adipogenezisben betöltött szerepét egy bevált és széleskörűen használt modellen, a 3T3-L1 preadipocitákon vizsgáltam. A 3T3-L1 sejtek hormonális stimuláció hatására körülbelül két hét leforgása alatt érett zsírsejteké differenciálódnak (**7. ábra**). A sejtek ez idő alatt citoplazmájukba triglicerid tartalmú zsírcseppecskéket halmoznak föl, amelyek lipofil Oil Red O festékkal megfesthetők.

A Hsp90 szerepét specifikus gátlószere, a geldanamycin (GA) alkalmazásával vizsgáltam. A GA kezelést a mitotikus klonális expanzió végén, azaz akkor végeztem, amikor további sejtosztódás már nem történt, így kifejezetten a terminális differenciációra kifejtett hatását tanulmányozhattam. Egyetlen átmeneti, 20 óra időtartamú GA kezelés koncentrációfüggően és igen hatékonyan gátolta az adipogenezist (**8. ábra**).



8. ábra A geldanamycin gátolja az adipocita differenciációt.

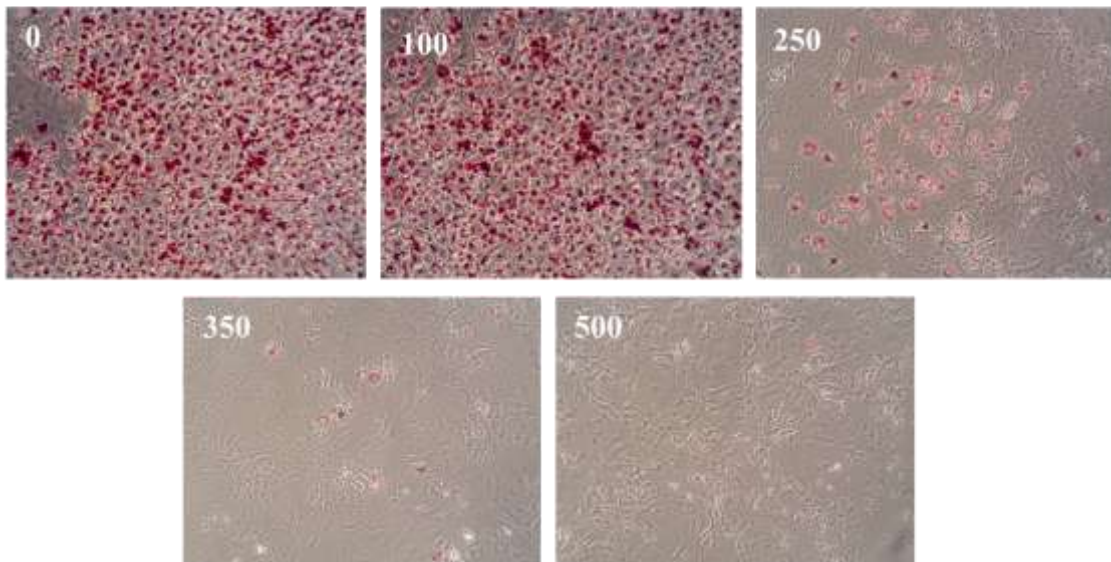
A 3. napon 20 órás GA koncentrációssorral kezelt 3T3-L1 sejtek 14. napon készített mikroszkópos képe. Vörösen a felhalmozódott zsírcseppecskék láthatóak Oil Red O festés után.

Megjegyzendő a nem festődő, nem differenciálódó, élő preadipociták jelenléte a GA kezelt mintákban. Reprezentatív képsor hat független kísérletből.

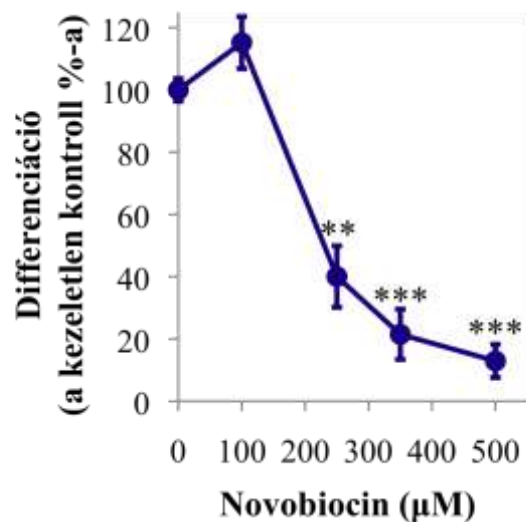
Hasonlóan koncentrációfüggő gátlást kaptam egy C-terminálison ható, eltérő szerkezetű Hsp90 gátlószer, a kumarinszármazék novobiocin alkalmazásával (**9. ábra**). Tehát a különböző szerkezetű és a Hsp90 más kötőhelyeire kötő, de az ATP- és chaperon ciklusát gátolni képes inhibitorok egyaránt meggátolják a 3T3-L1 sejtek adipocitákká történő differenciációját.

a

Novobiocin (μM)



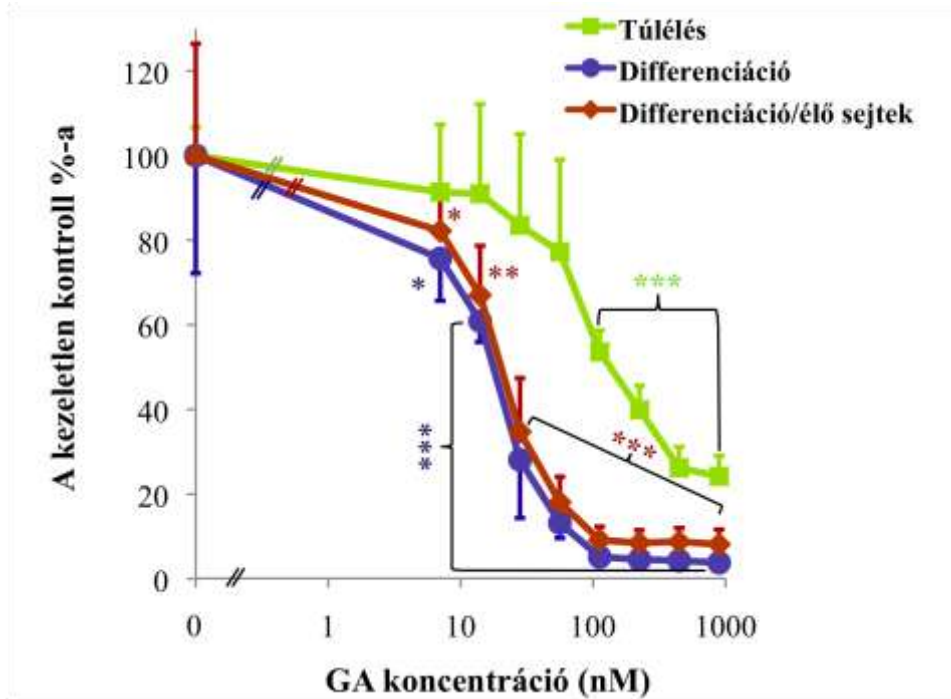
b



9. ábra A novobiocin gátolja az adipocita differenciációt.

(a) A 3. napon 20 órás, különböző koncentrációjú novobiocinnal kezelt 3T3-L1 sejtek 14. napon készített reprezentív mikroszkópos képe (három független kísérletből). Vörösen az akkumulálódott zsírcseppek láthatóak Oil Red O festés után. Megjegyzendők a novobiocinnal kezelt mintában látható nem festődő, nem differenciálódó, élő preadipociták. (b) Fotometriával leolvasott Oil Red O abszorpciós értékek átlaga grafikusan ábrázolva, három független kísérlet alapján. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A Hsp90 inhibitor adipocita differenciációra kifejtett gátló hatásának egyik lehetséges mechanizmusa a sejthalál indukciója. Ugyan kísérleteim során számos élő, nem differenciálódó sejtet is megfigyeltem a különböző Hsp90 gátlószer hatására, ez alapján sejthalált egyértelműen nem tudtam kizárni (**8. és 9. ábra**). Hogy világosan szét tudjam választani a Hsp90 gátlás differenciációra és túlélésre kifejtett hatásait, számszerűleg is meghatároztam párhuzamosan kezelt minták differenciációjának és viabilitásának IC₅₀ értékét a 14. napon. A Hsp90 sejt túlélésére gyakorolt hatásával összhangban megfigyeltem, hogy a geldanamycin különösen magas koncentrációknál toxikus volt a sejtekre nézve. A Hsp90 gátlószer koncentrációfüggően gátolta az adipocita differenciációt, 56 nM-nál a differenciáció gátlás mértéke több, mint 80% volt, eközben a sejtek túlélésére nem gyakorolt szignifikáns hatást (**10. ábra**). Megfigyeltem, hogy a geldanamycin sejt túlélésre meghatározott IC₅₀ értéke tízszer magasabb volt, mint a differenciációé (163,6 nM vs. 16,38 nM). A differenciáció IC₅₀ értéke az élő sejtek számára történő normalizálás után sem változott jelentős mértékben (20,45 nM) (**1. táblázat**). Ezek az eredmények mutatják, hogy a Hsp90 adipocita differenciációt elősegítő hatása nem elsősorban a túlélést támogató működésén alapul.



10. ábra Az ábrán a GA-nel 3. napon kezelt sejtek 14. napon szimultán meghatározott Oil Red O abszorpciós értékét és az élő sejtek arányát ábrázoltam a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva. A kísérletet párhuzamosan kezelt sejteken végeztem. Az élő sejtek számát tripánkék kizárásos módszerrel állapítottam meg. Az Oil Red O abszorpciós értéket az élő sejtek számára normalizáltam, megkapva a differenciáció/élő sejtek hányadost. A kísérlethez tartozó IC50 értékek az **1. táblázat**ban megtalálhatók. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

1. táblázat A geldanamycin kezelés IC50 értékeinek statisztikai összehasonlítása

Ábra	Paraméter	Átlag IC50 (nM)	Átlag LogIC50	SEM LogIC50	n	p vs. differenciáció	p vs. PPAR γ 2 fehérje
10	Differenciáció	16,38	1,214	0,080	3	--	0,0908 (ns)
10	Túlélés	163,60	2,214	1,111	3	0,0005 (***)	0,0026 (**)
10	Differenciáció/élő sejtek	20,45	1,311	0,100	3	0,0777 (ns)	0,3249 (ns)
12	PPAR γ 1 fehérje	50,99	1,708	0,053	3	0,0413 (*)	0,5457 (ns)
12	PPAR γ 2 fehérje	40,78	1,610	0,062	3	0,0908 (ns)	--
12	Akt fehérje	53,74	1,730	0,094	3	0,0339 (*)	0,3356 (ns)
17	PPAR γ 2 mRNS	39,06	1,592	0,103	3	0,1498 (ns)	0,8533 (ns)
17	GLUT4 mRNS	41,93	1,622	0,113	3	0,0999 (ns)	0,9936 (ns)
17	aP2 mRNS	85,49	1,932	0,082	3	0,0096 (**)	0,1032 (ns)
17	adiponektin mRNS	43,82	1,642	0,087	3	0,0688 (ns)	0,8044 (ns)

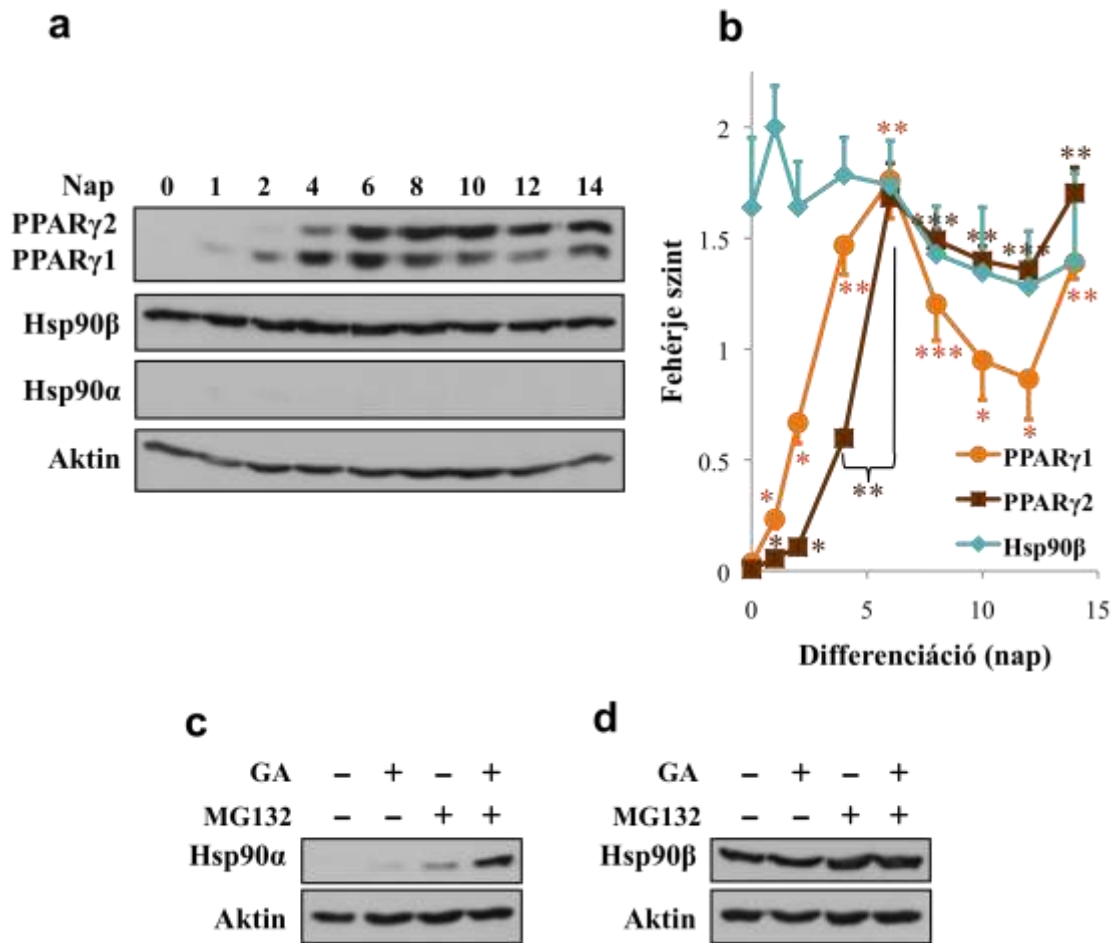
S.E.M. = az átlaghoz tartozó szórás

n = független kísérletek száma

p = párosítatlan, kétmintás *t*-próbával meghatározott szignifikancia érték

4.2. A Hsp90 gátlása csökkenti a PPAR γ fehérje szintjét 3T3-L1 sejtekben

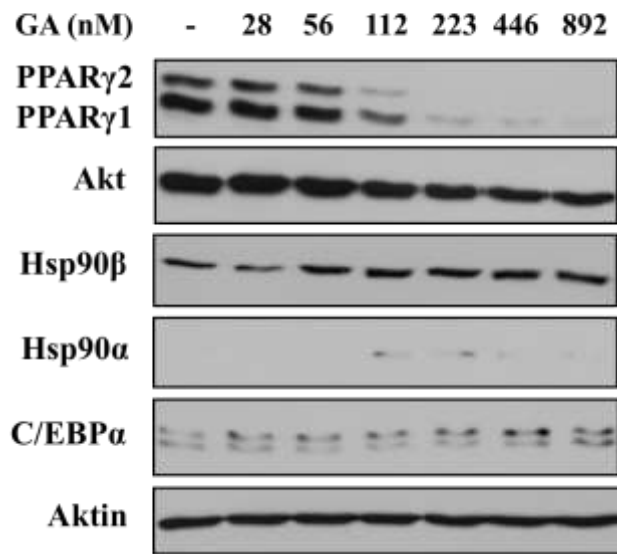
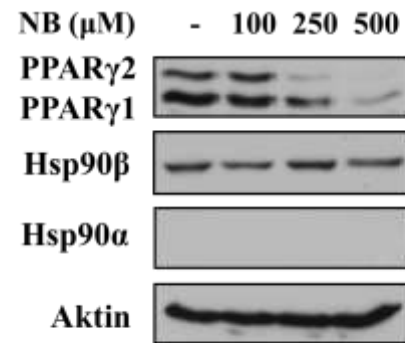
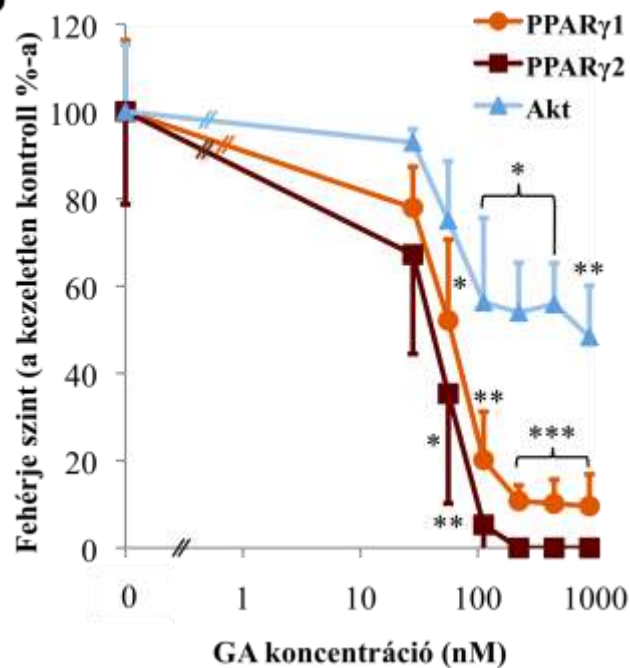
Következő lépésben azokra a molekuláris mechanizmusokra voltam kíváncsi, amelyek a geldanamycin által okozott adipogenezis gátlásért felelősek lehetnek. Az egyik lehetséges támadáspont a PPAR γ , amely az adipocita differenciáció mester regulátora és a terminális differenciáció folyamán fejti ki hatását. Western blottal valóban megfigyeltem a PPAR γ indukcióját, amely először a 2. napon jelent meg, és a PPAR γ 1 izoforma felszaporodásával járt, majd fokozatosan eltolódott a zsírszövet specifikus PPAR γ 2 izoforma irányába (**11. ábra**).



11. ábra PPAR γ , Hsp90 α és Hsp90 β fehérjék expressziója 3T3-L1 sejtekben.

(a) PPAR γ , Hsp90 α és Hsp90 β fehérjeszintek változása az adipocita differenciáció alatt a 0. napos kontrollhoz viszonyítva. Repreratív Western blotok két független kísérletből. (b) A Western blotok denzitometriás kiértékelése β -aktinra normalizálva. Az ábrázolt értékek a független kísérletek denzitometriás értékeinek átlaga \pm a szórás A. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (c) Hsp90 α és (d) Hsp90 β Western blot képe 20 órás, 446 nM (0,25 μ g/ml) GA-nel és/vagy 20 μ M MG132-vel kezelt 3T3-L1 sejtek lizátumából. Repreratív blotok két független kísérletből.

Felmerült bennem a kérdés, vajon a PPAR γ a Hsp90 kliense-e. A kliensfehérjék hosszú idejű Hsp90 gátlás hatására proteaszomálisan lebomlanak, ezért a sejtekben a mennyiségük csökken. Hogy megvizsgáljam ezt a lehetőséget, a 3T3-L1 sejteket a harmadik napon 20 óráig GA koncentrációssal kezeltem, majd a sejtizátumokból készített Western blotot anti-PPAR γ antitesttel hívtam elő. Azt tapasztaltam, hogy a GA kezelés koncentrációfüggően és teljesen lecsökkentette a PPAR γ mindkét izoformájának szintjét (**12. ábra**), a PPAR γ 1 esetén 51 nM, a PPAR γ 2 esetén pedig 40,8 nM volt az IC50 érték (**1. táblázat**). Mindeközben a konstitutívan termelődő Hsp90 β fehérje szintje enyhe mértékben emelkedett, az indukálható α izoforma pedig kizárólag különböző erős proteotoxikus stresszek alkalmazásával volt detektálható a kísérlet folyamán (**11., 12. ábra**). Ezen eredmények nem zárják ki a PPAR γ -Hsp90 α kölcsönhatást, de arra engednek következtetni, hogy ezen körülmények között 3T3-L1 sejtekben mindkét PPAR γ izoforma mennyiségét a Hsp90 β funkciója/kapacitása határozza meg.

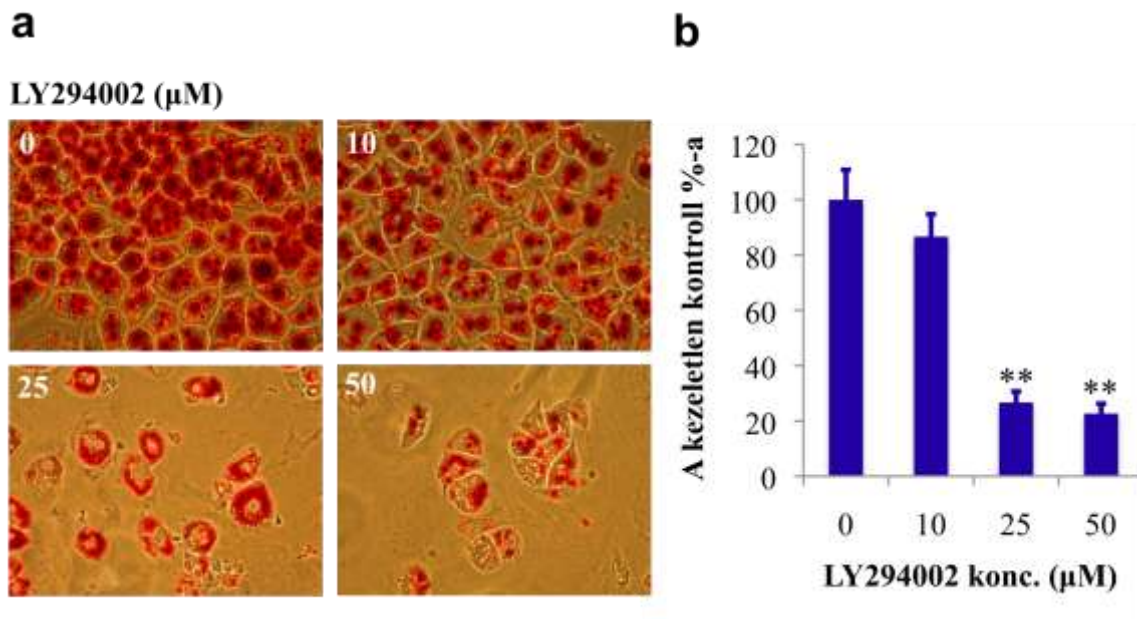
a**c****b**

12. ábra A Hsp90 gátlása csökkenti a PPAR γ fehérje szintjét.

(a) GA kezelés hatása a PPAR γ , Akt, Hsp90 α , Hsp90 β és C/EBP α p42 fehérje szintekre. 3T3-L1 sejtek 3. napon történő 20 órás GA kezelését követően készült reprezentatív Western blot kép, három független kísérletből. (b) A Western blotok denzitometriás kiértékelése. Az ábrázolt értékek a független kísérletek denzitometriás értékeinek átlaga \pm a szórás. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

*** $p < 0,001$. Az IC₅₀ értékeket az **1. táblázatban** tüntettem fel. **(c)** Novobiocin kezelés hatása a PPAR γ , Hsp90 α és Hsp90 β fehérje szintekre. 3T3-L1 sejtek 3. napon történő 20 órás NB kezelését követően készült reprezentatív Western blot kép, két független kísérletből.

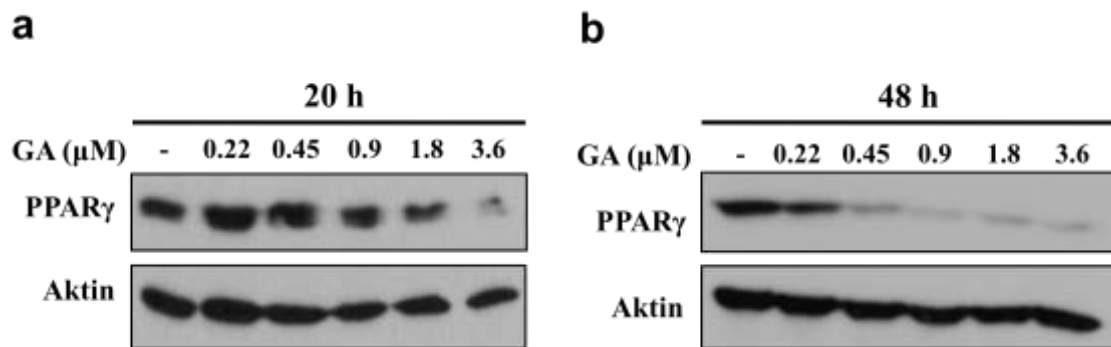
Ugyanebben a kísérletben a geldanamycin részben csökkentette a Hsp90-kliensként már ismert Akt kináz mennyiségét (**12. ábra**) (80). Az Akt a PI3K alatt működve kulcsszerepet tölt be az inzulin/IGF-1 jelátvitelben, amely hatásos adipogenezis aktivátor (205, 206). Ennek megfelelően a PI3K specifikus gátlószer LY294002 20 órás alkalmazása részlegesen gátolta az adipocita differenciációt (**13. ábra**). Ez alapján úgy tűnik, hogy a PI3K/Akt útvonal gátlása GA-nel szintén hozzájárulhat a 3T3-L1 sejtek differenciációjának gátlásához.



13. ábra A foszfatidil-inozitol-3-kináz gátlása gátolja a 3T3-L1 sejtek adipogenezisét.

(a) A 3. napon 20 órás különböző koncentrációjú PI3K gátlószerrel (LY294002) kezelt 3T3-L1 sejtek 14. napon készített reprezentatív mikroszkópos képe, két független kísérletből. **(b)** A sejtek lipid tartalmának fotometriás meghatározása Oil Red O abszorpció alapján. Az oszlopdiagramon ábrázolt értékek két független kísérlet átlaga \pm a szórás. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Mivel a PPAR γ és a C/EBP α az adipogenezis során szorosan együttműködik, kíváncsi voltam arra, hogyan hat a GA a C/EBP α fehérjeszintre. Az anti-C/EBP α antitesttel előhívott Western blotokon a p30 izoformát nem, csak a p42 izoformát sikerült detektálnom (**12. ábra**). A GA nem volt hatással a C/EBP α p42 izoforma szintjére, így kizárhatjuk, hogy adipocita differenciációt gátló hatása ezen fehérjén keresztül érvényesülne. Szerettem volna megvizsgálni, hogy vajon a Hsp90-PPAR γ kölcsönhatás zsírszövet specifikus-e, illetve van-e különbség a GA érzékenység tekintetében a 3T3-L1 és egy transzformált sejt között. HepG2 humán hepatóma sejtekben GA kezelés szintén csökkentette a PPAR γ fehérje szintjét (**14. ábra**), azonban a máj PPAR γ kevésbé volt érzékeny GA-ra. Ezen túlmenően a novobiocin a GA-hoz hasonlóan csökkentette a PPAR γ szintjét 3T3-L1 sejtekben (**12. ábra**). Az eredmények alapján a Hsp90 működése szükséges a PPAR γ fehérje szintjének fenntartásához különböző emlős szövetekből származó sejtekben.



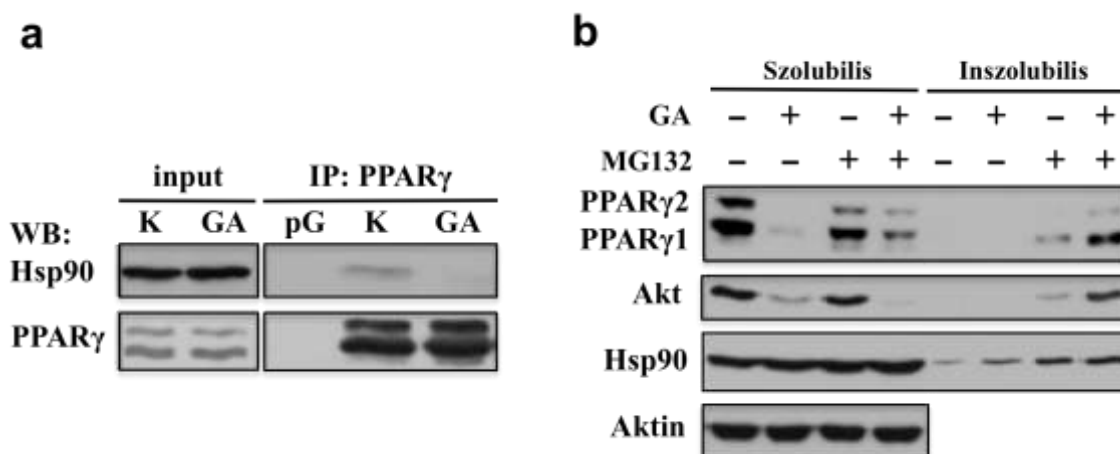
14. ábra A Hsp90 gátlása csökkenti a PPAR γ szintjét humán hepatóma sejtekben.

A 20 (a) vagy 48 (b) órás geldanamycin koncentrációsorral kezelt HepG2 sejtek reprezentatív Western blot képe, két független kísérletből.

4.3. A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatás gátlása a PPAR γ destabilizációját és proteaszomális lebontását idézi elő

A Hsp90 a kliensfehérjéket ATP-függő dinamikus, azaz átmeneti, gyenge komplexben stabilizálja. Ennek megfelelően arra voltam kíváncsi, vajon az endogén PPAR γ kölcsönhatásban áll-e a Hsp90-nel. Ennek megválaszolására a harmadik napon a PPAR γ -t kontroll és GA-kezelt sejtekből immunprecipitáltam és ebben Western blottal megvizsgáltam a Hsp90 jelenlétét. Kis mennyiségű, a PPAR γ -val komplexben levő Hsp90-et detektáltam, mely egy gyenge vagy átmeneti kölcsönhatásra enged következtetni. A Hsp90-PPAR γ komplex 2 óra GA kezelés hatására felbomlott (**15. ábra**).

A PPAR γ proteaszomális turnoverval rendelkezik (152, 207). A PPAR γ fehérje turnover, valamint a Hsp90-nel alkotott komplexe felveti annak lehetőségét, hogy Hsp90 gátlás hatására a PPAR γ először instabillá válik, majd a proteaszómában lebomlik. Ennek vizsgálatára a 3T3-L1 sejteket a harmadik napon 24 órás 446 nM GA-nel és/vagy 20 μ M MG132-vel kezeltem, majd a Módszerekben leírt eljárás szerint különítettem el a detergens szolubilis és inszolubilis frakciókat. Kísérleteim során valóban megfigyeltem, hogy a 3T3-L1 sejtek lizátumából a GA a PPAR γ 2 teljes, valamint a PPAR γ 1 és az Akt szinte teljes eltűnését eredményezi a detergens szolubilis frakcióból (**15. ábra**). GA és proteaszóma gátlószer együttes hatására a PPAR γ valamint az Akt egyaránt az aggregálódott fehérjéket tartalmazó detergens inszolubilis frakcióban tűnt fel (**15. ábra**). A fenti eredmények igazolják, hogy a Hsp90 a PPAR γ -val komplexet képez, melynek eredménye a PPAR γ natív szerkezetének kialakulása. A Hsp90 funkció gátlása esetén a produktív kölcsönhatás elmarad, és a PPAR γ szerkezetében bekövetkező destabilizáció a PPAR γ proteaszomális lebomlását (illetve aggregációját) eredményezi. Tehát a PPAR γ a Hsp90 kliense.

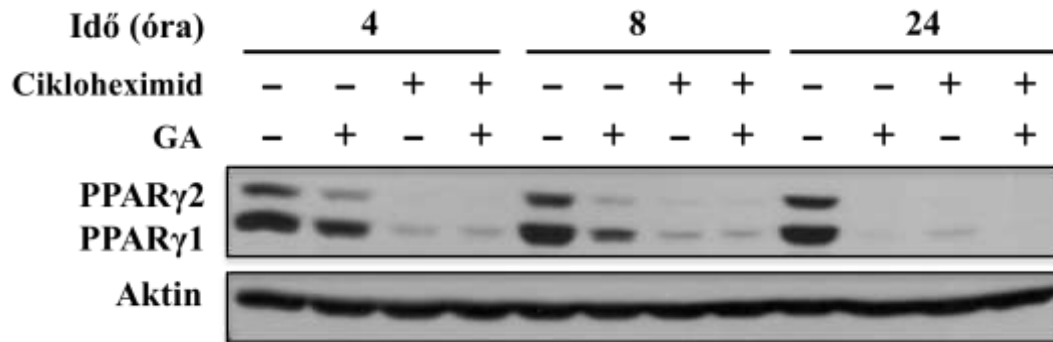


15. ábra A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatás gátlása a PPAR γ destabilizációjához és proteasomális lebontásához vezet.

(a) A PPAR γ GA-érzékeny komplexet képez a Hsp90-nel. A harmadik napon két órás 446 nM (0,25 μ g/ml) GA-nel vagy DMSO-val (kontroll) kezelt sejtek lizátumából származó PPAR γ -val ko-immunprecipitált Hsp90 Western blot képe, három független kísérletből. pG, protein G kontroll, K, kontroll (b) A Hsp90 gátlása a PPAR γ fehérje proteasomális degradációjához vezet. A harmadik napon 24 órás 446 nM GA-nel és/vagy 20 μ M MG132-vel kezelt sejtek lizátumának detergens-szolubilis, illetve detergens-inszolubilis frakcióinak Western blot képe, három független kísérletből.

A következőkben a megszintetizálódott PPAR γ turnoverének kinetikáját szerettem volna megvizsgálni. Ehhez a 3T3-L1 sejteket a harmadik napon különböző ideig kezelttem GA-nel és a PPAR γ fehérje mennyiségét Western blottal követtem. GA kezelés hatására a PPAR γ mintegy 2 órás, igen rövid felezési idővel bomlott le (**16. ábra**). Hogy kiküszöböljem az újonnan transzlálódó PPAR γ fehérje megjelenését, ami emelheti a látszólagos féléletidőt, az eukarióta transzláció inhibitorát, a cikloheximidet alkalmaztam. A PPAR γ már a legkorábbi, 4 órás időpontban teljesen eltűnt a sejtekből, összhangban a ligand (ciglitizon) által aktivált PPAR γ gyors proteasomális degradációjával (207). A cikloheximid és GA kombinált alkalmazására a PPAR γ cikloheximid kezeléshez hasonló, igen gyors eltűnését figyeltem meg (**16. ábra**). Mindez a Hsp90 chaperon funkciójáról alkotott jelenlegi modellel összhangban azt sugallja, hogy a *de novo* szintetizálódó PPAR γ a Hsp90 átmeneti segítségével igen

gyorsan kialakítja ligandkötő konformációját és a ligand-indukálta transzaktivációt követően rövidesen lebomlik. Ezzel szemben a Hsp90 gátlása esetén nem tud kialakulni a PPAR γ ligandkötő konformációja, és ugyanilyen gyors kinetikával, azonban transzaktiváció nélkül bomlik le (az erről alkotott modellt ld. később, a **28. ábrán**).



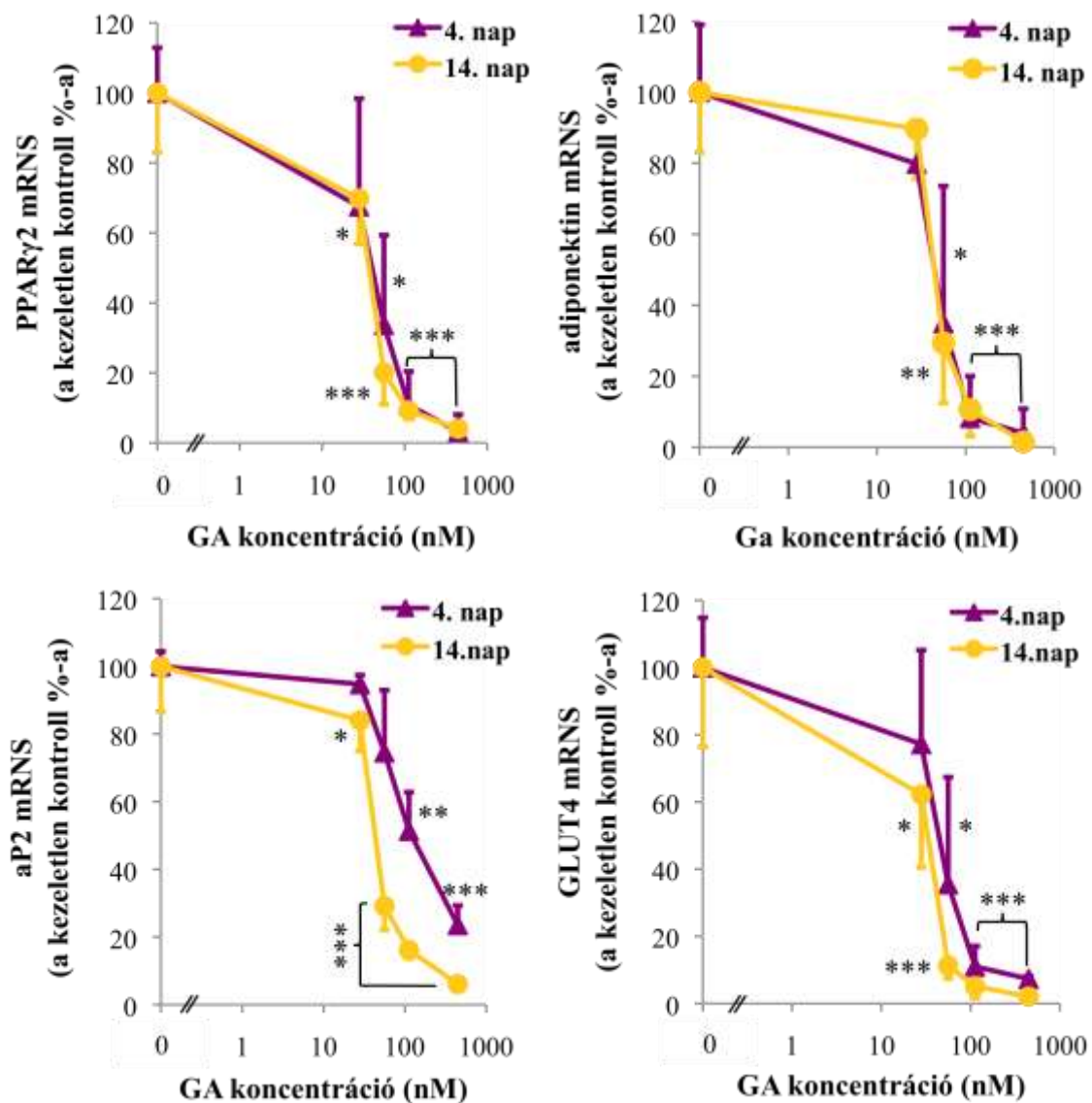
16. ábra A *de novo* szintetizált PPAR γ turnoverének vizsgálata.

3T3-L1 sejtek 3. napon történő 4, 8 vagy 24 órás 446 nM GA és/vagy 25 μ g/ml cikloheximid kezelését követően készült reprezentatív Western blot kép, három független kísérletből.

4.4. A Hsp90 működése szükséges a PPAR γ transzkripció funkciójához

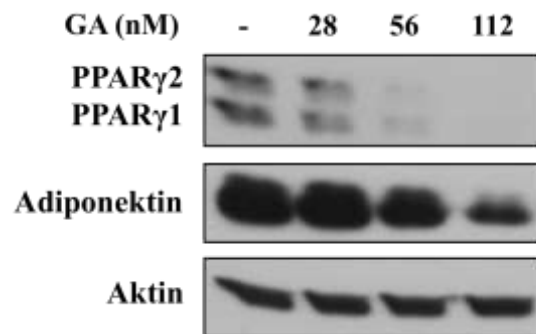
A fent megfogalmazott hipotézis megválaszolására, azaz a PPAR γ transzaktivációjának vizsgálatára PPAR γ -függő célgének expresszióját mértem kontroll és GA-kezelt preadipocitákon reverz transzkripciót követő kvantitatív PCR-rel, közvetlenül a kezelést követően a 4., és a differenciációs folyamat végén a 14. napon. A kísérletek során azt tapasztaltam, hogy a GA kezelés az összes általam vizsgált PPAR γ -függő mRNS transzkripciójának koncentrációfüggő és teljes gátlásához vezetett (**17. ábra**). A vizsgált mRNS-ek közül a GLUT4 és az aP2 a zsírszövet fenotípusának és funkciójának létrehozásához, az adiponektin pedig a szisztémás (inzulinérzékenyítő, gyulladásgátló) hatások kialakításához szükségesek. Az adiponektin expresszió csökkenését érett zsírsejtekben fehérje szinten is megerősítettem (**18. ábra**).

Megfigyeltem, hogy a GA kezelés a PPAR γ 2 mRNS expresszióját is gátolta (**17. ábra**), ezáltal az adipogenezis fontos pozitív visszacsatolási szabályozókörének működését függesztette fel. Tehát a Hsp90 szükséges a PPAR γ transzkripcionális válaszához, mely kialakítja és fenntartja az érett zsírsejtek jellegzetes működéseit. Érdeemes felfigyelni arra, hogy a különböző PPAR γ -függő célgének közel azonos GA koncentráció függéssel és IC50 értékkel rendelkeztek, és ezek igen hasonlóak voltak a PPAR γ fehérje degradáció IC50 értékéhez (**1. táblázat**). Ez igazolja a hipotézist, miszerint a PPAR γ fehérje Hsp90 általi stabilizálása elengedhetetlen ligandfüggő transzkripció aktivitásához.



17. ábra A geldanamycin gátolja a PPAR γ -függő mRNS-ek expresszióját.

Geldanamycin kezelés hatása a PPAR γ 2, az adiponektin, az aP2 és a GLUT4 mRNS szintre. A 3. napon történő 24 órás GA koncentrációsorral kezelt sejtek PPAR γ 2, adiponektin, aP2 és GLUT4 mRNS expressziója a 4. és a 14. napon. Az IC50 értékeket az **1. táblázat**ban tüntettem fel. Az ábrázolt értékek három független kísérlet átlaga \pm a szórás. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

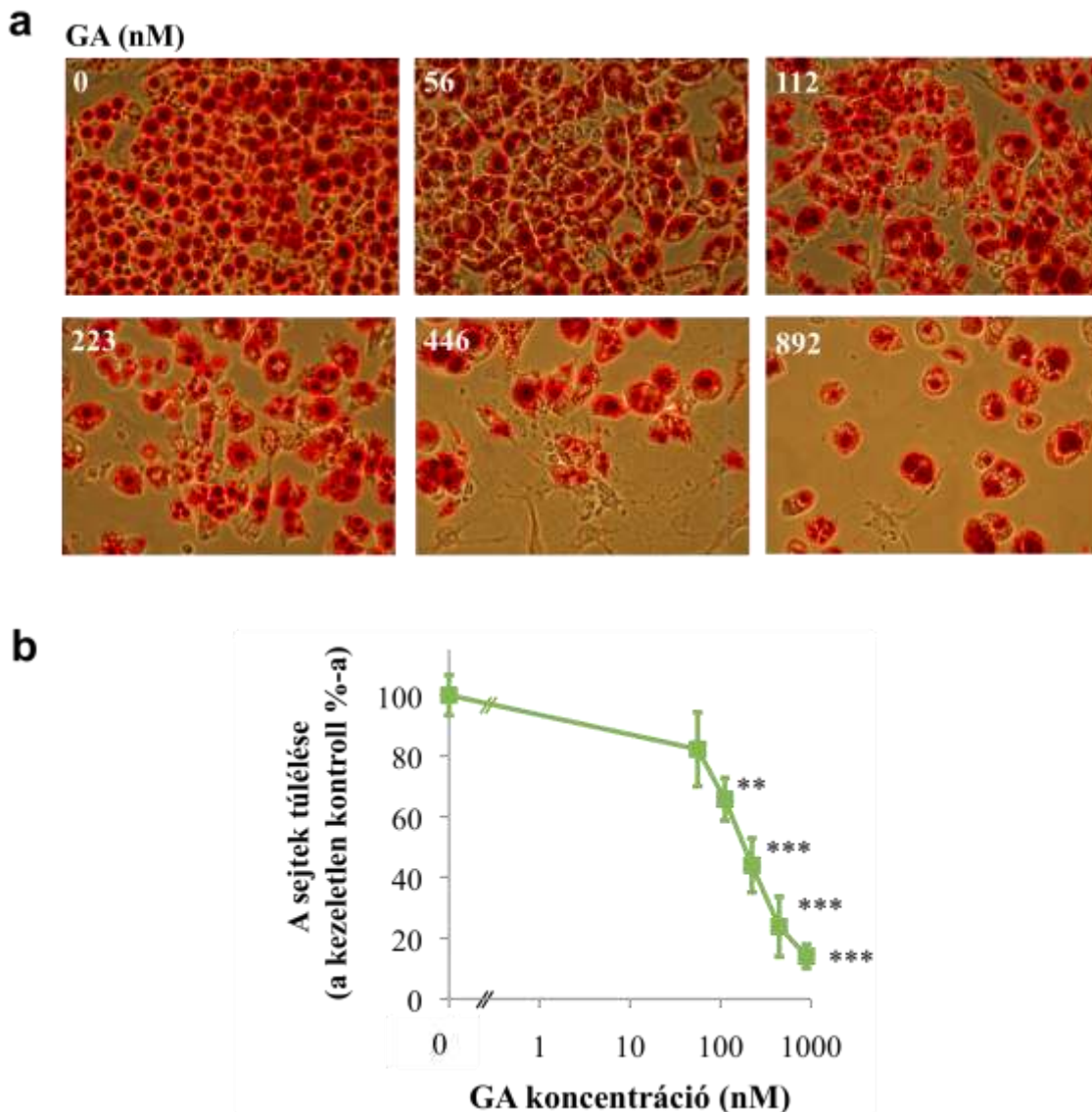
**18. ábra A geldanamycin párhuzamosan csökkenti a PPAR γ és az adiponektin fehérjék szintjét érett zsírsejtekben.**

3T3-L1 sejtek 13. napon történő 20 órás különböző koncentrációjú GA kezelését követően készült Western blot kép, két független kísérletből.

4.5. A Hsp90 funkció biztosítja az érett adipociták túlélését

A Hsp90-ról jól ismert a sejtek túlélésében játszott, többek között antiapoptotikus szerepe (208). Egy kondicionális zsírszövetspecifikus PPAR γ KO egérmodell segítségével kimutatták, hogy a PPAR γ az érett zsírsejtek túlélését biztosítja *in vivo* (168). Ebből kiindulva megvizsgáltam, milyen hatással van a Hsp90 gátlása differenciált 3T3-L1 sejtek életképességére. Szignifikáns citotoxikus hatást hosszabb, 48 órás GA kezelés után észleltem: a **19. ábra a** paneljén is látható a letapadt zsírsejtek számának jelentős csökkenése és az Oil Red O-negatív sejtek szinte teljes hiánya. Emellett nagyszámú felúszó, elhalt sejtet figyeltem meg. Egy párhuzamosan készített

mintát a felúszott sejtek begyűjtése után tripánkékekkel megfestve az élő sejtek masszív, koncentrációfüggő csökkenését kvantitatíve is megerősítettem (**19/b. ábra**). A 12. napon történő, az előzőeknél körülbelül 2,5-szer hosszabb idejű GA kezelés a 3. napon történt 20 órás kezelés túlélésre gyakorolt hatásához hasonló IC50 értéket eredményezett (170,2 vs. 163,6 nM, **1. táblázat**). Adataim azt bizonyítják, hogy az érett zsírsejtek – a differenciálódó preadipocitákhoz hasonlóan, bár azoknál kisebb mértékben – igénylik a Hsp90 funkcióját az életképességük megtartásához.



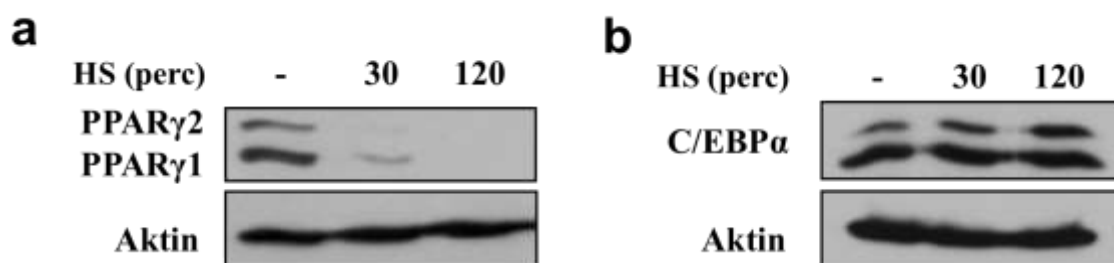
19. ábra A geldanamycin gátolja az érett zsírsejtek túlélését.

(a) 3T3-L1 sejtek 12. napon történő 48 órás GA koncentrációssal kezelt, 14. napon Oil Red O-val megfestett reprezentatív mikroszkópos képe, három független kísérletből. Megjegyzendő

az Oil Red O negatív sejtek hiánya. **(b)** Az (a) kísérletből megállapított sejttúlélés. Az ábrázolt értékek három független kísérlet átlaga \pm a szórás. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.6. A proteotoxikus stressz felfüggeszti a PPAR γ stabilizációját és leállítja az adipogenezist

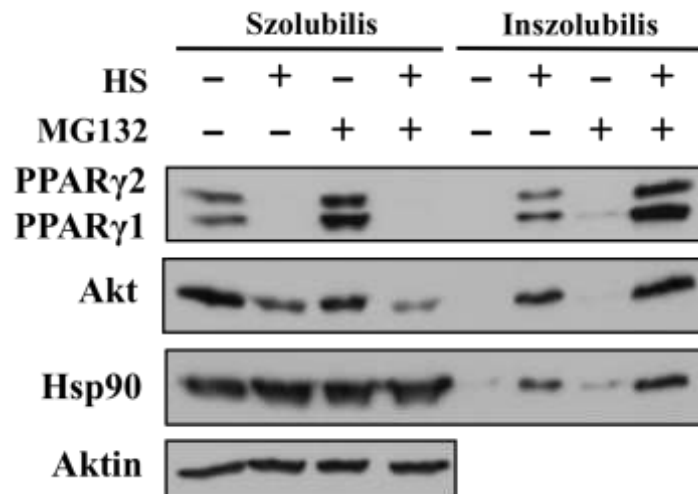
Korábbi és újabb tudományos adatok egyaránt igazolják, hogy a Hsp90 instabil fehérjékhez kötődik, legyenek ezek denaturáló behatásokra létrejövő fehérje specieszek vagy “intrinzik” termodinamikai instabilitású (kliens) fehérjék (99, 100), sőt, a kettő közötti átmenet feltehetően folytonos (100). Ismeretes, hogy a Hsp90 kapacitását meghaladó proteotoxikus (fehérje denaturáló) stresszek hatására új, addig a Hsp90 által pufferolt, akár adaptív evolúciós fenotípusok jelennek meg (209-212). Azonban a proteotoxikus stresszek Hsp90-kliens kapcsolatra kifejtett hatását ezidáig közvetlenül nem vizsgálták. Ezért arra voltam kíváncsi, hogy vajon a fehérjéket denaturáló (proteotoxikus) stresszek hogyan befolyásolják a PPAR γ stabilitását és az adipogenezist. Elsőként a proteotoxikus stresszek archetípusaként ismert hő sokkot alkalmaztam, amely fokozza a denaturált fehérjék keletkezését. Meglepődve tapasztaltam, hogy 3T3-L1 sejtek differenciációjának 3. napján alkalmazott 43°C-os mérsékelt hőkezelés, mely nem okozott számottevő sejthalált, már 30 perc alatt előidézte a PPAR γ fehérje szinte teljes eltűnését (**20. ábra**). Ezzel ellentétben a C/EBP α p42 fehérje szintje változatlan maradt.



20. ábra Átmeneti hő sokk hatása a PPAR γ és a C/EBP α p42 fehérje szintjére.

PPAR γ (a) és C/EBP α p42 (b) fehérje Western blot képe. 3T3-L1 sejtek 3. napon történő átmeneti hőszokk kezelését követően készült reprezentatív Western blot kép, két független kísérletből. HS, hőszokk.

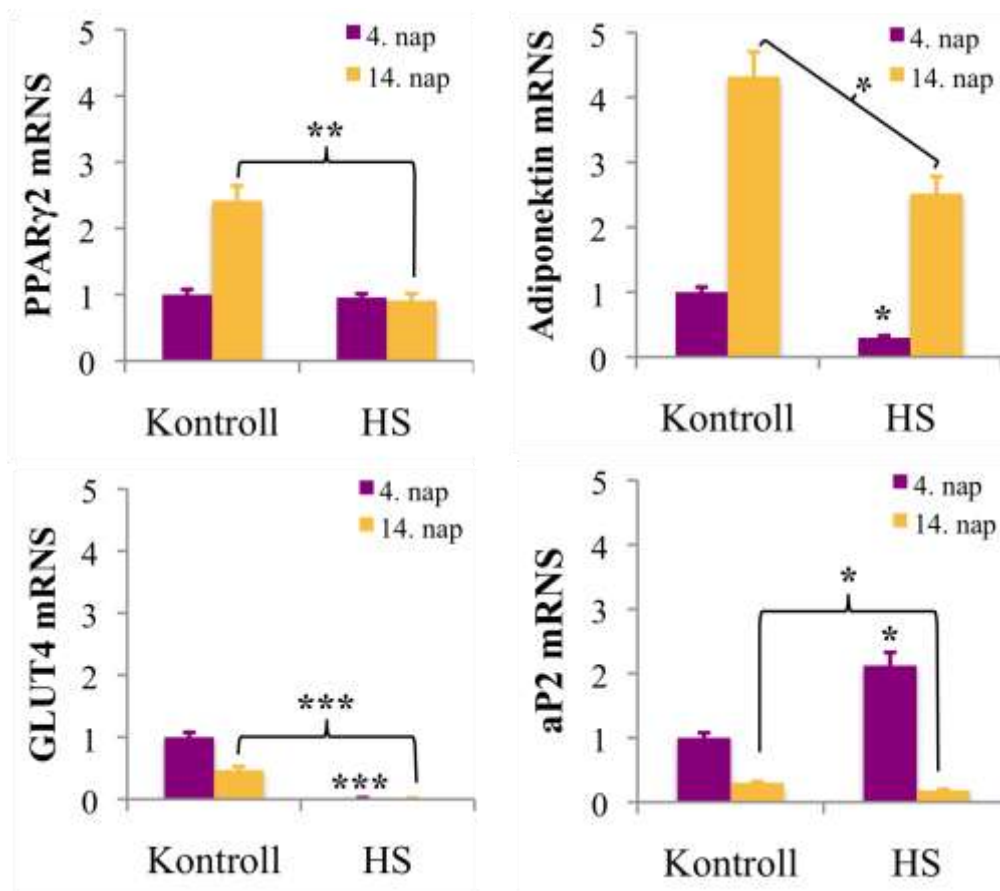
A PPAR γ gyors eltűnése kapcsán felmerült a proteaszóma szerepe. Ennek megválaszolására a sejtekből hőszokk és proteaszóma inhibitor kezelés után izoláltam a szolubilis és aggregált fehérje frakciót. A Western bloton meglepődve láttam, hogy hőszokk hatására a PPAR γ (és az Akt) fehérje teljes mennyisége proteaszóma gátlószer hiányában is aggregálódik (21. ábra). A jelenségre magyarázatot adhat a szabad ubikvitin készlet gyors kimerülése és fehérje aggregátumok ubikvitin-proteaszóma rendszerre kifejtett gátló hatása, melyek révén a hőszokk a proteaszómális degradáció funkcionális zavarához vezethet (213, 214). A Hsp90 ezen körülmények között is szinte teljes egészében megőrizte szolubilitását, ami azt sugallja, hogy a hőszokk megbontja a Hsp90-PPAR γ kölcsönhatást, így a PPAR γ destabilizálódik és aggregálódik. Bár a PPAR γ destabilizációját közvetlenül is indukálhatta a hőmérséklet emelkedése, ezt a jelenséget egy másik, ismert Hsp90 kliensen is megfigyeltem. Az Akt fehérje mennyiségének körülbelül a fele ezek között a körülmények között szintén oldhatatlanná vált. A PPAR γ és az Akt eltérő oldékonysága, valamint az ebből következő nagyobb aggregációs hajlandóság összhangban áll a Hsp90 gátlással szemben mutatott érzékenységünkkel, mely arra enged következtetni, hogy a PPAR γ stabilitásához nagyobb mértékben igényli a Hsp90-et, mint az Akt.



21. ábra Az átmeneti hősokk a PPAR γ és az Akt fehérjék aggregációjához vezet.

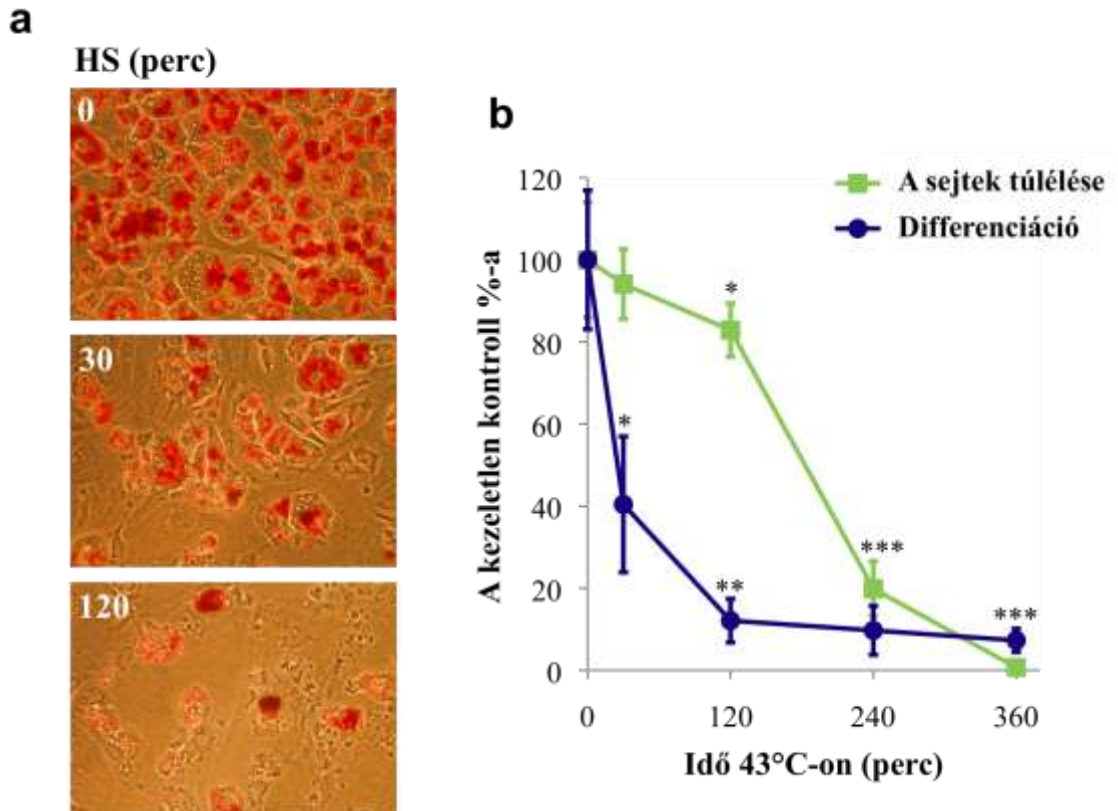
3T3-L1 sejtek 2 órás 43°C-os hőkezelését és/vagy 4 órás 20 μ M MG132 kezelését követően készült detergens-szolubilis, illetve detergens-inszolubilis lizátumok reprezentatív Western blot képe, három független kísérletből.

Vajon az átmeneti hősokk hatására fellépő PPAR γ denaturáció milyen hatással van a PPAR γ funkciójára? Az elvégzett qRT-PCR reakciót kiértékelve azt tapasztaltam, hogy a 3. napon alkalmazott egyetlen hősokk szignifikánsan és tartósan (a 14. napon is) gátolta a PPAR γ -függő transzkripciót, beleértve a PPAR γ 2 mRNS expresszióját is (**22. ábra**). Ezzel összhangban egyetlen, 3. napon alkalmazott hősokk kezelés kvantitatívan leállította a preadipociták differenciációs programját már olyan (30-120 perces) tartományban is, ahol jelentős befolyással nem volt a sejtek túlélésére (**23. ábra**).



22. ábra A hősokk gátolja a PPAR γ -függő célgének expresszióját.

A 3. napon történő két órás 43°C-os hőszokkot (HS) követő PPAR γ 2, adiponektin, GLUT4 és aP2 mRNS expresszió a 4. és a 14. napon. Az ábrázolt értékek két független kísérlet átlaga \pm a szórás. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

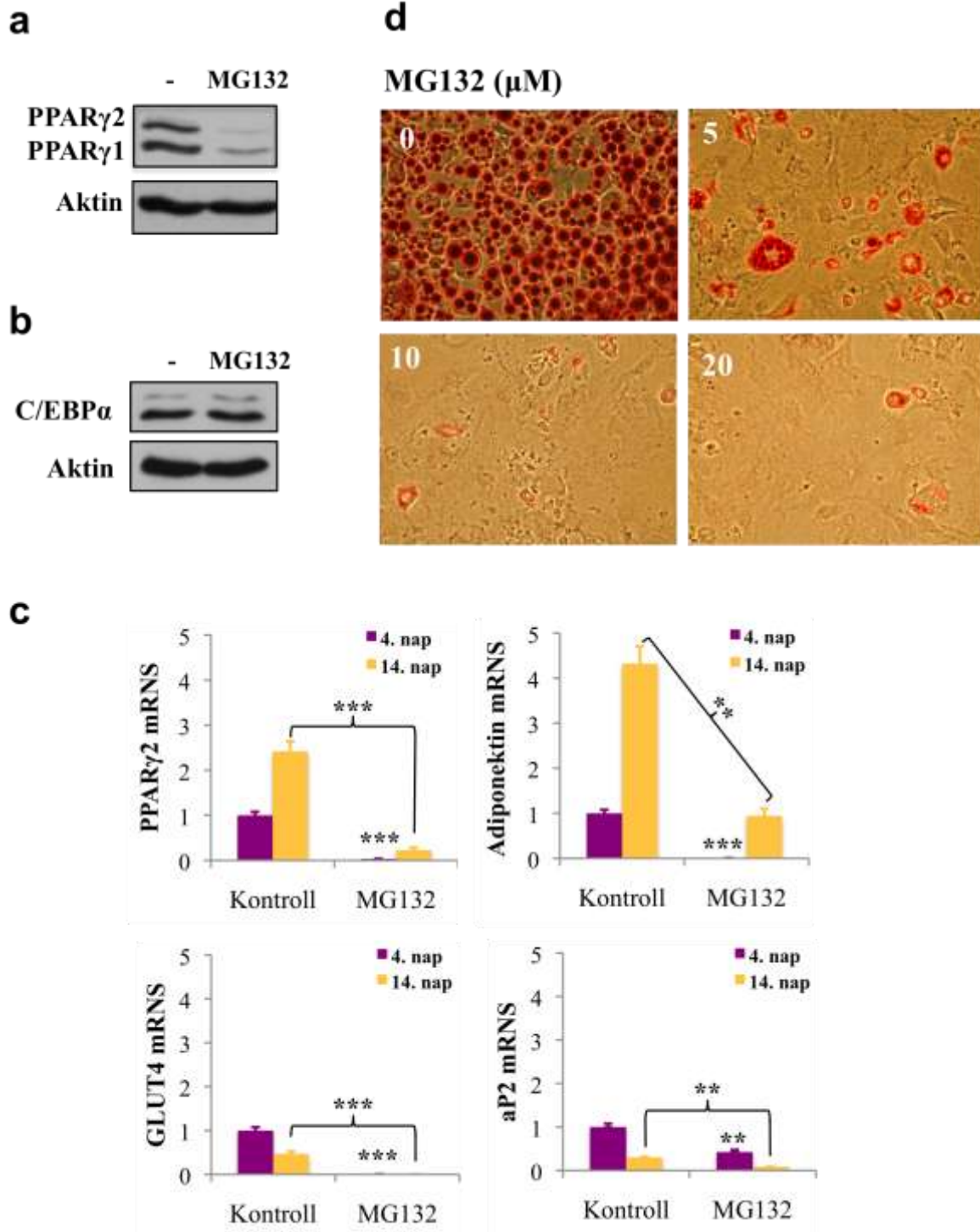


23. ábra A hőszokk gátolja az adipociták differenciációját.

(a) 3T3-L1 sejtek 3. napon történő 43°C-os hőszokk kezelését követően a 14. napon készített reprezentatív mikroszkópos képe, három független kísérletből. (b) A diagrammon párhuzamosan mért Oil Red O abszorpciós, illetve sejttúlélési értékek láthatók. Az ábrázolt értékek három független kísérlet átlaga \pm a szórás. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

Vajon a hőszokk hatására megfigyelt PPAR γ inaktiváció specifikus a hőszokkra, vagy általában jellemző a proteotoxikus stresszekre? Egy független proteotoxikus stressz modellt keresve azt a tényt használtam ki, hogy fiziológiás körülmények között az újonnan szintetizálódott fehérjéknek mintegy 30 %-a a hibás transzláció eredményeképpen rosszul tekeredik fel, így a proteasómába kerülve lebomlik (215). A proteasóma részleges gátlásával megnöveltem a denaturált fehérjék mennyiségét, így a

hősokktól eltérő mechanizmusú proteotoxikus állapotot tudtam előidézni. A 20 órás MG132 kezelés – hasonlóan a hősokk és GA kezelésnél tapasztaltakhoz – szelektíven destabilizálta a Hsp90 kliens PPAR γ -t, meggátolta transzkripció aktivitását és leállította az adipogenezist (24. ábra).

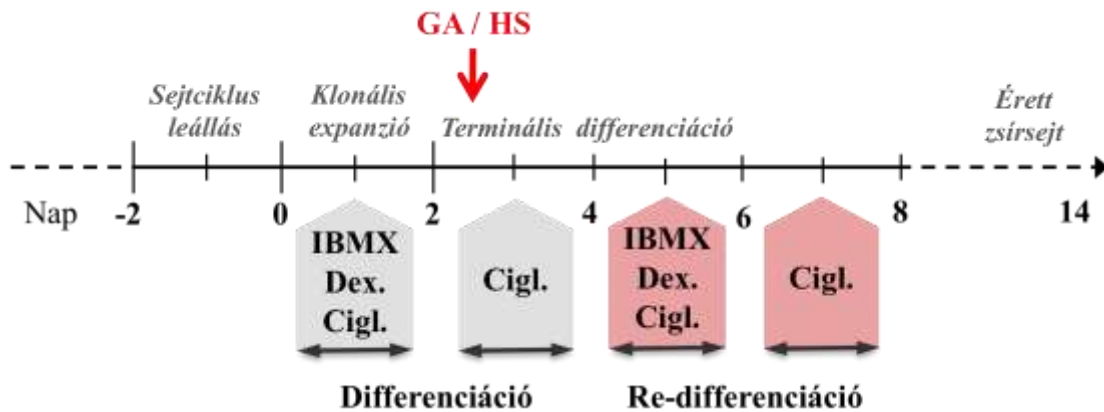


24. ábra A proteaszóma gátlása gátolja a PPAR γ stabilitását, transzkripciós funkcióját és az adipogenezist.

Proteaszóma inhibitor hatása a PPAR γ (a) és a C/EBP α p42 (b) fehérje szintjére. 3T3-L1 sejtek 3. napon történő 20 órás 5 μ M MG132 kezelését követően készült reprezentatív Western blot, három független kísérletből. (c) 10 μ M MG132 hatása a PPAR γ 2, adiponektin, GLUT4 és aP2 mRNS expresszióra a 4. és a 14. napon. Az ábrázolt értékek két független kísérlet átlaga \pm a szórás. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (d) A proteaszóma gátlás akadályozza az adipocita differenciációt. 3T3-L1 sejtek 3. napon történő különböző koncentrációjú MG132 kezelését követően a 14. napon készített reprezentatív mikroszkópos képe, három független kísérletből.

4.7. A stresszből való felépülés helyreállítja a PPAR γ stabilitást és az adipocita differenciációs programot

Az előző megfigyelések azt mutatják, hogy a különböző proteotoxikus stresszek PPAR γ feltekeredésre, funkcióra, valamint az adipogenezisre kifejtett gátló hatása megegyezik a specifikus Hsp90 inhibitorokéval. További kísérleteim során arra voltam kíváncsi, hogy vajon ez a jelenség megfordítható-e a stressz megszűntével. Úgy véltem, hogy ha a PPAR γ fehérje stabilitása helyreáll és a környezeti, hormonális hatások is megfelelőek, akkor folytatódhat az adipocita differenciáció. Hogy ezt a kérdést meg tudjam válaszolni, a következő kísérletet állítottam be: a 3. napon különböző dózisu hősoknak vagy GA kezelésnek vettem alá a sejteket, majd az 5. napon a protokollnak megfelelően újból elindítottam a differenciációs folyamatot (ún. re-differenciáció) (25. ábra).



25. ábra A re-differenciációs kísérlet folyamatábrája

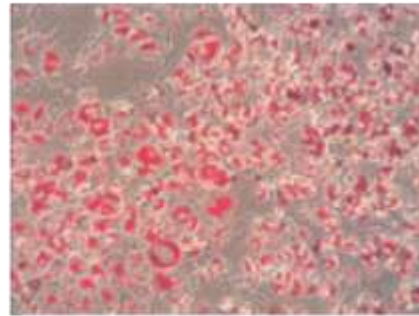
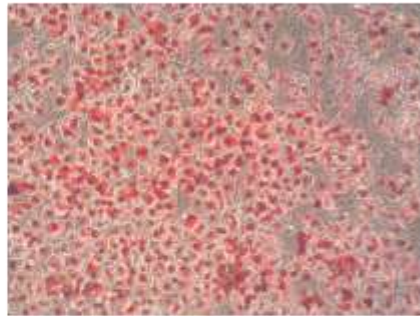
A 26. ábrán látható, hogy minél nagyobb GA koncentrációt, illetve hosszabb hősokkot kaptak a sejtek, annál kevésbé voltak képesek folytatni differenciációs folyamatukat (**26./a, b ábra**). A GA koncentrációkból és a hősokk időtartamokból egy-egy kondíciót (112 nM és 2 óra hősokk) választottam ki azért, hogy a PPAR γ stabilitása és az adipocita differenciáció közti kapcsolatot meg tudjam vizsgálni. Mindkét kondíciót a PPAR γ stabilitás és a differenciáció maximális gátlása mellett az élő sejtek maximális megőrzése jellemzi (**26./c, d ábra**). Minderre azért volt szükség, hogy ki tudjam zárni a reziduális PPAR γ működés, valamint a nagy mértékű sejthalál differenciációra kifejtett pozitív illetve negatív hatását. Érdekes módon az újra differenciáltatott sejtek közül a hősokkoltak jelentős része sikeresen differenciálódott, míg a GA-nel kezelték nem (**26/a. ábra**).

a

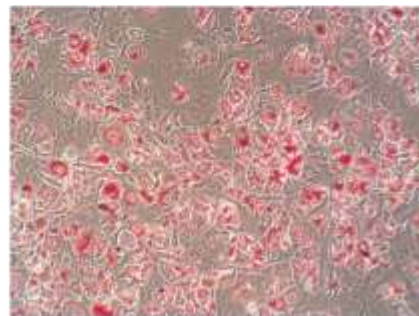
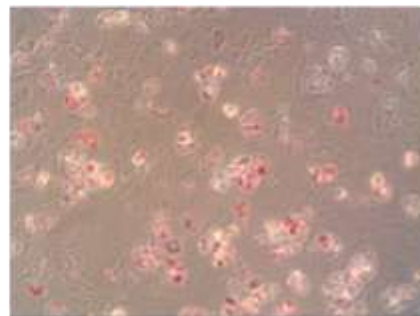
GA (nM)

Re-differenciált

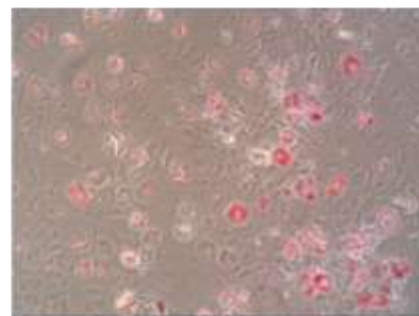
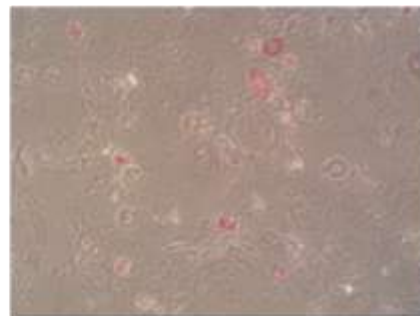
0



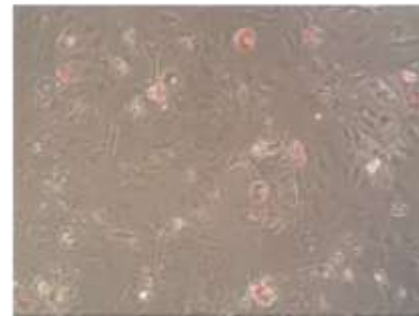
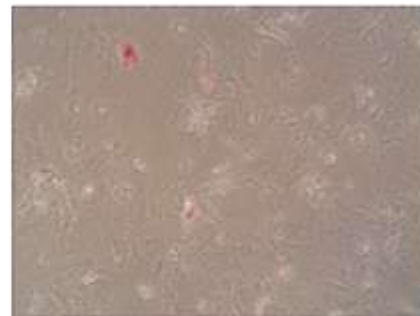
28



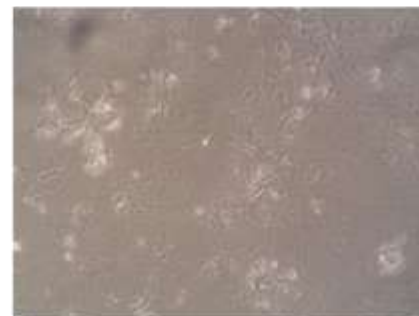
56



112



446

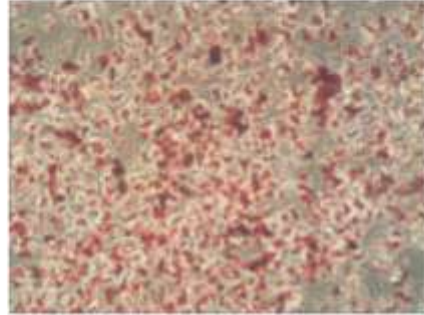
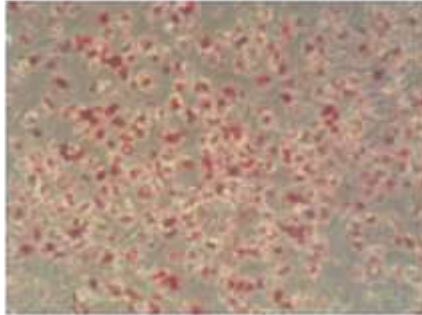


b

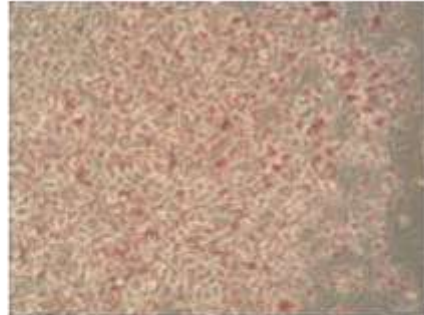
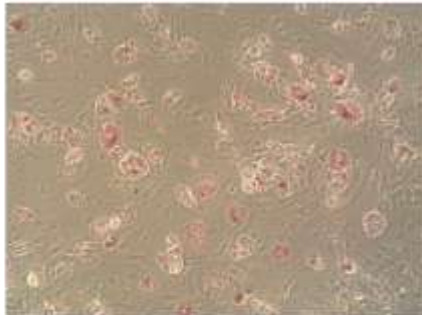
HS (perc)

Re-differenciált

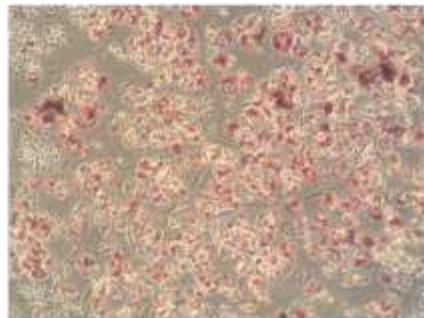
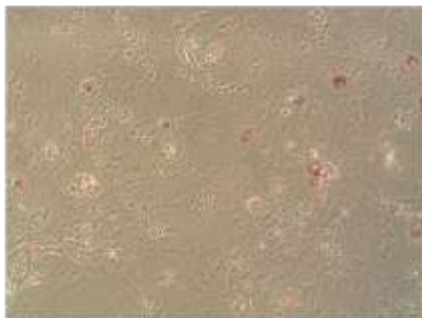
0



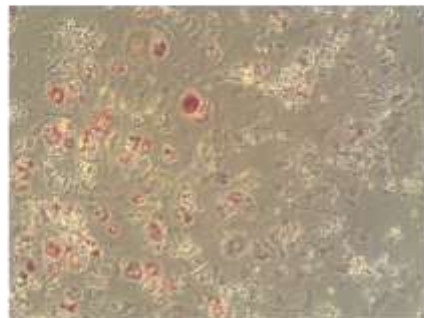
30

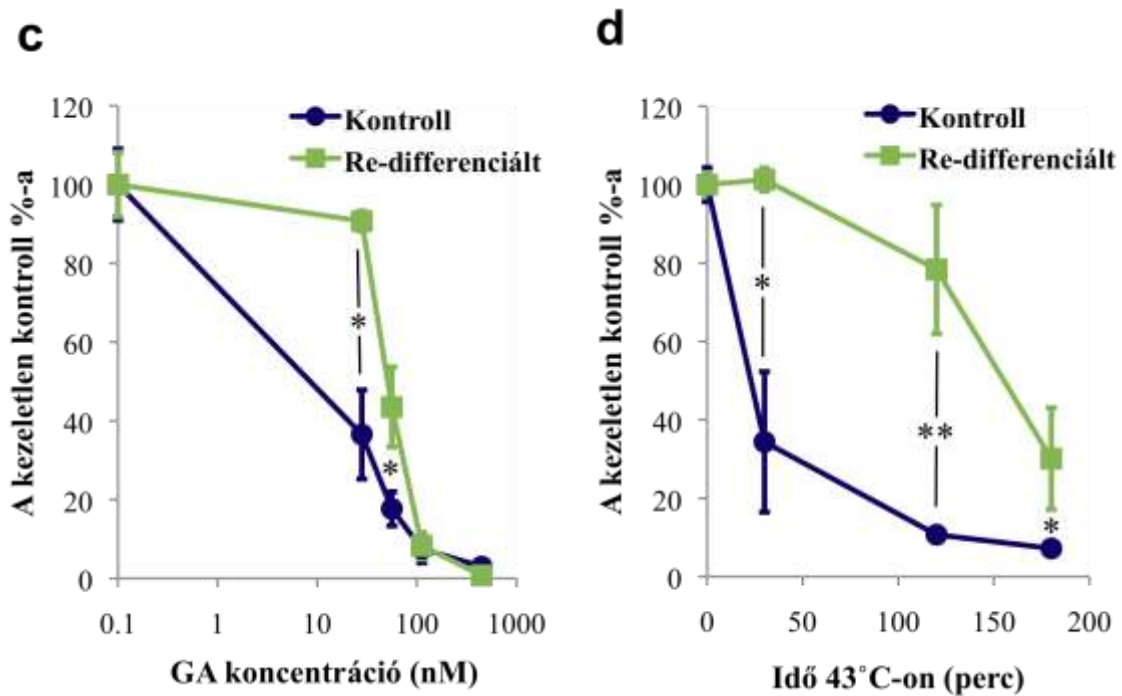


120



180



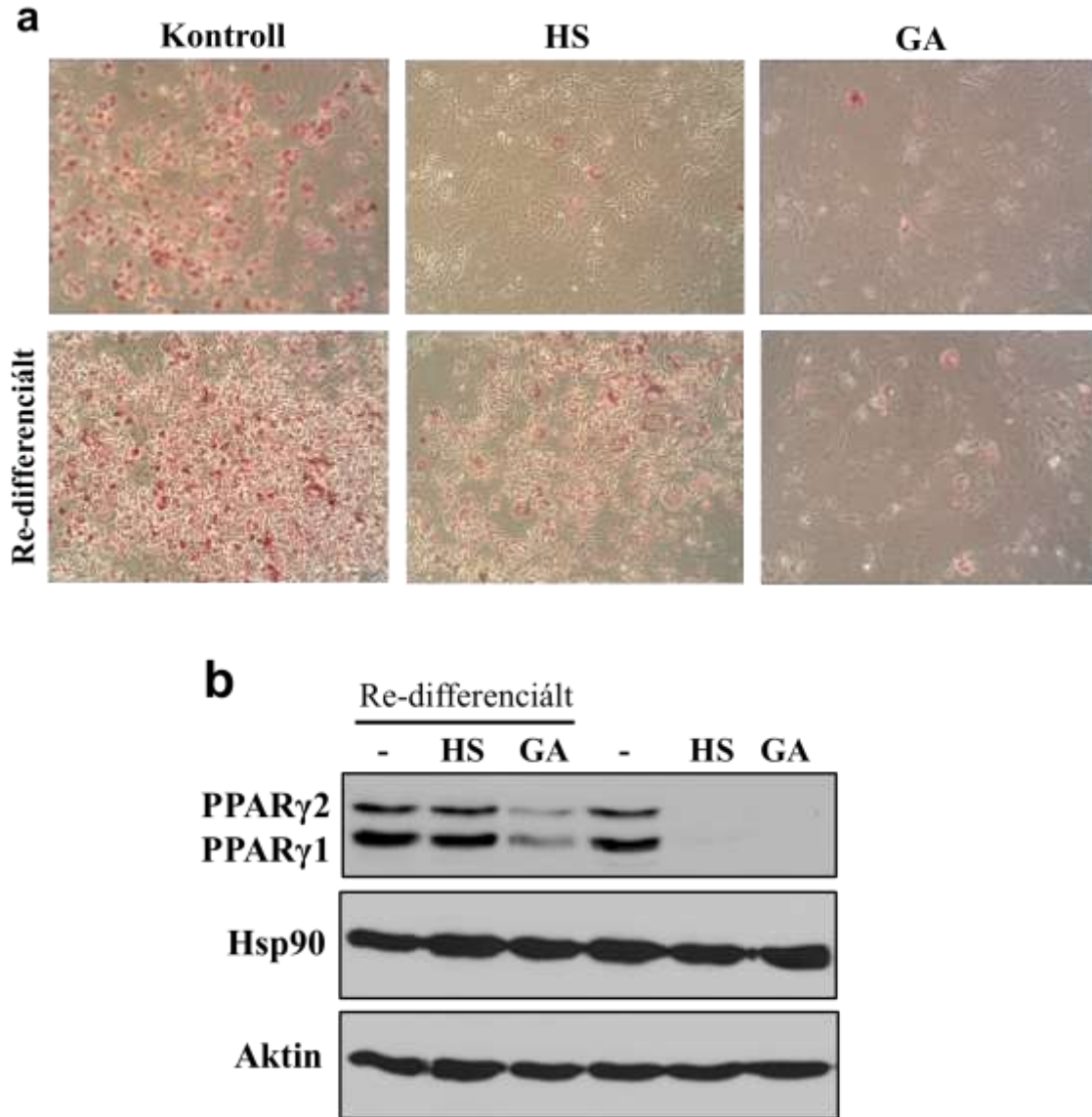


26. ábra A stresszből való felépülés lehetővé teszi az adipocita differenciáció folytatását.

3T3-L1 sejtek 3. napon történő 24 órás GA koncentrációsor (a), vagy különböző időtartamú 43°C-os hősokk (HS) (b) kezelését, majd újra differenciáltatását követően a 14. napon készült reprezentatív mikroszkópos képsor, három független kísérletből. Párhuzamosan végzett kísérletekből származó élő sejtek 14. napon mért Oil Red O abszorpciós értékei (c) GA, (d) hősokk. Az ábrázolt értékek két független kísérlet átlaga \pm a szórás. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A PPAR γ fehérjeszintekkel kapcsolatosan a re-differenciáció kimenetelével egybehangzó megfigyeléseket tettem: míg GA kezelés után a PPAR γ fehérje szintje kis mértékben, hősokkot követően teljes mértékben helyreállt. A GA kezelés, majd újbóli hormonális indukció esetén is csak csekély mértékben megjelenő PPAR γ egybevág a GA magasfokú hidrofobicitásával összefüggő intracelluláris akkumulációjával, mely a Hsp90 elnyújtott gátlását idézi elő (97). Mind a hősokk, mind a GA indukálja a hősokk választ. Eltérő Hsp90 indukció azonban nem áll a jelenség hátterében, hiszen sem a GA, sem pedig a hősokk kezelés nem volt jelentős hatással a teljes Hsp90 szintre (27. ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a stresszből való felépülés a

Hsp90 kapacitásának helyreállítása révén lehetőséget nyújt a PPAR γ stabilizációjára és az adipogenetikus program újraindulására.



27. ábra A stresszből való felépülés lehetővé teszi az adipocita differenciáció folytatását.

(a) 3T3-L1 sejtek 3. napon történő 24 órás 112nM GA, vagy 2 órás 43°C-os hősokk (HS) kezelését, majd újra differenciáltatását követően a 14. napon készült reprezentatív mikroszkópos képe, három független kísérletből. (b) GA és hősokk kezelés hatása a PPAR γ és Hsp90 fehérjeszintre. Párhuzamosan végzett kísérletekből készült reprezentatív Western blot, három független kísérletből. A re-differenciált sejtek lizálása a második differenciációs szakasz végén zajlott.

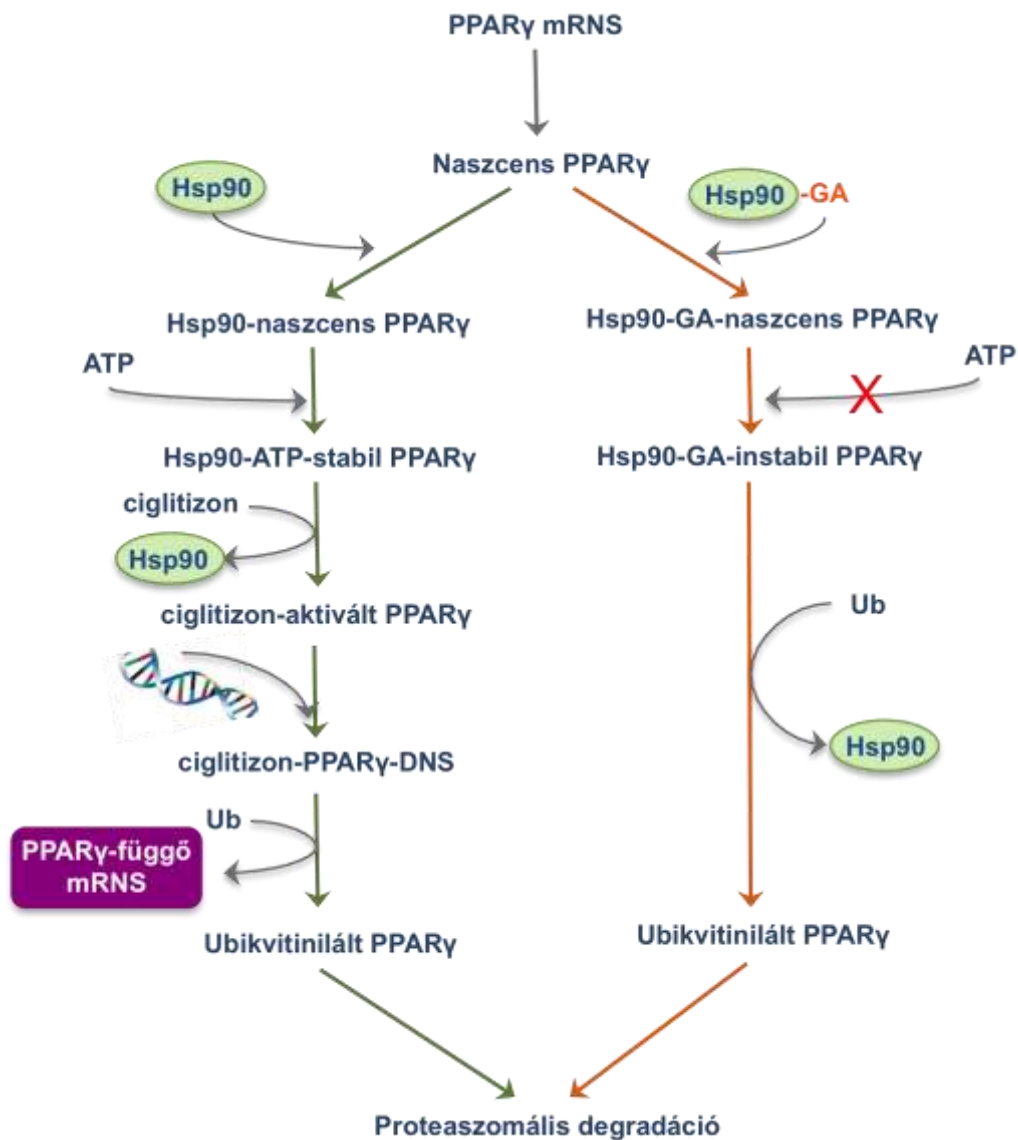
5. MEGBESZÉLÉS

Doktori munkám során feltártam, hogy a Hsp90 egyaránt szükséges az egér 3T3-L1 adipociták differenciációjához és túléléséhez. Ezen jelenség lehetséges molekuláris mechanizmusaként azonosítottam a zsírszövet mester regulátoraként ismert PPAR γ fehérjét, mint Hsp90 klienst. A Hsp90 farmakológias gátlása és a különböző proteotoxikus stresszek egyaránt megbontják a Hsp90-PPAR γ komplexet, destabilizálják a PPAR γ -t és gátolják az adipogenezist. A stresszhatás enyhülése után, a PPAR γ stabilitásának visszanyerése révén a megfelelő stimulusok segítségével folytatódhat a differenciációs program.

5.1. A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatással kapcsolatos szerkezeti megfontolások

A PPAR γ ligand-indukálta transzaktivációt követően gyorsan ubiquitinilálódik és a proteaszómában lebomlik (**16. ábra**) (152). Eredményeim szerint a Hsp90 ATP-függő funkciója szükséges a stabil, ligandkötő, transzaktiváció-kompetens konformációjú PPAR γ kialakításához. Az ATP-ciklus Hsp90-inhibitorral történő gátlása megbontja a Hsp90-PPAR γ komplexet, előidézi a PPAR γ denaturációját és proteaszomális degradációját, valamint felfüggeszti a PPAR γ transzkripció aktivitását (**15., 17., 18. ábrák**). A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatás modelljét a **28. ábrán** mutatom be. A PPAR γ abszolút Hsp90-függősége emlékeztet az NR3 típusú szteroid receptorokra és különböző kinázokra (31) és a PPAR γ -t egyedülállóvá teszi a PPAR izoformák között (77). Eredményeim a Hsp90-kináz interakciók szisztematikus elemzése tükrében (100), azt sugallják, hogy a magas szintű intrinzik konformációs instabilitás teszi a PPAR γ -t erősen a Hsp90-re utalt klienssé. A PPAR izoformák Hsp90-nel kialakított eltérő kölcsönhatása és közel 80%-os szekvencia hasonlósága olyan eszközt adhat a kezünkbe (**5. ábra**), melynek mélyreható vizsgálatával feloldható ez az ellentmondás és lehetőséget ad, hogy megértsük, vajon milyen szerkezeti tulajdonságok határozzák meg a Hsp90 kliens felismerését a magi receptorok családjában.

A Hsp90 az eukarióta fehérje interaktóm legjobban összekapcsolt fehérjéi közé tartozik (88). Ezáltal a Hsp90-kliens kölcsönhatás lehetőséget biztosít nagyszámú különböző Hsp90-asszociált partnerfehérjének az adott kliensfehérje szabályozására. Ennek elegáns bizonyítékát adta Hinds és munkatársai nemrégiben tett felfedezése, miszerint a PPAR γ 112-es szerinjének a TPR-t tartalmazó Hsp90 ko-chaperon fehérje foszfatáz 5 általi defoszforilációja szükséges az adipogenezishez (157).



28. ábra A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatás modellje.

Hsp90 jelenlétében kialakul a PPAR γ ligandkötő konformációja. A ligand (ciglitizon) által aktivált PPAR γ a DNS PPAR γ -függő promotereire kötve, a PPAR γ -dependens mRNS-ek transzkripcióját szabályozva fejti ki élettani hatásait, majd ubiquitiniláció után a proteasómában bomlik le. A Hsp90 (GA-nel történő) gátlása esetén a PPAR γ nem éri el ligandkötésre képes, stabil szerkezetét, így élettani hatás kifejtése nélkül bomlik le. A Hsp90 szerepe a PPAR γ ubiquitinilációjában egyelőre ismeretlen.

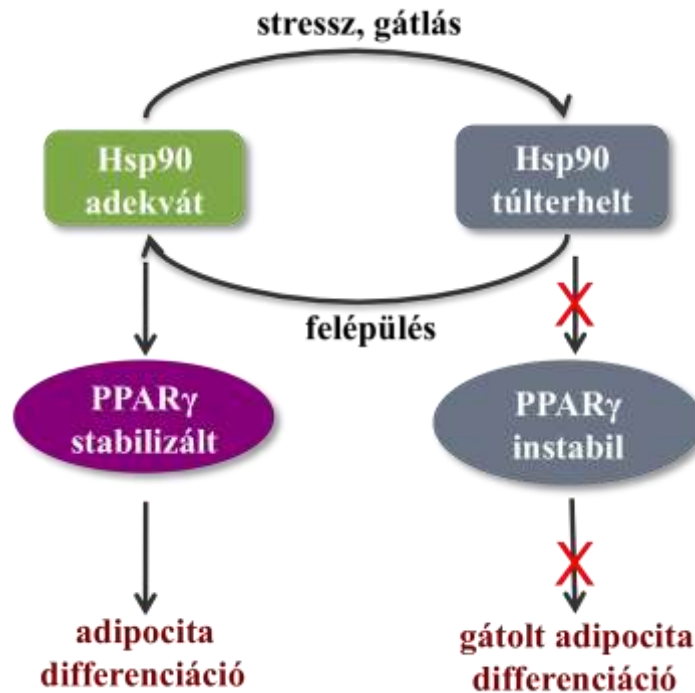
5.2. A Hsp90 szerepe a zsírsejtek élettani folyamataiban

A funkcionális PPAR γ szükséges és elégséges az adipogenezishez (137-139). Kísérleteimben kimutattam, hogy GA kezelés hasonló IC50 értékkel *(i)* destabilizálta a PPAR γ -t, *(ii)* hosszantartó gátlást gyakorolt a PPAR γ célgének transzkripciójára és *(iii)* az adipogenezisre a terminális differenciáció szakaszában (**8., 10., 12., 15., 17. ábrák, 1. táblázat**). Mindez a PPAR γ funkcióvesztés fenokópiáját adja és a PPAR γ -t, mint a Hsp90 gátlás (egyik) kulcsfontosságú közvetítőjét azonosítja az adipogenezisben. A PPAR γ -n kívül más, Hsp90 kliens magába foglaló jelátviteli útvonal (például az inzulin-függő PI3K útvonal, a mineralokortikoid receptor, valamint a Wnt jelátviteli útvonalban résztvevő kalcineurin és β -katenin) is hozzájárulhat a Hsp90 adipocita differenciációra és túlélésre gyakorolt hatásához (173, 206, 216). Fontos példaként említem meg az Akt fehérjeszint csökkenését GA kezelés hatására (**12. ábra**). A zsírszöveti PPAR γ 2 transzgen aktiválja az Akt-t egérben, az inzulin jelpálya pedig hozzájárul a PPAR γ aktivitásához (131, 205). Ily módon a GA gátolhatja az inzulin jelpálya és a PPAR γ közti aktiváló keresztkommunikációt. A számos (potenciális) kliens alapján feltételezem, hogy a Hsp90 működése az individuális kliensek stabilizációján túl plasztikus kapcsolati hálók valamint keresztkommunikációs ívek és hurkok kialakítását teszi lehetővé. Mindez kiesik vagy szétesik a Hsp90 gátlás hatására, ami hálózatos magyarázatot kínál a súlyos fenotipikus változásra. Ennek felderítése további izgalmas kísérleteket igényel.

Mivel a PPAR γ jelenléte szükséges *in vivo* az adipociták túléléséhez (168), a Hsp90 gátlás hatására létrejövő zsírsejt pusztulás egyik lehetséges közvetítője a PPAR γ . Az a tény, hogy magasabb koncentrációjú GA képes gátolni az érett, valamint a differenciáló adipociták túlélését, mint ezen sejtek differenciálódását, összhangban áll azzal, hogy az adipogén funkciókhoz nagyobb PPAR γ kapacitás szükséges, mint az adipociták túléléséhez (168). A Hsp90 ezenkívül befolyásolhatja a PPAR γ működését azáltal, hogy különböző transzkripciós kofaktorokkal és ko-chaperonokkal kialakított kapcsolatait módosítja. Más, a túlélés irányába ható Hsp90 kliensek, melyek GA érzékenysége kisebb (például Akt) tovább árnyalhatják a Hsp90 hatását.

5.3. A Hsp90-PPAR γ komplex stabilitása összekapcsolja a proteosztázist az adipogenezissel

Megfigyeléseim szerint a denaturált fehérjék hősokk-indukált képződése illetve a rosszul tekeredő fehérjék proteaszomális turnoverének csökkentése folytán kialakuló proteotoxikus stressz egyaránt akadályozza a PPAR γ fehérje Hsp90 általi stabilizációját, funkcióját és az adipogenezist (20., 21., 22., 23., 24., 28. ábrák). Két szembeötlő hasonlóságot figyelhetünk meg a proteotoxikus stressz és a farmakológias Hsp90 gátlás között: egyrészt mindkét esetben kizárólag a Hsp90 kliensek csökkenése volt megfigyelhető, a C/EBP α fehérje szintje (mellyel kliens-kapcsolatot nem találtam) nem változott; másrészt a két kliens közül a PPAR γ következetesen nagyobb érzékenységet mutatott GA-re és hősokk kezelésre egyaránt. Mindez megerősíti, hogy a proteotoxikus stresszek kliensekre kifejtett destabilizáló hatását a Hsp90 kapacitásának kimerítése közvetíti. Hipotézisem szerint az Akt és a PPAR γ szerkezeti instabilitásuk/Hsp90-re utaltságuk, valamint a felszaporodó denaturált fehérje mennyiség függvényében szorulnak ki a Hsp90-nel alkotott komplexből, így a proteosztázis a Hsp90-en keresztül modulálja az adipogén funkciókat. További eredményeim azt mutatják, hogy a stressz elmúltával a sejtek képesek helyreállítani a PPAR γ és az adipogenezis Hsp90-függő támogatottságát (26., 27., 29. ábra).



29. ábra A PPAR γ és az adipogenezis stressz-reszponzív szabályozásának modellje.

A denaturált fehérje szubsztrátok felszaporodásával járó Hsp90 túlterhelés, illetve a Hsp90 farmakológias gátlása a PPAR γ (és más Hsp90 kliensek (pl. Akt)) disszociációjához és proteasomális lebontásához, ennek következményeként az adipocita differenciáció gátlásához vezet. A stressz elmúltával, illetve az adaptív mechanizmusok működésének eredményeként helyreálló Hsp90 kapacitás lehetőséget teremt a PPAR γ stabilizálására és az adipocita differenciáció folytatására. Az ábrán egy dinamikus interaktív folyamat két szélsőséges helyzetét tüntettem fel.

Susan Lindquist csoportjának úttörő vizsgálatai más kutatók eredményeivel együtt azt mutatják, hogy azok a stresszek, amelyek a Hsp90 pufferkapacitását túlterhelik, lehetőséget adnak adaptív evolúciós változások kialakulására a következő generációkban (94, 217, 218). Mindemellett, vajon mi lehet a Hsp90-kliens kölcsönhatás haszna ugyanazon generáción belül? Eredményeim szerint a Hsp90 Akt-vel és PPAR γ -val való kölcsönhatása a stressz mértékétől függően képes alakítani a sejt fenotípusát és funkcióját. Tehát a Hsp90 egy olyan steady-state proteosztatisz szenzor és effektor, melyet felhasználva a preadipociták képesek a változó körülményekre

azonnali válaszként finomra hangolni a PPAR γ aktivitását, jelátvitelét és biológiai funkcióit (**29. ábra**).

A Hsp90 K_D -je ATP-re 0,4 mM, ADP-re pedig 10 μ M (12), melynek megfelelően a Hsp90 közvetlenül képes az ATP/ADP arány érzékelésére is. *In vivo* körülmények között megfigyelték, hogy az ATP depléción néhány esetben megbontja a Hsp90 klienssel alkotott komplexét (219, 220). Ezek alapján lehetségesnek tartom, hogy a Hsp90-PPAR γ érzékeli az energia ellátás ingadozásait is. Egy ilyen dinamikus, sejtautonóm szabályozás különösen fontos lehet stressz idején, amikor a zsírraktárak azonnali mobilizációja az élőlény hatékony adaptációját segíti elő. Összegezve, a Hsp90-PPAR γ kapcsolat egy új stressz-reszponzív, az adipocita stresszállapotát közvetlenül az aktiválható (kliens) fehérje konformációval összekapcsoló szabályozási mechanizmus, mely a fittebb, robusztusabb választ adó sejtek funkciójának szelekcióját segíti az organizmus javára.

Ezt erősíti meg, hogy a Hsp90-PPAR γ kapcsolathoz hasonló mechanizmust figyelhetünk meg a hősokk faktor 1 (HSF1) aktiválása esetén, amikor is mind a Hsp90 farmakológiai gátlása, mind proteotoxikus stresszek hatására a HSF1 ledisszociál a Hsp90-ról, mely a PPAR γ -tól eltérően a HSF1 aktivációját eredményezi (36, 221). Két független tanulmányban számolnak be arról, hogy a Hsp90 fehérjeszintjének csökkenése a Cdc2 illetve a Cdc25A destabilizálásához vezet, melyek szép magyarázatot kínálnak a hősokk alatt bekövetkező sejtciklus leállás mechanizmusára (79, 222). Mindezek alapján feltételezem, hogy nagyszámú különféle kliensével kialakított dinamikus interakciói a Hsp90-et komplex biológiai válaszok sokoldalú stressz-reszponzív modulátorává tehetik. Ennek felderítése jövőbeli kutatások izgalmas témája lehet.

5.4. Terápiás vonatkozások

Az egészséges zsírsejtek optimális mennyisége a robusztus PPAR γ funkciókkal karöltve kulcsfontosságú a szervezet egészsége és az élettartam szempontjából (2, 3, 165, 205). Mindezek fényében eredményeimnek széleskörű terápiás vonatkozásai lehetnek. Az utóbbi évekből származó, a humán adipociták intenzív turnoveréről szóló eredmények az adipogenezist mint az elhízás elleni terápia korszerű célpontját helyezik

előtérbe (223, 224). Az a megfigyelésem, hogy a GA sokkal hatékonyabban gátolta a PPAR γ -t a zsírsejtekben, mint hepatoma sejtekben (**14. ábra**), a tumorsejt kliensek fokozott Hsp90 függőségére és terápiás megcélozhatóságára emlékeztet (97). Továbbá, az adipocita differenciáció mintegy 10-szeres GA-érzékenysége a túléléshez képest (**8., 10., 19. ábrák és 1. táblázat**) azt a hipotézist támogatja, miszerint a zsírszöveti Hsp90 gátlása az adipocita sejtmegeújulás és a súlygyarapodás megelőzése révén gátat szabhat az elhízásnak. Figyelembe véve azonban a Hsp90 kulcsszerepét a legkülönbözőbb szövetek alapvető élettani folyamataiban, további *in vivo* vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a Hsp90 akár általános, akár zsírszövet-specifikus gátlása megvalósítható-e terápiás stratégiaként.

A Hsp90-PPAR γ kölcsönhatás sérülékenysége beszűkítheti a PPAR γ funkciót, valamint a tiazolidindionokra adott választ krónikus betegségben, például metabolikus szindróma esetén. Széles körben kimutatott, hogy a chaperon indukció, beleértve az enyhe Hsp90 gátlást, jótékony hatást fejt ki különböző öregedéshez társult betegségek modelljeiben (9, 225). Ennek értelmében eredményeim azt sugallják, hogy a Hsp90 chaperon komplex kapacitásának és/vagy működésének serkentése javíthatja az adipocita proteosztázist, valamint elősegítheti az optimális PPAR γ (és egyéb kliens) és zsírszöveti funkciót. Ezt a lehetőséget azok az eredmények is támogathatják, melyek szerint a szisztémás hipertermia, a geranil-geranilaceton és BGP-15 által kiváltott chaperon indukció súlyvesztést idéz elő és javítja az inzulin rezisztenciát rágcsálóban és emberben egyaránt (194, 196, 198, 226, 227). Azon kérdések megválaszolása, hogy a zsírszöveti Hsp90 és PPAR γ hogyan járul hozzá ezekhez a folyamatokhoz, valamint a zsírszöveti Hsp90/chaperon indukció milyen hatást gyakorol a szervezet egészségére, izgalmas továbblépési lehetőséget biztosítanak.

Humán hepatoma sejteken kapott eredményeim azt mutatják, hogy a PPAR γ szerkezetének és funkciójának Hsp90 általi fenntartása nemcsak a zsírszövetben, hanem más szövetekben is megvalósulhat, például májban, vázizomban, makrofágokban vagy az agyban, ahol lehetőséget ad a metabolizmus, a gyulladás, az atherosclerosis, neurodegeneráció és az öregedés modulálására (131, 165, 228, 229). A TGF β mellett a PPAR γ egy olyan új Hsp90 kliens, amely a terminális differenciációt serkenti, a sejtproliferációt pedig gátolja (98). Tekintettel a PPAR γ tumorokban betöltött kettős, inkább tumor-szuppresszív szerepére (169), a kemoterápia során érdemes lenne

individuálisan összevetni az alkalmazni kívánt Hsp90 inhibitor tumorregresszióra kifejtett hatását a PPAR γ háttérrel, hogy elkerülhető legyen a nemkívánatos tumornövekedés.

Összefoglalva, eredményeim bizonyítékot adnak a PPAR γ Hsp90 általi szabályozására, amely további utakat nyithat a chaperon alapú terápiaik részére különböző öregedéshez társult betegségek kezelésében.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kimutattam, hogy a Hsp90 (ATP-függő funkciója) az adipogenezis kritikus szabályozó tényezője. Ez a Hsp90-et, mint az elhízás és a metabolikus szindróma új farmakológias célpontját jelölheti ki. Ennek felméréséhez további, élő állatmodellen végrehajtott *in vivo* kísérletekre van szükség.
2. Az adipogenezis mester regulátor PPAR γ -t a Hsp90 kliens fehérjéjeként azonosítottam. Ezzel rámutattam a Hsp90 adipogenezist szabályozó működésének (egyik) molekuláris mechanizmusára. További kísérletek szükségesek annak kiderítésére, hogy azok a (pato)fiziológias folyamatok (pl. gyulladás, neurodegeneráció, rák vagy öregedés), ahol jól ismert a PPAR γ központi szerepe, befolyásolhatók-e a Hsp90 modulálásával.
3. Igazoltam, hogy a Hsp90 kapacitását csökkentő proteotoxikus stressz a PPAR γ (és az Akt) destabilizációját és aggregációját, valamint az adipogenezis leállítását okozza.
4. A stressz elmúltával a PPAR γ stabilitása és az adipogenetikus válaszkészség helyreáll. Ezáltal feltártam egy új, közvetlenül a fehérje konformáció szintjén, azonnal és dinamikusan ható szabályozó mechanizmust, mely a Hsp90-PPAR γ kapcsolat révén összekapcsolja sejt stresszállapotát, a hormonális stimulusra adott válaszkészségét és a fenotípust. Ez a szabályozás elősegítheti a fittebb, válaszképesebb sejtek funkcionális szelekcióját az egyed számára. Arra a kérdésre, hogy a fenti szabályozó mechanizmus kiterjeszhető-e más szövetekre és más Hsp90 kliensekre, újabb kísérletek adhatnak választ.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A zsírszövet diszfunkciója számos betegség meghatározó oki tényezője. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) az adipocita differenciáció és funkció mesterregulátora, az inzulin érzékenyítő gyógyszerek célpontja. A Hsp90 hőszokkfehérje instabil, ún. kliensfehérjékhez köt és tartja fenn aktív konformációjukat, ezáltal különböző biológiai folyamatok szabályozásában vesz részt.

Ph.D. tanulmányaim során kimutattam, hogy a Hsp90 szükséges a PPAR γ stabilitásához és az adipocita differenciációhoz. Eredményeim szerint a Hsp90 gátlószerei, a geldanamycin és a novobiocin koncentrációfüggően gátolják a 3T3-L1 preadipociták differenciálódását. A geldanamycin magasabb koncentrációi a fejlődő és az érett zsírsejtek túlélését egyaránt csökkentik. Kimutattam, hogy a Hsp90 és a PPAR γ komplexet képez, melyet a Hsp90 gátlása megbont és a PPAR γ instabillá válását és proteaszomális lebomlását eredményezi. A Hsp90 ugyancsak szükséges a PPAR γ -függő célgének expressziójához. Tehát a Hsp90 kliense, a PPAR γ stabilitásának fenntartásán keresztül szabályozza a zsírsejtek differenciációját. Hőszokk és proteaszóma gátlás által előidézett proteotoxikus stressz hatására szintén megfigyeltem a PPAR γ destabilizációját és az adipogenezis leállítását. A stresszből felépülve azonban a PPAR γ stabilitása és az adipogenezis is helyreáll.

Összefoglalva, doktori munkám során kimutattam, hogy a Hsp90 a zsírszövet képződésének stressz-reaktív regulátora, így új terápiás célpont lehet az elhízás és a metabolikus szindróma kezelésében.

8. SUMMARY

Adipose tissue dysregulation plays a major role in various human diseases. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) is a key regulator of adipocyte differentiation and function, as well as a target of insulin-sensitizing drugs. The Hsp90 chaperone stabilizes a diverse set of signaling ‘client’ proteins, thereby regulates various biological processes.

In my PhD study, I discovered a novel role for Hsp90 in controlling PPAR γ stability and cellular differentiation. Specifically, I showed that the Hsp90 inhibitors geldanamycin and novobiocin efficiently impeded the differentiation of murine 3T3-L1 preadipocytes. Geldanamycin at higher concentrations also inhibited the survival of developing and mature adipocytes. Further, I found that Hsp90 inhibition disrupted an Hsp90-PPAR γ complex, led to the destabilization and proteasomal degradation of PPAR γ , and inhibited the expression of PPAR γ target genes, identifying PPAR γ as an Hsp90 client. A similar destabilization of PPAR γ and a halt of adipogenesis also occurred in response to protein denaturing stresses caused by a single transient heat shock or proteasome inhibition. Recovery from stress restored PPAR γ stability and adipocyte differentiation.

Thus, my findings reveal Hsp90 as a critical stress-responsive regulator of adipocyte biology and offer a potential therapeutic target in obesity and the metabolic syndrome.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444:860-867.
2. Rosen ED, Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444:847-853.
3. Lefterova MI, Lazar MA (2009) New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 20:107-114.
4. Hartl FU, Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16:574-581.
5. Ellis RJ (2007) Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv Exp Med Biol* 594:1-13.
6. Doyle SM, Wickner S (2009) Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci* 34:40-48.
7. McClellan AJ, Tam S, Kaganovich D, Frydman J (2005) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* 7:736-741.
8. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohaszka Z, Nardai G (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 79:129-168.
9. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:515-528.
10. Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86:627-637.
11. Pearl LH, Prodromou C (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75:271-294.
12. Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90:65-75.

13. Prodromou C, Roe SM, Piper PW, Pearl LH (1997) A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nat Struct Biol* 4:477-482.
14. Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89:239-250.
15. Prodromou C, Panaretou B, Chohan S, Siligardi G, O'Brien R, Ladbury JE, Roe SM, Piper PW, Pearl LH (2000) The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *Embo J* 19:4383-4392.
16. Soti C, Racz A, Csermely P (2002) A Nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. N-terminal nucleotide binding unmask a C-terminal binding pocket. *J Biol Chem* 277:7066-7075.
17. Meyer P, Prodromou C, Hu B, Vaughan C, Roe SM, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH (2003) Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell* 11:647-658.
18. Cunningham CN, Krukenberg KA, Agard DA (2008) Intra- and intermonomer interactions are required to synergistically facilitate ATP hydrolysis in Hsp90. *J Biol Chem* 283:21170-21178.
19. Hainzl O, Lapina MC, Buchner J, Richter K (2009) The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *J Biol Chem* 284:22559-22567.
20. Tsutsumi S, Mollapour M, Prodromou C, Lee CT, Panaretou B, Yoshida S, Mayer MP, Neckers LM (2012) Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2937-2942.
21. Tsutsumi S, Mollapour M, Graf C, Lee CT, Scroggins BT, Xu W, Haslerova L, Hessling M, Konstantinova AA, Trepel JB, Panaretou B, Buchner J, Mayer MP, Prodromou C, Neckers L (2009) Hsp90 charged-linker truncation reverses the functional consequences of weakened hydrophobic contacts in the N domain. *Nat Struct Mol Biol* 16:1141-1147.

22. Minami Y, Kimura Y, Kawasaki H, Suzuki K, Yahara I (1994) The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol Cell Biol* 14:1459-1464.
23. Young JC, Obermann WM, Hartl FU (1998) Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem* 273:18007-18010.
24. Yamada S, Ono T, Mizuno A, Nemoto TK (2003) A hydrophobic segment within the C-terminal domain is essential for both client-binding and dimer formation of the HSP90-family molecular chaperone. *Eur J Biochem* 270:146-154.
25. Soti C, Vermes A, Haystead TA, Csermely P (2003) Comparative analysis of the ATP-binding sites of Hsp90 by nucleotide affinity cleavage: a distinct nucleotide specificity of the C-terminal ATP-binding site. *Eur J Biochem* 270:2421-2428.
26. Marcu MG, Chadli A, Bouhouche I, Catelli M, Neckers LM (2000) The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. *J Biol Chem* 275:37181-37186.
27. Marcu MG, Schulte TW, Neckers L (2000) Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *J Natl Cancer Inst* 92:242-248.
28. Rosenhagen MC, Soti C, Schmidt U, Wochnik GM, Hartl FU, Holsboer F, Young JC, Rein T (2003) The heat shock protein 90-targeting drug cisplatin selectively inhibits steroid receptor activation. *Mol Endocrinol* 17:1991-2001.
29. Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S (1989) hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* 9:3919-3930.
30. Akner G, Mossberg K, Sundqvist KG, Gustafsson JA, Wikstrom AC (1992) Evidence for reversible, non-microtubule and non-microfilament-dependent nuclear translocation of hsp90 after heat shock in human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 58:356-364.

31. Pratt WB, Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:111-133.
32. Sreedhar AS, Mihaly K, Pato B, Schnaider T, Stetak A, Kis-Petik K, Fidy J, Simonics T, Maraz A, Csermely P (2003) Hsp90 inhibition accelerates cell lysis. Anti-Hsp90 ribozyme reveals a complex mechanism of Hsp90 inhibitors involving both superoxide- and Hsp90-dependent events. *J Biol Chem* 278:35231-35240.
33. Eustace BK, Sakurai T, Stewart JK, Yimlamai D, Unger C, Zehetmeier C, Lain B, Torella C, Henning SW, Beste G, Scroggins BT, Neckers L, Ilag LL, Jay DG (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat Cell Biol* 6:507-514.
34. Tsutsumi S, Scroggins B, Koga F, Lee MJ, Trepel J, Felts S, Carreras C, Neckers L (2008) A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* 27:2478-2487.
35. Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 562:11-15.
36. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94:471-480.
37. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:545-555.
38. Ammirante M, Rosati A, Gentilella A, Festa M, Petrella A, Marzullo L, Pascale M, Belisario MA, Leone A, Turco MC (2008) The activity of hsp90 alpha promoter is regulated by NF-kappa B transcription factors. *Oncogene* 27:1175-1178.
39. Stephanou A, Conroy S, Isenberg DA, Maione D, Poli V, Ciliberto G, Latchman DS (1998) Elevation of IL-6 in transgenic mice results in increased levels of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) and the production of anti-hsp90 antibodies. *J Autoimmun* 11:249-253.

40. Cheng MB, Zhang Y, Zhong X, Sutter B, Cao CY, Chen XS, Cheng XK, Xiao L, Shen YF (2010) Stat1 mediates an auto-regulation of hsp90beta gene in heat shock response. *Cell Signal* 22:1206-1213.
41. Chen XS, Zhang Y, Wang JS, Li XY, Cheng XK, Wu NH, Shen YF (2007) Diverse effects of Stat1 on the regulation of hsp90alpha gene under heat shock. *J Cell Biochem* 102:1059-1066.
42. Li J, Soroka J, Buchner J (2012) The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim Biophys Acta* 1823:624-635.
43. Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, Jalsovszky G, Holly S, Kahn CR, Gergely P, Jr., Soti C, Mihaly K, Somogyi J (1993) ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J Biol Chem* 268:1901-1907.
44. Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E, Krutzsch H, Ochel HJ, Schulte TW, Sausville E, Neckers LM, Toft DO (1997) The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem* 272:23843-23850.
45. Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, Bartha B, McMahon N, Alnemri ES, Litwack G, Toft D (1997) Nucleotides and two functional states of hsp90. *J Biol Chem* 272:8007-8012.
46. Richter K, Muschler P, Hainzl O, Buchner J (2001) Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. *J Biol Chem* 276:33689-33696.
47. Johnson BD, Chadli A, Felts SJ, Bouhouche I, Catelli MG, Toft DO (2000) Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains. *J Biol Chem* 275:32499-32507.
48. Hessling M, Richter K, Buchner J (2009) Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 16:287-293.
49. McLaughlin SH, Sobott F, Yao ZP, Zhang W, Nielsen PR, Grossmann JG, Laue ED, Robinson CV, Jackson SE (2006) The co-chaperone p23 arrests the Hsp90 ATPase cycle to trap client proteins. *J Mol Biol* 356:746-758.

50. Phillips JJ, Yao ZP, Zhang W, McLaughlin S, Laue ED, Robinson CV, Jackson SE (2007) Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90 in complexes with a co-chaperone and anticancer drugs. *J Mol Biol* 372:1189-1203.
51. Southworth DR, Agard DA (2008) Species-dependent ensembles of conserved conformational states define the Hsp90 chaperone ATPase cycle. *Mol Cell* 32:631-640.
52. Yonehara M, Minami Y, Kawata Y, Nagai J, Yahara I (1996) Heat-induced chaperone activity of HSP90. *J Biol Chem* 271:2641-2645.
53. Soti C, Radics L, Yahara I, Csermely P (1998) Interaction of vanadate oligomers and permolybdate with the 90-kDa heat-shock protein, Hsp90. *Eur J Biochem* 255:611-617.
54. Chadli A, Ladjimi MM, Baulieu EE, Catelli MG (1999) Heat-induced oligomerization of the molecular chaperone Hsp90. Inhibition by ATP and geldanamycin and activation by transition metal oxyanions. *J Biol Chem* 274:4133-4139.
55. Krukenberg KA, Southworth DR, Street TO, Agard DA (2009) pH-dependent conformational changes in bacterial Hsp90 reveal a Grp94-like conformation at pH 6 that is highly active in suppression of citrate synthase aggregation. *J Mol Biol* 390:278-291.
56. Graf C, Stankiewicz M, Kramer G, Mayer MP (2009) Spatially and kinetically resolved changes in the conformational dynamics of the Hsp90 chaperone machine. *Embo J* 28:602-613.
57. Prodromou C (2012) The 'active life' of Hsp90 complexes. *Biochim Biophys Acta* 1823:614-623.
58. Johnson JL, Brown C (2009) Plasticity of the Hsp90 chaperone machine in divergent eukaryotic organisms. *Cell Stress Chaperones* 14:83-94.
59. Cintron NS, Toft D (2006) Defining the requirements for Hsp40 and Hsp70 in the Hsp90 chaperone pathway. *J Biol Chem* 281:26235-26244.
60. Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *Embo J* 18:754-762.

61. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C (2002) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell* 10:1307-1318.
62. Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, Singh S, Woolfson DN, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C (2002) Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J Biol Chem* 277:20151-20159.
63. Mollapour M, Neckers L (2012) Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim Biophys Acta* 1823:648-655.
64. Wandinger SK, Suhre MH, Wegele H, Buchner J (2006) The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *Embo J* 25:367-376.
65. Duval M, Le Boeuf F, Huot J, Gratton JP (2007) Src-mediated phosphorylation of Hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for VEGF receptor-2 signaling to endothelial NO synthase. *Mol Biol Cell* 18:4659-4668.
66. Martinez-Ruiz A, Villanueva L, Gonzalez de Orduna C, Lopez-Ferrer D, Higuera MA, Tarin C, Rodriguez-Crespo I, Vazquez J, Lamas S (2005) S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8525-8530.
67. Retzlaff M, Stahl M, Eberl HC, Lagleder S, Beck J, Kessler H, Buchner J (2009) Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Rep* 10:1147-1153.
68. Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N, Neckers L (2007) An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell* 25:151-159.
69. Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18:601-607.

70. Freeman BC, Morimoto RI (1996) The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hsc70 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J* 15:2969-2979.
71. Brugge JS, Erikson E, Erikson RL (1981) The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins. *Cell* 25:363-372.
72. Lipsich LA, Cutt JR, Brugge JS (1982) Association of the transforming proteins of Rous, Fujinami, and Y73 avian sarcoma viruses with the same two cellular proteins. *Mol Cell Biol* 2:875-880.
73. Joab I, Radanyi C, Renoir M, Buchou T, Catelli MG, Binart N, Mester J, Baulieu EE (1984) Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* 308:850-853.
74. Schuh S, Yonemoto W, Brugge J, Bauer VJ, Riehl RM, Sullivan WP, Toft DO (1985) A 90,000-dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60v-src. *J Biol Chem* 260:14292-14296.
75. Sanchez ER, Toft DO, Schlesinger MJ, Pratt WB (1985) Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J Biol Chem* 260:12398-12401.
76. Dalman FC, Koenig RJ, Perdew GH, Massa E, Pratt WB (1990) In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. *J Biol Chem* 265:3615-3618.
77. Sumanasekera WK, Tien ES, Davis JW, 2nd, Turpey R, Perdew GH, Vanden Heuvel JP (2003) Heat shock protein-90 (Hsp90) acts as a repressor of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARbeta activity. *Biochemistry* 42:10726-10735.
78. Stancato LF, Chow YH, Hutchison KA, Perdew GH, Jove R, Pratt WB (1993) Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p53 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem* 268:21711-21716.

79. Nakai A, Ishikawa T (2001) Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. *EMBO J* 20:2885-2895.
80. Sato S, Fujita N, Tsuruo T (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10832-10837.
81. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE, White MA (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* 13:817-826.
82. Sepehrnia B, Paz IB, Dasgupta G, Momand J (1996) Heat shock protein 84 forms a complex with mutant p53 protein predominantly within a cytoplasmic compartment of the cell. *J Biol Chem* 271:15084-15090.
83. Minet E, Mottet D, Michel G, Roland I, Raes M, Remacle J, Michiels C (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett* 460:251-256.
84. Sato N, Yamamoto T, Sekine Y, Yumioka T, Junicho A, Fuse H, Matsuda T (2003) Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 300:847-852.
85. Chen G, Cao P, Goeddel DV (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9:401-410.
86. Yamano T, Murata S, Shimbara N, Tanaka N, Chiba T, Tanaka K, Yui K, Udono H (2002) Two distinct pathways mediated by PA28 and hsp90 in major histocompatibility complex class I antigen processing. *J Exp Med* 196:185-196.
87. Ishii T, Udono H, Yamano T, Ohta H, Uenaka A, Ono T, Hizuta A, Tanaka N, Srivastava PK, Nakayama E (1999) Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *J Immunol* 162:1303-1309.
88. McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J (2007) Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131:121-135.
89. Lotz GP, Brychzy A, Heinz S, Obermann WM (2008) A novel HSP90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *J Cell Sci* 121:717-723.

90. Johnston M, Geoffroy MC, Sobala A, Hay R, Hutvagner G (2010) HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol Biol Cell* 21:1462-1469.
91. Pare JM, Tahbaz N, Lopez-Orozco J, LaPointe P, Lasko P, Hobman TC (2009) Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol Biol Cell* 20:3273-3284.
92. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39:292-299.
93. Suzuki Y, Minami M, Suzuki M, Abe K, Zenno S, Tsujimoto M, Matsumoto K, Minami Y (2009) The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and eIF4E-transporter into stress granules and association of eIF4E with eIF4G. *J Biol Chem* 284:35597-35604.
94. Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, Palumbo G, Pimpinelli S, Bozzetti MP (2010) Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons. *Nature* 463:662-665.
95. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425:407-410.
96. Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L (2010) Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 10:537-549.
97. Neckers L, Workman P (2012) Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res* 18:64-76.
98. Wrighton KH, Lin X, Feng XH (2008) Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9244-9249.
99. Schneider C, Sepp-Lorenzino L, Nimmesgern E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N, Hartl FU (1996) Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14536-14541.
100. Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, Lindquist S (2012) Quantitative analysis of hsp90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* 150:987-1001.

101. Theodoraki MA, Caplan AJ (2012) Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim Biophys Acta* 1823:683-688.
102. McClellan AJ, Scott MD, Frydman J (2005) Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* 121:739-748.
103. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8324-8328.
104. Schulte TW, Akinaga S, Soga S, Sullivan W, Stensgard B, Toft D, Neckers LM (1998) Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress Chaperones* 3:100-108.
105. Sharma SV, Agatsuma T, Nakano H (1998) Targeting of the protein chaperone, HSP90, by the transformation suppressing agent, radicicol. *Oncogene* 16:2639-2645.
106. Nanchahal K, Morris JN, Sullivan LM, Wilson PW (2005) Coronary heart disease risk in men and the epidemic of overweight and obesity. *Int J Obes (Lond)* 29:317-323.
107. Cinti S (2005) The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:9-15.
108. Lavie CJ, McAuley PA, Church TS, Milani RV, Blair SN (2014) Obesity and Cardiovascular Diseases - Implications Regarding Fitness, Fatness and Severity in the Obesity Paradox. *J Am Coll Cardiol*.
109. Farmer SR (2008) Brown fat and skeletal muscle: unlikely cousins? *Cell* 134:726-727.
110. Huttunen P, Hirvonen J, Kinnula V (1981) The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 46:339-345.
111. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP (1998) Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest* 102:412-420.

112. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285:7153-7164.
113. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S (2000) Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C670-681.
114. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121:96-105.
115. Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E (2006) Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2:367-373.
116. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR (2008) Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7:410-420.
117. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
118. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD (1995) Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9034-9037.
119. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749.
120. Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703.
121. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295.

122. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343.
123. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G (2003) Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52:1779-1785.
124. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y (2001) Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133.
125. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM (2001) Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3815-3819.
126. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6:55-68.
127. Qatanani M, Szwegold NR, Greaves DR, Ahima RS, Lazar MA (2009) Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 119:531-539.
128. Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu Rev Biochem*.
129. Sarjeant K, Stephens JM (2012) Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a008417.
130. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM (2013) PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med* 19:557-566.
131. Tontonoz P, Spiegelman BM (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77:289-312.

132. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ, Jr., Liu XS, Lazar MA (2008) PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 22:2941-2952.
133. Ntambi JM, Young-Cheul K (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S.
134. Puigserver P, Ribot J, Serra F, Gianotti M, Bonet ML, Nadal-Ginard B, Palou A (1998) Involvement of the retinoblastoma protein in brown and white adipocyte cell differentiation: functional and physical association with the adipogenic transcription factor C/EBPalpha. *Eur J Cell Biol* 77:117-123.
135. Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB, Miard S, Auwerx J (2002) The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell* 3:903-910.
136. Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J (2002) E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* 3:39-49.
137. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597-609.
138. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002) C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 16:22-26.
139. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM (1999) PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4:611-617.
140. Zuo Y, Qiang L, Farmer SR (2006) Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. *J Biol Chem* 281:7960-7967.

141. Christodoulides C, Vidal-Puig A (2010) PPARs and adipocyte function. *Mol Cell Endocrinol* 318:61-68.
142. Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GM, Fabbri A, Caprio M (2010) Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem* 110:564-572.
143. Green H, Meuth M (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3:127-133.
144. Green H, Kehinde O (1976) Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-113.
145. Novikoff AB, Novikoff PM, Rosen OM, Rubin CS (1980) Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol* 87:180-196.
146. MacDougald OA, Lane MD (1995) Adipocyte differentiation. When precursors are also regulators. *Curr Biol* 5:618-621.
147. Poulsen L, Siersbaek M, Mandrup S (2012) PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 23:631-639.
148. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789.
149. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8:1224-1234.
150. van Beekum O, Fleskens V, Kalkhoven E (2009) Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* 17:213-219.
151. Kilroy GE, Zhang X, Floyd ZE (2009) PPAR-gamma AF-2 domain functions as a component of a ubiquitin-dependent degradation signal. *Obesity (Silver Spring)* 17:665-673.
152. Floyd ZE, Stephens JM (2002) Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem* 277:4062-4068.

153. Ohshima T, Koga H, Shimotohno K (2004) Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 279:29551-29557.
154. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK (2005) A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437:759-763.
155. Camp HS, Tafuri SR (1997) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272:10811-10816.
156. Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, Kaestner KH, Lazar MA (2003) Genetic modulation of PPARgamma phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev Cell* 5:657-663.
157. Hinds TD, Jr., Stechschulte LA, Cash HA, Whisler D, Banerjee A, Yong W, Khuder SS, Kaw MK, Shou W, Najjar SM, Sanchez ER (2011) Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma). *J Biol Chem* 286:42911-42922.
158. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Bostrom P, Laznik D, Ruas JL, Chalmers MJ, Kamenecka TM, Bluher M, Griffin PR, Spiegelman BM (2010) Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature* 466:451-456.
159. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-595.
160. Duan SZ, Ivashchenko CY, Whitesall SE, D'Alecy LG, Duquaine DC, Brosius FC, 3rd, Gonzalez FJ, Vinson C, Pierre MA, Milstone DS, Mortensen RM (2007) Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPARgamma-deficient mice rescued from embryonic lethality. *J Clin Invest* 117:812-822.

161. Wang F, Mullican SE, DiSpirito JR, Peed LC, Lazar MA (2013) Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:18656-18661.
162. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppanen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A (2007) PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 3:e64.
163. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L, Zalin A, Labib M, Kumar S, Simpson H, Blom D, Marais D, Schwabe J, Barroso I, Trembath R, Wareham N, Nagy L, Gurnell M, O'Rahilly S, Chatterjee K (2006) Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab* 4:303-311.
164. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J (1998) A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284-287.
165. Argmann C, Dobrin R, Heikkinen S, Auburtin A, Pouilly L, Cock TA, Koutnikova H, Zhu J, Schadt EE, Auwerx J (2009) Ppargamma2 is a key driver of longevity in the mouse. *PLoS Genet* 5:e1000752.
166. Heikkinen S, Argmann C, Feige JN, Koutnikova H, Champy MF, Dali-Youcef N, Schadt EE, Laakso M, Auwerx J (2009) The Pro12Ala PPARgamma2 variant determines metabolism at the gene-environment interface. *Cell Metab* 9:88-98.
167. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270:12953-12956.
168. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, Wendling O, Mark M, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Metzger D (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white

- and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4543-4547.
169. Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ (2012) The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 12:181-195.
 170. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT (2004) Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 5:419-429.
 171. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* 4:1053-1057.
 172. Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM (1998) Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med* 4:1058-1061.
 173. Caprio M, Fève B, Claes A, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC (2007) Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 21:2185-2194.
 174. Wiper-Bergeron N, Wu D, Pope L, Schild-Poulter C, Hache RJ (2003) Stimulation of preadipocyte differentiation by steroid through targeting of an HDAC1 complex. *Embo J* 22:2135-2145.
 175. Wiper-Bergeron N, Salem HA, Tomlinson JJ, Wu D, Hache RJ (2007) Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2703-2708.
 176. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL (1995) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9:168-181.
 177. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* 16:7432-7443.
 178. Cao Z, Umek RM, McKnight SL (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552.

179. Ossipow V, Descombes P, Schibler U (1993) CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8219-8223.
180. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ (1995) Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269:1108-1112.
181. Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ (2001) C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12532-12537.
182. Dang DT, Pevsner J, Yang VW (2000) The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 32:1103-1121.
183. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R (2005) Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab* 1:27-39.
184. Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, Nakamura K, Nakamura T, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Matsuki Y, Ogawa W, Hiramatsu R, Kasuga M (2005) Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem* 280:12867-12875.
185. Birsoy K, Chen Z, Friedman J (2008) Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab* 7:339-347.
186. Li D, Yea S, Li S, Chen Z, Narla G, Banck M, Laborda J, Tan S, Friedman JM, Friedman SL, Walsh MJ (2005) Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem* 280:26941-26952.
187. Kaniuk NA, Kiraly M, Bates H, Vranic M, Volchuk A, Brumell JH (2007) Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes* 56:930-939.
188. Kavanagh K, Zhang L, Wagner JD (2009) Tissue-specific regulation and expression of heat shock proteins in type 2 diabetic monkeys. *Cell Stress Chaperones* 14:291-299.

189. Atalay M, Oksala N, Lappalainen J, Laaksonen DE, Sen CK, Roy S (2009) Heat shock proteins in diabetes and wound healing. *Curr Protein Pept Sci* 10:85-95.
190. Hooper PL (2009) Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 14:113-115.
191. Mohan S, Konopinski R, Yan B, Centonze VE, Natarajan M (2009) High glucose-induced IKK-Hsp-90 interaction contributes to endothelial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C182-192.
192. Lei H, Venkatakrisnan A, Yu S, Kazlauskas A (2007) Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 alpha impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes. *J Biol Chem* 282:9364-9371.
193. Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH (2006) Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 55:496-505.
194. Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC (2009) Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 58:567-578.
195. Kurthy M, Mogyorosi T, Nagy K, Kukorelli T, Jednakovits A, Talosi L, Biro K (2002) Effect of BRX-220 against peripheral neuropathy and insulin resistance in diabetic rat models. *Ann N Y Acad Sci* 967:482-489.
196. Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestril R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1739-1744.
197. Henstridge DC, Bruce CR, Drew BG, Tory K, Kolonics A, Estevez E, Chung J, Watson N, Gardner T, Lee-Young RS, Connor T, Watt MJ, Carpenter K, Hargreaves M, McGee SL, Hevener AL, Febbraio MA (2014) Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes*.
198. Literati-Nagy B, Kulcsar E, Literati-Nagy Z, Buday B, Peterfai E, Horvath T, Tory K, Kolonics A, Fleming A, Mandl J, Koranyi L (2009) Improvement of

- insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial. *Horm Metab Res* 41:374-380.
199. Karpe PA, Tikoo K (2014) Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. *Diabetes* 63:1124-1139.
 200. Student AK, Hsu RY, Lane MD (1980) Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 255:4745-4750.
 201. Arslan MA, Chikina M, Csermely P, Soti C (2012) Misfolded proteins inhibit proliferation and promote stress-induced death in SV40-transformed mammalian cells. *FASEB J* 26:766-777.
 202. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
 203. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
 204. Ezure T, Amano S (2009) Heat stimulation reduces early adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Endocrine* 35:402-408.
 205. Sugii S, Olson P, Sears DD, Saberi M, Atkins AR, Barish GD, Hong SH, Castro GL, Yin YQ, Nelson MC, Hsiao G, Greaves DR, Downes M, Yu RT, Olefsky JM, Evans RM (2009) PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22504-22509.
 206. Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, Spiegelman BM, Kasuga M (1998) Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273:28945-28952.
 207. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM (2000) Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* 275:18527-18533.
 208. Sreedhar AS, Csermely P (2004) Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 101:227-257.

209. Rutherford SL, Lindquist S (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396:336-342.
210. Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S (2002) Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417:618-624.
211. Jarosz DF, Lindquist S (2010) Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. *Science* 330:1820-1824.
212. Rohner N, Jarosz DF, Kowalko JE, Yoshizawa M, Jeffery WR, Borowsky RL, Lindquist S, Tabin CJ (2013) Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. *Science* 342:1372-1375.
213. Dantuma NP, Groothuis TA, Salomons FA, Neefjes J (2006) A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J Cell Biol* 173:19-26.
214. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Cell* 107:1552-1555.
215. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774.
216. Kennell JA, MacDougald OA (2005) Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 280:24004-24010.
217. Jarosz DF, Taipale M, Lindquist S (2010) Protein homeostasis and the phenotypic manifestation of genetic diversity: principles and mechanisms. *Annu Rev Genet* 44:189-216.
218. Chen G, Bradford WD, Seidel CW, Li R (2012) Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature* 482:246-250.
219. Peng X, Guo X, Borkan SC, Bharti A, Kuramochi Y, Calderwood S, Sawyer DB (2005) Heat shock protein 90 stabilization of ErbB2 expression is disrupted by ATP depletion in myocytes. *J Biol Chem* 280:13148-13152.
220. Hu LM, Bodwell J, Hu JM, Orti E, Munck A (1994) Glucocorticoid receptors in ATP-depleted cells. Dephosphorylation, loss of hormone binding, HSP90 dissociation, and ATP-dependent cycling. *J Biol Chem* 269:6571-6577.

221. Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK (1997) Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem* 272:9086-9092.
222. Madlener S, Rosner M, Krieger S, Giessrigl B, Gridling M, Vo TP, Leisser C, Lackner A, Raab I, Grusch M, Hengstschlager M, Dolznig H, Krupitza G (2009) Short 42 degrees C heat shock induces phosphorylation and degradation of Cdc25A which depends on p38MAPK, Chk2 and 14.3.3. *Hum Mol Genet* 18:1990-2000.
223. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787.
224. Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK (2004) Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H2O. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E577-588.
225. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. 78:959-991.
226. Kokura S, Adachi S, Manabe E, Mizushima K, Hattori T, Okuda T, Nakabe N, Handa O, Takagi T, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T (2007) Whole body hyperthermia improves obesity-induced insulin resistance in diabetic mice. *Int J Hyperthermia* 23:259-265.
227. Adachi H, Kondo T, Ogawa R, Sasaki K, Morino-Koga S, Sakakida M, Kawashima J, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Miyamura N, Kai H, Araki E (2010) An acyclic polyisoprenoid derivative, geranylgeranylacetone protects against visceral adiposity and insulin resistance in high-fat-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E764-771.
228. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA (2007) PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 1771:999-1013.
229. Nicolakakis N, Hamel E (2010) The nuclear receptor PPARgamma as a therapeutic target for cerebrovascular and brain dysfunction in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2, Article 21.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A doktori disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk:

Nguyen M.T., Csermely P., Sőti C. (2013) Hsp90 chaperones PPAR γ and regulates differentiation and survival of 3T3-L1 adipocytes. *Cell Death Differ.* 20: 1654-1663

IF: 8,371

Idézettség (összes/független): **1/1**

Dancsó B., Spiró Z., Arslan M.A., Nguyen M.T., Papp D., Csermely P., Sőti C. (2010) The heat shock connection of metabolic stress and dietary restriction. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 11, 139-145.

IF: 3,455

Idézettség (összes/független): **8/7**

A doktori disszertáció témájához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

Spiró Z., Arslan M.A., Somogyvári M., Nguyen M.T., Smolders A., Dancsó B., Nemeth N., Elek Zs., Braeckman B.P., Csermely P. and Sőti C. (2012) RNA Interference Links Oxidative Stress to the Inhibition of Heat Stress Adaptation. *Antioxid. Redox. Signal.*, 17(6):890-901

IF: 7,189

Fábián T.K., Sőti Cs., Nguyen, M.T., Csermely P., Fejérdy P.: (2008) Expected functions of salivary HSP70 in the oral cavity. *International Journal of Medical and Biological Frontiers.* 14: 289-308.

Fábián T.K., Fejérdy P., Nguyen M.T., Sőti Cs., Csermely P. Potential immunological functions of salivary Hsp70 in the mucosal and periodontal defence mechanisms. (Review). *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2007; 55: 91-98.

IF.:1,689

Idézettség (összes/független): **20/13**

Fábián G., Müller O., Kovács Sz., Nguyen M.T., Fábián T.K., Csermely P., Fejérdy P.
(2007) Attitude toward death. Does it influence dental fear? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1113:
39-349.

IF.:1,731

Idézettség (összes/független): **11/6**

Szcientometria

Külföldi szakcikkek száma: **6**

Kumulatív IF: **22,435**

Idézettség (összes/független): **42/27**

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Sóti Csabának szakmai útmutatásaiért és támogatásáért. Köszönöm prof. Csermely Péternek a kéziratomhoz nyújtott segítségét és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013 pályázat keretén belül nyújtott anyagi támogatást. Köszönöm prof. Mandl József volt és prof. Bánhegyi Gábor jelenlegi intézetigazgató uraknak, hogy doktori munkámat a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájában az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben végezhettem. Köszönöm a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak, hogy ösztöndíjukkal támogattak.

Köszönöm a Stressz-csoport jelenlegi és volt tagjainak: Mehmet Alper Arslan-nak, Spiró Zoltánnak, Putics Ákosnak, Gyurkó Dávidnak, Somogyvári Milánnak, Dancsó Baláznak, Papp Diánának a közös munkát és az inspiráló együttgondolkodást, külön köszönöm Gilányi Beatrixnak a sejtes munkában és a rendeléseknél nyújtott segítségét. Köszönöm az Intézet dolgozóinak a szakmai háttérrel és a munkámhoz nyújtott segítséget. Köszönöm Dr. Fábíán Tibor Károlynak ösztönzését, amely elindított tudományos pályafutásomon.

Végül köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni szüleimnek, családomnak jelenlétükért és odaadó támogatásukért.