

A Hsp90 és az adipogenezis kapcsolatának vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Nguyen Minh Tu

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sóti 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.

tagjai: Dr. Hably Csilla egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Horváth Ibolya tud. főmunkatárs, Ph.D.

Budapest

2014

1. BEVEZETÉS

Napjainkra az elhízás komoly egészségügyi problémává vált az egész világon. Az elhízás és a zsírszövet diszfunkciója számos betegség kóroki tényezője. Ilyen betegségek például az inzulin rezisztencia, a 2-es típusú cukorbetegség, a magas vérnyomás, különböző szív- és érrendszeri betegségek, valamint a rák. 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 nevezzük. A Hsp90-nek több száz kliense van, amelyek a jelátviteli hálózat csomópontjaiban, leginkább a daganatos transzformációban szerepet játszó növekedési és túlélési jelpályák kulcspontjaiban 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.

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?

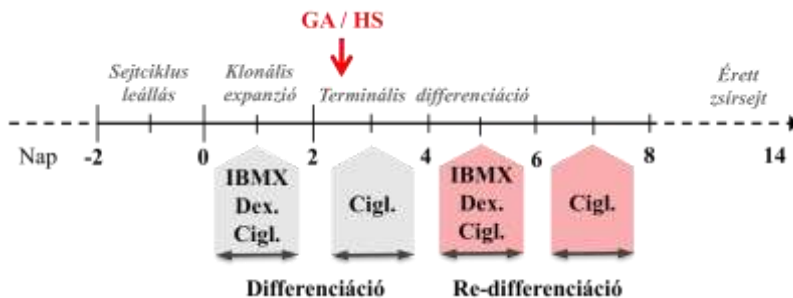
3. MÓDSZEREK

3.1. *Sejtkultúra (3T3-L1, HepG2)*

Az adipocita differenciáció vizsgálatára a 3T3-L1 sejtvonalat használtam. A sejteket izobárikus oxigénszint és 5% CO₂ jelenlétében, 37°C-on Dulbecco féle módosított Eagle médiumban tenyésztettem. A médiumot a következő anyagokkal dúsítottam: 4,5 mg/ml glükóz, 2 mM L-glutamin, 1,5 g/l nátrium bikarbonát, 100 µg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin. 3T3-L1 sejtek esetén 10% marha szérumot, HepG2 sejtek esetén 10% magzati marha szérumot adtam a médiumhoz.

3.2. *Adipocita differenciáció és kezelések*

A 3T3-L1 preadipocitákat konfluenciáig tenyésztettem, majd 2 nappal a konfluencia elérése után (0. nap) differenciációs médiummal (DMEM, 10% magzati marha szérum, 1 µM dexametazon, 0,5 mM 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX) és 1 µM ciglitizon) indítottam el az adipocita differenciációt. 48 órával később a sejteken levő médiumot 10% magzati marha szérumot és 1 µM ciglitizon tartalmú DMEM médiumra cseréltem. 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. A kezeléseket a differenciáció 3. napján, érett zsírsjtek esetén a 12. napon végeztem el (**1. ábra**).



1. ábra Az adipocita differenciáció és a re-differenciációs kísérlet menete.

3.3. Oil red O festés, fénymikroszkópia és abszorpció mérés

A sejteket fedőlemezen vagy 6 lyukú lemezen tenyésztettem, majd a 3. napi kezelések után a 14. napon mosás és fixálás után 60%-os izopropanolban inkubáltam, ezután frissen készített Oil Red O oldatban festettem meg. A mintákat Nikon Eclipse E400 mikroszkóp, vagy Alpha XD2-2T inverz mikroszkóp segítségével vizsgáltam és fényképeztem. A lipidakkumulációt kvantitatíve fotometriával határoztam meg. A minták optikai denzitását 500 nm-en mértem Thermo Varioskan Flash fotométer segítségével.

3.4. Sejtek lízise

Különböző kezelések után a sejteket WB lízis pufferrel (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 20% glicerin,

1% NP40, 0,5 mM DTT, 2x Complete, pH 7,6) lizáltam. 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. A szolubilis és inszolubilis frakciókból azonos térfogatokat vittem SDS-poliakrilamid géltre.

3.5. Fehérje koncentráció meghatározás

A fehérje koncentrációt Bradford módszere szerint, Bio-Rad reagenssel, vagy BCA protein assay kittel, marha szérumalbumin standarddal határoztam meg.

3.6. 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 a 3. napon. A sejtek lizálásához 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. Az immunprecipitációhoz mindegyik mintából 1500 μg fehérjét, valamint monoklonális anti-PPAR γ antitestet használtam.

3.7. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) és Western blot

A fehérjéket denaturáló diszkontinuus 7,5-12%-os SDS-PAGE segítségével választottam el. A géltre mindegyik mintából azonos mennyiséget vittem föl. A géleket mérettől függően 160-200 mV konstans feszültséggel, szobahőn futtattam. Az elektroforézis befejeztével a fehérjéket félszáraz blotkészülékkel transzferáltam nitrocellulóz vagy PVDF membránra 1,25 mA/cm² áramerősséggel 70 percig 4°C-on. Az aspecifikus kötőhelyeket 5% sovány tejpórt tartalmazó TBS-T-vel blokkoltam. Az elsődleges antitesteket 1:1000-1:5000, a peroxidáz-konjugált másodlagos antitesteket 1:1000-1:5000 hígításban használtam, majd a reaktív fehérjéket kemilumineszcens kittel detektáltam. A fehérje szintek meghatározását denzitometriával végeztem, melyhez Image J programot használtam. A kapott denzitometriás értékeket a kontrollként használt megfelelő β -aktin értékekre normáltam.

3.8. Sejtek viabilitásának vizsgálata

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

3.9. Az mRNS expresszió vizsgálata qRT-PCR módszerrel

Az mRNS-t GeneJET RNA Purification Kit segítségével izoláltam. cDNS-t a RevertAidTM cDNA Synthesis Kit használatával a gyártó utasításai alapján szintetizáltam. A kvantitatív PCR reakció során használt primer párokat (egér PPAR γ 2, adiponektin, lipoproteinlipáz (LPL), GLUT4, aP2 és 28S rRNS) Ezure és Amano közleménye alapján szintetizáltattam. A PCR-t az ABI 7300 System PCR készülékében Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-szel hajtottam végre. Az mRNS-ek relatív mennyiségét komparatív CT módszerrel határoztam meg, és a 28S rRNS mRNS szintjére normáltam.

3.10. 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 preadipociták differenciációját és túlélését

A Hsp90 adipogenezisben betöltött szerepét 3T3-L1 preadipocitákon vizsgáltam. Hogy kizárjam a Hsp90 sejtek proliferációjára gyakorolt hatását, a specifikus Hsp90-gátlószerekkel történő kezeléseket a terminális differenciáció időszakában, a 3. napon végeztem. Az adipogenezis mértékét az érett zsírs sejtekben felhalmozódó trigliceridek 14. napon történő Oil Red O festésével követtem. A Hsp90 ATP kötését gátló, eltérő szerkezetű inhibitorok, az N-terminális doménhez kötő geldanamycin (GA), és a C-terminális doménhez kötő novobiocin egyaránt koncentrációfüggően és teljesen gátolta az adipocita differenciációt ($p < 0,001$).

A differenciáció gátlás egyik lehetséges oka a sejtek pusztulása. Ennek vizsgálatára a 14. napon szimultán meghatároztam a GA-kezelt sejtek viabilitását. Alacsony koncentrációkban a GA szelektíven gátolta az adipogenezist (56 nM: 80%-os differenciáció gátlás, $p < 0,001$; szignifikáns sejthalál nélkül). Magasabb GA koncentrációk és hosszabb kezelések egyre növekvő sejthalált okoztak, és mind a preadipociták, mind az érett zsírs sejtek túlélését gátolták. Mindez összhangban áll a Hsp90 sejt túlélésben általánosan betöltött esszenciális szerepével. Az 50%-os gátlás mintegy tízszeres különbsége ($IC_{50\text{diff}}=16,38$ nM vs. $IC_{50\text{viab}}=163,6$ nM, $p < 0,001$) arra utal, hogy a Hsp90 adipogenezist elősegítő hatása nem elsősorban a túlélést támogató működésén alapul.

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

A következőkben a GA által okozott adipogenezis gátlás hátterében levő molekuláris mechanizmusokat vizsgáltam. Potenciális Hsp90-kliens kapcsolatát keresve az adipogenezis terminális differenciációs szakaszában részt vevő fontosabb szabályozó fehérjék szintjét a 3T3-L1 preadipociták 3. napon történő 20 órás GA kezelése után Western blottal határoztam meg. GA hatására a Hsp90-kliensként már ismert Akt kináz mennyisége részlegesen csökkent ($p < 0,01$), míg a C/EBP α p42 izoforma szintje nem változott. Az adipogenezis mester regulátoraként ismert PPAR γ mindkét izoformájának szintje GA és novobiocin hatására egyaránt koncentrációfüggő és teljes csökkenést mutatott (IC50 értékek PPAR γ 1 és PPAR γ 2 esetén: 51,0 illetve 40,8 nM, $p < 0,001$). Az eredmények alapján a Hsp90 adipogenezist elősegítő hatását a PPAR γ (és az Akt) közvetítheti. HepG2 humán hepatóma sejtek GA kezelése szintén csökkentette a PPAR γ fehérje szintjét, ami azt sugallja, hogy a Hsp90 szükséges a különböző emlős szövetek PPAR γ fehérje szintjének fenntartásához.

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

A Hsp90 a kliensfehérjéket megköti és ATP-függően stabilizálja. Ennek vizsgálatára az endogén PPAR γ -t kontroll és GA-kezelt 3T3-L1 sejtekből immunprecipitáltam. A precipitátumban Hsp90-et detektáltam, mely GA kezelés hatására eltűnt. Mindez egy ATP-függő kölcsönhatást sugallt.

A Hsp90 kliensfehérjék a Hsp90 gátlás hatására destabilizálódnak és proteaszomálisan lebomlanak. Ennek vizsgálatára a 3T3-L1 sejteket GA-nel és/vagy proteaszóma gátlószerrel (MG132) kezeltem, majd a lizátumból detergens szolubilis (stabil) és inszolubilis (aggregátum) fehérje frakciókat izoláltam. A GA kezelés a PPAR γ és az Akt teljes eltűnését eredményezte a detergens szolubilis frakcióból. GA és proteaszóma gátlószer együttes hatására a PPAR γ valamint az Akt egyaránt a detergens inszolubilis pelletben tűnt fel. Tehát a Hsp90 ATP-függő funkciójának gátlása a PPAR γ destabilizációjához és proteaszomális lebomlásához vezet.

4.4. A Hsp90 működése szükséges a PPAR γ transzkripciós funkciójához

A PPAR γ transzkripciós aktivitásának vizsgálatára a PPAR γ -függő célgének expresszióját mértem kontroll és a GA-kezelt preadipocitákon reverz transzkripciót követő kvantitatív PCR-rel, közvetlenül a kezelést követően a 4., és a differenciációs folyamat végén a 14. napon. A vizsgált mRNS-ek közül a PPAR γ 2-n túl a GLUT4 és aP2 az érett zsírsejt fenotípusának és funkciójának létrehozásához, az adiponektin pedig a szisztémás (inzulinérzékenyítő, gyulladásgátló) hatások kialakításához szükséges. A GA kezelés az általam vizsgált összes PPAR γ -függő mRNS transzkripciójának koncentrációfüggő és teljes gátlásához vezetett ($p < 0,001$). A PPAR γ 2 mRNS expressziójának gátlása az adipogenezis fontos pozitív visszacsatolási szabályozóköreinek működését függesztette fel. A különböző PPAR γ -függő célgének közel azonos GA koncentráció függéssel és IC50 értékkel rendelkeztek, és ezek igen hasonlóak voltak a PPAR γ fehérje depléciójának

IC50 értékéhez (IC50 értékek: *PPAR* γ 2 39 nM; *GLUT4* 41,9 nM; *aP2* 85,5 nM; *adiponektin* 43,8 nM). Az adiponektin expresszió csökkenését érett zsírsejtekben fehérje szinten is megerősítettem. A Hsp90 tehát szükséges a *PPAR* γ fehérje stabilitásához és transzkripciós aktivitásához, mely kialakítja és fenntartja az érett zsírsejtek fenotípusát. A *PPAR* γ tehát a Hsp90 új kliense.

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

A Hsp90 instabil fehérjékhez kötődik, legyenek ezek denaturáló behatásokra létrejövő vagy “intrinzik” termodinamikai instabilitású (kliens) fehérjék. Ezért arra voltam kíváncsi, hogy vajon a fehérjéket denaturáló (proteotoxikus) stresszek hogyan befolyásolják a *PPAR* γ stabilitását és az adipogenezist. A 3T3-L1 sejtek differenciációjának 3. napján alkalmazott 43°C-os mérsékelt hősokek, mely nem okozott számottevő sejthalált, már 30 perc alatt előidézte a *PPAR* γ fehérje szinte teljes eltűnését, azonban nem hatott a C/EBP α p42 fehérje szintjére. A hősokkolt sejtekből izoláltam a detergens szolubilis és inszolubilis fehérje frakciót és azt figyeltem meg, hogy hősokek hatására a *PPAR* γ (és az Akt) fehérje teljes mennyisége az inszolubilis (aggregátum) frakcióba került a proteaszóma farmakológias gátlása hiányában is. A Hsp90 ezen körülmények között is szinte teljes egészében megőrizte szolubilitását, ami azt sugallja, hogy a hősokek megbontja a Hsp90-*PPAR* γ kölcsönhatást, így a *PPAR* γ destabilizálódik és aggregálódik. A hősokek kezelés gátolta a *PPAR* γ -függő transzkripciót, valamint kvantitatívan

leállította a preadipociták differenciációs programját már olyan (30-120 perces) tartományban is, ahol jelentős befolyással nem volt a sejtek túlélésére.

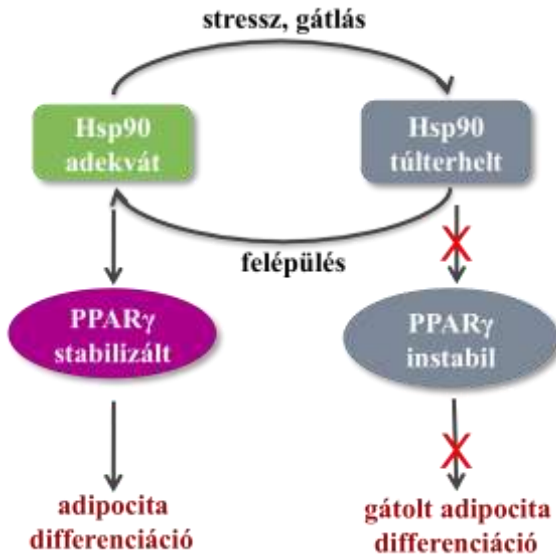
Egy független proteotoxikus stressz modellt keresve azt a tényt használtam ki, hogy fiziológias körülmények alatt az újonnan szintetizálódott fehérjéknek mintegy 30 %-a a hibás transláció eredményeképpen rosszul tekeredik fel, így a proteaszóma részleges gátlása a Hsp90 gátláshoz és a hőshockhoz hasonlóan szintén szelektíven destabilizálta a PPAR γ -t, megátolta transzkripció aktivitását és leállította az adipogenezist. Tehát a proteotoxikus stresszek a Hsp90 specifikus gátlásához hasonló molekuláris és fenotipikus választ hoznak létre.

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

Úgy véltem, hogy ha a PPAR γ fehérje stabilitása a stressz megszűntével helyreáll, folytatódhat az adipocita differenciáció. Ennek megválaszolására következő kísérletet állítottam be: a 3. napon különböző dózisú hőshocknak vagy GA kezelésnek vettem alá a sejteket, majd az 5. napon a protokollnak megfelelően újból elindítottam a differenciációs folyamatot (ún. re-differenciáció, **1. ábra**). Azt tapasztaltam, hogy a sejtek a hőshock és GA-kezelés dózisának növekedésével egyre kevésbé voltak képesek folytatni differenciációt.

A PPAR γ stabilitása és az adipocita differenciáció közti kapcsolatot vizsgálatára egy-egy körülményt választottam (112 nM GA és 2 óra hőshock),

melyeket a PPAR γ stabilitás és a differenciáció teljes gátlása mellett minimális sejtpusztulás jellemez. Minderre azért volt szükség, hogy ki tudjam zárni a reziduális PPAR γ működés, valamint a nagy mértékű sejthalál differenciációra kifejtett pozitív illetve negatív hatását. A differenciáció teljes gátlását előidéző kezelések után a hősokkolt sejtek jelentős része, míg a GA-kezelt sejtek elenyésző része differenciálódott. A PPAR γ fehérjeszintekkel kapcsolatosan a re-differenciáció kimenetelével egybehangzó megfigyeléseket tettem: míg hősokk után a PPAR γ fehérje szintje teljes mértékben, GA-kezelést követően részlegesen állt helyre. Mindez összhangban van a GA intracelluláris akkumulációja folytán fellépő elnyújtott Hsp90 gátlással. Sem a GA, sem pedig a hősokk kezelés nem volt jelentős hatással a teljes Hsp90 szintre. 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 (**2. ábra**).



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

5. 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 farmakológiás 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)fiziológiás 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.

6. 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: 8,385

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., Sőtí 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., Sőtí 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**

7. 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 ösztöndíjkkal támogattak.

Köszönöm a Stressz-csoport jelenlegi és volt tagjainak: Mehmet Alper Arslan-nak, Spiró Zoltánnak, Putics Ákosnak, Gyurkó Dávidnak, Somogyvári Milánnak, Dancsó Balázsnak, 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.