

A micro RNS szabályozás szerepe vese ischemia-reperfúziós károsodásában: RNS interferencia terápia alkalmazása

Doktori tézisek

Dr. Kaucsár Tamás

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hamar Péter, Ph.D, D.Sc, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Giricz Zoltán, Ph.D, tudományos főmunkatárs
Dr. Csont Tamás, Ph.D, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, Ph.D, D.Sc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Fekete Andrea, Ph.D, tanársegéd
Dr. Rácz Anita, Ph.D

Budapest
2014

Bevezetés

A genomban található gének 1%-át micro RNS-ek (miRNS) alkotják. Az először 1993-ban azonosított miRNS-ek rövidek: 18-25 nukleotid hosszúak és az RNS interferencia indukálásával fontos szerepet játszanak a poszt-transzkripcionális génexpresszió szabályozásban. A nem kódoló, de funkcionálisan aktív RNS-ek nagy száma támogatja azt a hipotézist, miszerint a miRNS-szabályozás hálózat formájában valósul meg. A miRNS-ek poszt-transzkripcionális szintű, génexpresszió szabályozó szerepének megismerése jelentősen megváltoztatta a gének szabályozásáról alkotott nézeteinket.

Egyetlen miRNS hatással lehet számos gén expressziójára, ezáltal betegség-specifikus útvonalak és jelátviteli kaszkádok szabályozásával egy teljes patológiai folyamatot befolyásolhat. Ez az egyedi működés teszi ezeket a kis molekulákat rendkívüli fontossá. Számos miRNS funkcionális vizsgálata már folyamatban van és tanulmányozzák a miRNS-ek expressziójának befolyásolását is különféle kóros állapotokban. A miRNS gépezetébe való beavatkozás jelenlegi kísérleti stratégiái rövid, előre meghatározott nukleinsav szekvenciával rendelkező oligonukleotidok célsejtekbe történő transzfektálásán alapulnak. A leghatékonyabb miRNS gátlók, mint például az antiszensz oligonukleotidok (ASO) az érett miRNS-re hatnak. A kémiai módosítások (pld. zárt nukleinsavak, LNA) révén javítható az ASO-k stabilitása a nukleázok degradációjával szemben, a cél miRNS iránti affinitása és a szöveti felvétele *in vivo* alkalmazásuk során.

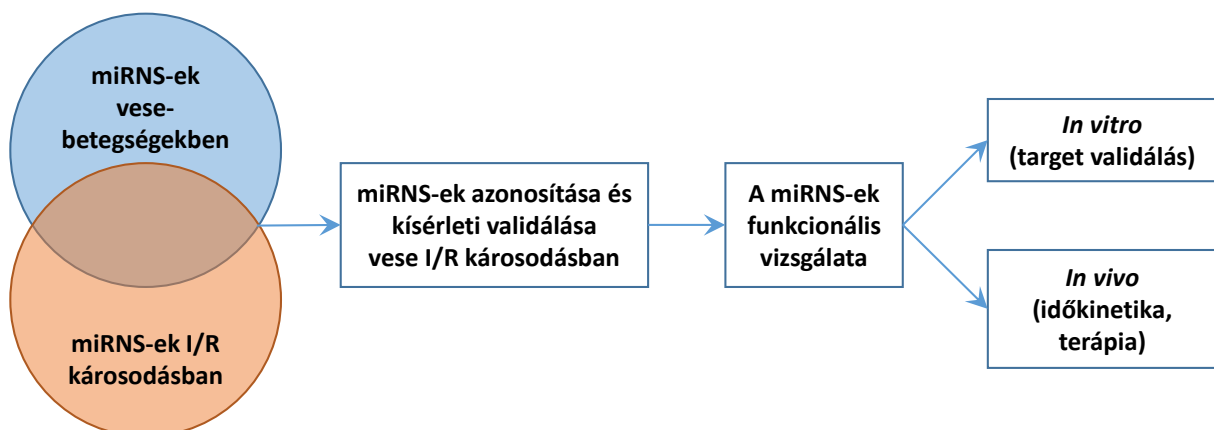
A miRNS-ek szerepét intenzíven vizsgálják számos kóros állapotban. Az akut vesekárosodás (AVK) a klinikai nefrológia gyakori panasza és fontos társadalmi-gazdasági jelentőséggel bír. Leggyakoribb etiológiája a prerenális eredetű ischemia-reperfúziós (I/R) vesekárosodás, amely például keringési sokk vagy szívműtét következtében is felléphet. Az I/R károsodás gyakori velejárója a transzplantációnak is, így elkerülhetetlen jelenség a veseátültetés során. Továbbá, az AVK-t egyre gyakrabban tekintik a krónikus vesebetegség egyik

okozati tényezőjének. Jelenleg nem áll rendelkezésre AVK-ra célzott és specifikus kezelés. Annak ellenére, hogy több kutatás is vizsgálta, a miRNS-ek szerepe I/R indukálta AVK-ban még nem tisztázott. Néhány miRNS-t a különböző kórélettani folyamatokban való részvételük mellett, mint az AVK lehetséges biomarkerét is tanulmányozták. A betegség-specifikus miRNS változások felderítése új diagnosztikus eszközöket és terápiás célpontokat határozhatnak meg az AVK kezelésében.

Célkitűzés

A disszertáció célja a miRNS-ek vese ischemia-reperfúziós károsodásban betöltött szerepének tanulmányozása. Következésképpen a következő részcélokat tűztük ki (1. Ábra):

1. Felbecsülni az irodalmi adatok alapján, hogy mely miRNS-ek változása várható vese ischemia-reperfúziós károsodásban;
2. Azonosítani és validálni a kiválasztott miRNS-eket akut vesekárosodásban (AVK);
3. Elemezni a validált miRNS-ek szerepét:
 - a. időkinetikai analízissel, annak vizsgálatára, hogy a miRNS-ek az AVK melyik fázisában változnak;
 - b. miRNS alapú terápia hatékonyságának vizsgálatával.



1. Ábra. Célkitűzések és munka-terv.

A miR-17-es család azonosítása egér vese I/R károsodásban és néhány miRNS időkinetikájának vizsgálata, melyet a Semmelweis Egyetemen végeztünk, egy önálló cikk témáját képezte (továbbá: *miR-17 vizsgálat*). A miR-24 ischémias AVK-ban betöltött szerepének tanulmányozása, amely során target validálás és egy miR-24 alapú terápias eszköz *in vivo* vizsgálata történt a Hannoveri Orvosi Egyetemen egy másik tudományos cikkben került bemutatásra (továbbá: *miR-24 vizsgálat*).

Módszerek

Ischemia-reperfúziós vesekárosodás

Az akut vesekárosodást ischemia-reperfúziós (I/R) károsodással indukáltuk C57BL/6 egerekben. Anesztézia után kipreparáltuk és elszorítottuk a bal vese-ereket. A sham operált kontroll egereknél is hasonlóan jártunk el, a vese-erek elszorítása nélkül. A reperfúziós idő hossza 1 és 7 nap között változott. A túlélési analízisnél bilaterális vese I/R károsodást idéztünk elő.

LNA-módosított miRNS oligonukleotid terápia

Az egereket 24 órával a beavatkozás előtt, intraperitoneálisan (i.p.), zárt nukleinsav-módosított, miR-24-et (LNA-24), vagy kontroll (Caenorhabditis elegansban kifejeződő miRNS-t) (LNA-CTR) célzó oligonukleotidokkal kezeltük, 10 mg/testtömeg-kg-os dózissal.

Ex vivo sejt tisztítás/szortírozás

Az I/R károsodás által előidézett renális miR-24 indukció sejtszintű eredetét fluoreszcencia-aktivált sejt szortírozással (FACS) vizsgáltuk, specifikus antitestek használatával: anti-CD31 antitestet endothel sejtek, Lotus tetragonolobus agglutinint (LTA) proximális epithel sejtek és anti-Tim1 antitestet sérült proximális epithel sejtek kiválasztásához. A Pdgfr-beta+ pericitákat mágneses gyöngyökön alapuló MACS módszerrel szeparáltuk a vesékből.

Plazma urea és Ngal ELISA

A vesefunkciót vér urea nitrogen (BUN) retenciójával határoztuk meg. A BUN érték kiszámolásához a mért urea értékeket 2,14-gyel osztottuk.

A vese tubuláris epithelsejt károsodásának érzékeny markerét, a neutrofil zselatináz asszociált lipokalin (NGAL) szinteket ELISA módszerrel mértük. Az NGAL koncentrációkat négyparaméteres logisztikus görbeillesztéssel számoltuk ki.

Szövettan és immunohisztokémia

A vese szövetmintákat pufferolt formaldehiddel fixáltuk, majd dehidráálás után paraffinba ágyztuk (FFPE) szövettani és immunhisztokémiai feldolgozáshoz. Az FFPE vesékből 70 mintás szöveti microarray (TMA) blokkokat készítettünk. A renális tubuláris nekrozist és regenerációt perjódsav Schiff (PAS) festett TMA metszeteken értékeltük. A renális tubuláris sejt-károsodást NGAL immunfestéssel is vizsgáltuk. A gyulladásos sejtek infiltrációját a következő antitestekkel elemeztük: anti-F4/80-at makrofágok, anti-CD45-öt fehérvérsejtek, anti-Ly-6G/Gr-1-et neutrofilek, anti-CD4-et T segítő (helper) limfociták azonosítására. A külső medullában a kapilláris ritkulást anti-CD31 antitest segítségével vizsgáltuk. Fluoreszcens, in situ sejthalál detekciós kitet használtunk a terminális deoxinukleotidil transzferáz mediálta deoxiuridin nick end labeling (TUNEL) vizsgálatához.

Sejtkultúrás kísérletek

Az *in vitro* vizsgálatokhoz immortalizált human vese proximális tubuláris epithel (HK-2) sejteket használtunk. A tranziens liposzómás miRNS transzfekciót specifikus és kontroll miRNS-sel, illetve Lipofectamine 2000 reagensekkel végeztük. A sebgyógyulást az egyrétegű sejt-monoréteg megkarcolása után 0, 8 és 24 órakor készített felvételeken, a sejtmentes övezet méretének meghatározásával vizsgáltuk.

RNS preparálás

A teljes RNS-t a vese felső egyharmadából, TRI-Reagenssel nyertük ki. Az RNS koncentrációját 260 nm-en, a tisztaságot a 260 nm / 280 nm abszorpciós értékek arányával ellenőriztük. Az RNS minták integritását agaróz gélelektroforézisen, a 28S és 18S riboszomális RNS frakciók arányával vizsgáltuk.

A microRNS profil multiplex analízise

Az izolált RNS-t először poliadeniláltuk, biotiniláltuk majd inkubáltuk a speciális gyöngykeverékkel, mely 46 különböző microRNS felismerését teszi lehetővé. Végül a miRNS expressziókat a Luminex® 200™ készülékkel határoztuk meg. Az összes mintát duplikátumban mértük. A számításokat a medián fluoreszcencia intenzitás (MFI) háttér levonása után végeztük el, ezért a nagyon alacsony MFI-vel rendelkező miRNS-eket kizártuk az elemzésből.

MicroRNS- és gén-expresszió analízis veseszövetből

A microRNS expressziót TaqMan próbákkal és kvantitatív real-time PCR-rel (qPCR) mértük. A gének mRNS szintjét a dupla szálú DNS (dsDNS)-specifikus festésén (SYBR Green) alapuló qPCR-rel végeztük. Az összes mintát duplikátumban mértük és az expressziós értékeket relatív kvantifikációs ($\Delta\Delta Cq$) módszerrel számoltuk ki. A qPCR hatékonyságát standard görbékkel ellenőriztük. A gén-array analízis Affymetrix GeneChip-pel történt.

MicroRNS targetek predikciója

MicroRNS adatbázisokat és *in silico* target-predikciós eszközöket használtunk a lehetséges microRNS targetek azonosításához. A több mint két adatbázis által prediktált és a 3'UTR régióban miR-24-8mer mag (seed) egyezéseket tartalmazó targeteket vettük csak figyelembe.

Statisztikai analízis

A folytonos változókat párosítatlan T-próbával vagy egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük. Többszörös összehasonlításhoz Dunnett-próbát (kontroll csoporthoz) vagy Tukey-próbát (páronként) használtunk. A lineáris korrelációt Pearson-féle korrelációs együtthatóval vizsgáltuk. A nullhipotézist akkor vettettük el, ha a kétoldalú p-érték elérte a statisztikai szignifikanciaszintet (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

Eredmények

miR-17 vizsgálat

Letális vese ischemia-reperfúziós károsodás markerei

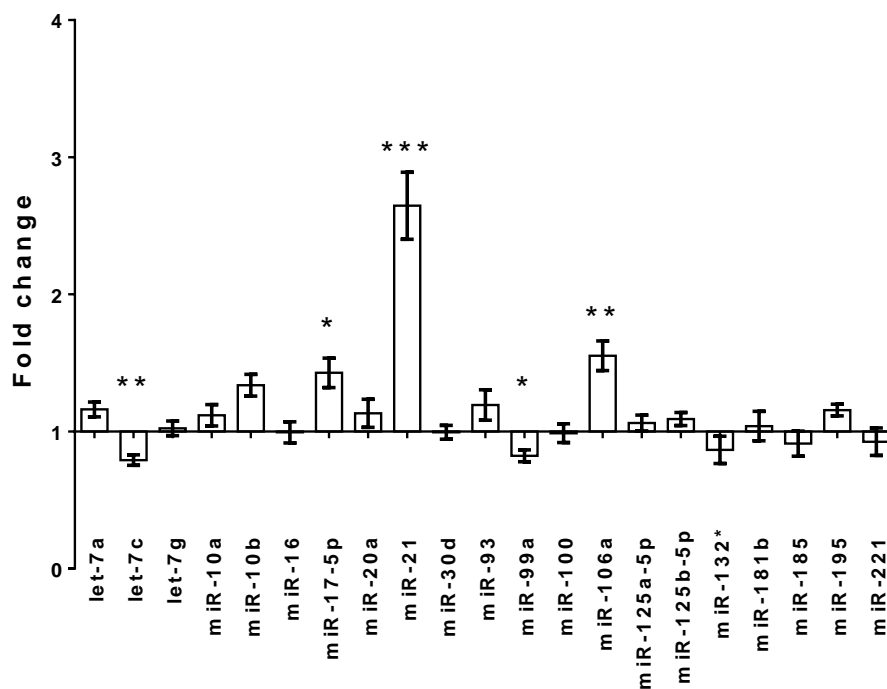
Letális, 30 perc ischemia után egy nappal a külső vesevelő (medulla) külső sávjában súlyos, a vesekéregben (kortex) viszont már enyhébb szövettani sérüléseket azonosítottunk. Az NGAL (vese tubulus-károsodás marker) immunhisztológiai analízise ischemia-reperfúzió után erős NGAL specifikus tubuláris festődést mutatott a külső sávban és kisebb mértékűt a kéregben. Az NGAL vese expressziója (mRNS) és plazmaszintje, illetve a vér urea nitrogén (BUN) szintje nagyobb volt a sham-kontroll szintjeihez képest.

Subletális vese ischemia-reperfúziós károsodás markerek időkinetikája

Egy nappal 20 perc ischemia után megemelkedett az összes vesekárosodás marker szintje. Ezt követően a tubuláris regeneráció láthatóvá vált a szövettani metszeteken és csökkenni kezdtek a vesekárosodás markerek szintjei. A negyedik reperfúziós napon az összes vesekárosodás marker szintje kontroll közeli szintre süllyedt.

A vese-mikroRNS expresszió változása és a miR-17-5p, illetve a miR-21 expresszió időkinetikája vese ischemia-reperfúzió után

Öt (miR-21, miR-17-5p, miR-106a, let-7c and miR-99a) miRNS-nek volt szignifikánsan különböző expressziója a sham-kontroll csoporthoz képest (2. Ábra). Azonban 30%-kal nagyobb változást csak a miR-21, miR-17-5p és a miR-106a expressziós-szintjeiben mértünk I/R károsodást követően. Subletális ischemia után a miR-17-5p szintje már az első naptól szignifikánsan megemelkedett és magas maradt a harmadik napig. Ugyanakkor a miR-21 szintje csak a harmadik napra emelkedett meg, de magas maradt a negyedik napon is, amikor a miR-17-5p szintje már nem különbözött szignifikánsan a sham-kontrollhoz képest.



2 Ábra. A miRNS expressziós profil vese ischemia-reperfúziós károsodásban, Luminex multiplex módszerrel mérve (a sham-kontroll csoporthoz viszonyított változás mértéke (fold change) 30 perc ischemia és 24 óra reperfúzió után).

Korreláció a miR-17-5p és miR-21 között

A miR-17-5p és miR-21 expressziós szintjei szignifikánsan korreláltak az összes vizsgált csoportban és reperfúziós időpontban. Ugyanakkor a regressziós egyenesek dőlésszöge szignifikánsan különbözött a csoportok között, a reperfúziós idővel egyre inkább meredekebbé válva.

miR-24 vizsgálat

miR-24 vese ischemia-reperfúziós károsodásban

Magas miR-24 szintet mértünk az ischemia után egy és hét nappal, a kontralaterális veséhez képest. Az ischemia-reperfúziót követő sejtsztyálozás (sorting)-analízis a tubuláris epithel sejtekben és endothelsejtekben mutatott ki emelkedett miR-24 szintet 1 nap reperfúzió után. Hét nap reperfúzió után már csak a sérült tubuláris epithel sejtekben mértünk magas miR-24 szintet. A pericitákban enyhe, nem szignifikáns miR-24 expresszió csökkenést észleltünk. A hosszú hideg ischemiás idejű transzplantált vesebiopsziákban a miR-24 szintje szintén magasabb volt.

A miR-24 funkcionális szerepe tubuláris epithelsejtekben

A miR-24 előalakjának transzfekciója már sejtkárosító tényező hiányában is növelte a TUNEL festéssel vizsgált apoptózis mértékét. A sebgyógyulás-karcolás vizsgálatok pedig kimutatták, hogy a tubuláris epithelsejtek migrációs képessége csökken a miR-24 szintek emelkedésével.

A miR-24 targetjei, in vitro

Proximális tubuláris epithelsejtek miR-24 transzfekcióját követően a globális hírvivő RNS (messenger RNS, mRNS) vizsgálat 1822 alul-kifejezett gént mutatott ki a negatív kontroll oligonukleotiddal transzfektált sejtekhez képest. A további vizsgálatainkban a szfingozin-1-foszfát receptor 1-et (S1PR1), H2A hiszton család, X tagot (H2A.X) és a hemoxigenáz-1-et (HO-1) tanulmányoztuk.

Vesekárosodás markerek és endothel aktiváció miR-24 csendesítést követő vese ischemia-reperfúziós károsodásban

Vese ischemia-reperfúzió után a zárt nukleinsav (locked nucleic acid, LNA) módosított, miR-24-et célzó anti-miRNS oligonukleotid kezelés javította a túlélést, csökkentette a vesekárosodás markerek (NGAL és KIM1) gén-expresszióját és enyhítette a vesefunkció paraméterek emelkedését (szérum-

kreatinin és -urea). Egy nappal az ischemia-reperfúziós károsodás után szignifikánsan enyhébb volt az epithelsejt sérülés és a kapilláris ritkulás miR-24 csendesítést követően.

Vese morfológia, immunsejt infiltráció és az apoptózis mértéke miR-24 csendesítés után vese ischemia-reperfúziós károsodásban

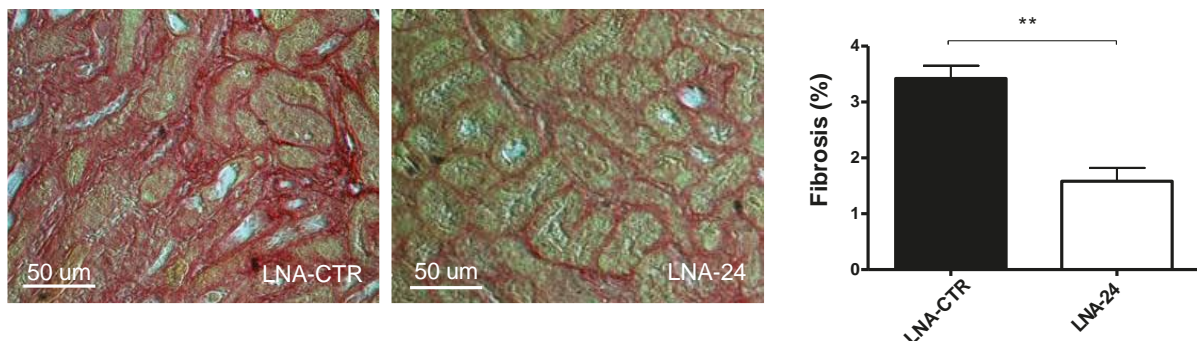
A miR-24 csendesítés javította a vesemorfológiát 1 nappal az ischemia-reperfúziós károsodás után. A fehérvérsejt-, makrofág-, T-sejt- és neutrophil-infiltráció szignifikánsan alacsonyabb volt a miR-24 elleni LNA kezelés után az összes vizsgált reperfúziós időpontban. A tubuláris sejtek apoptózisa is kisebb mértékű volt 1 nap reperfúzió után a miR-24 csendesítést követően.

A miR-24 target-szabályozása vese ischemia-reperfúzióban, in vivo

Az ischemia-reperfúzió károsodott vesékben a HO-1 szintje szignifikánsan magasabb volt a külső sávban a miR-24 elleni LNA kezelést követően a kontroll LNA-val kezelt állatokhoz képest. A H2A.X szintje enyhén fokozódott, bár statisztikai szignifikancia nélkül. *In vivo*, az S1PR1-et nem szabályozta a miR-24-et csendesítő kezelés.

A miR-24 szerepe az akut vesekárosodás indukálta krónikus vesebetegség kialakulásában

A vese fibrózis és a fibrótikus gének vese-expressziója jelentősen csökkent 7 nap reperfúzió után, a miR-24 csendesítés hatására (Ábra 3).



Ábra 3. Vese fibrózis vizsgálata (Sirius-vörös festéssel) ischemia-reperfúzió indukálta vesekárosodásban kontroll és miR-24 elleni LNA kezelés hatására a 7. reperfúziós napon.

Következtetések

Eredményeink alapján a miR-17-5p, miR-106a, miR-21 és miR-24 részt vesznek az ischemia-reperfúzió indukálta akut vesekárosodás patomechanizmusában.

A *miR-17 vizsgálat* kimutatta, hogy az akut vesekárosodás fenntartó fázisában fokozódik a miR-17-5p expresszió. A miR-21 szintje csak ezt követően emelkedik, viszont a gyógyulási fázisban is magas marad. A miR-17-5p és a miR-21 expressziók korreláltak egymással, viszont a két miRNS kapcsolatának feltárásához további kutatásra van szükség. Továbbá a miRNS expresszió-fokozódások időzítése arra utalhat, hogy a miR-17 és miR-21 szerepet játszhatnak a vese regenerációjában. A két miRNS ezért ígéretes terápiás célpont lehet az akut vesekárosodás kezelésében.

A *miR-24 vizsgálatból* következik, hogy a miR-24 az epithel- és endothel-sejtek apoptózisának szabályozásával befolyásolja az ischemia-reperfúziós vesekárosodás folyamatait. A miR-24 pro-apoptikus hatását az anti-apoptotikus HO-1 és a H2A.X gátlásával éri el. A miR-24 csendesítése *in vivo* csökkenti az apoptotikus választ. A kisebb mértékű epitheliális és endotheliális apoptózis csökkenti a tubuláris károsodást és javítja a kapilláris denzitást. A tubulo-intersticiális fibrózis mérsékelése pedig fékezi az akut vesekárosodás krónikus vesebetegséghez vezető progresszióját. Tanulmányunk először mutatta ki, hogy a miRNS-ek farmakológiai gátlása eredményes terápiás lehetőség lehet ennek az életet-veszélyeztető betegség kezelésében. Továbbá, a miR-24 a hosszú hideg ischemia idejű transzplantált betegek veséiben is fokozódott, ezért a humán vese ischemia-reperfúziós károsodásban is szerepe lehet. Vizsgálatunk rávilágít arra, hogy a miR-24 szabályozása az első klinikailag alkalmazható célzott terápiája lehet az akut vesekárosodásban szenvedő betegeknek.

Saját közlemények jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Kaucsar T, Racz Z, Hamar P. (2010) Post-transcriptional gene-expression regulation by micro RNA (miRNA) network in renal disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(14): 1390-401. IF: 13.577

RácZ Z, Kaucsár T, Hamar P. (2011) The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs (review). *Acta Physiol Hung*, 98(3):243-51. IF: 0.821

Kaucsár T, Révész C, Godó M, Krenács T, Albert M, Szalay CI, Rosivall L, Benyó Z, Bátkai S, Thum T, Szénási G, Hamar P. (2013) Activation of the miR-17 family and miR-21 during murine kidney ischemia-reperfusion injury. *Nucleic Acid Ther*, 23(5):344-54. IF: 2.888

Lorenzen JM, Kaucsar T, Schauerte C, Schmitt R, Rong S, Hübner A, Scherf K, Fiedler J, Martino F, Kumarswamy R, Kölling M, Sörensen I, Hinz H, Heineke J, van Rooij E, Haller H, Thum T. (2014) MicroRNA-24 Antagonism Prevents Renal Ischemia Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*, 25. DOI: 10.1681/ASN.2013121329. IF(2013): 9.466

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Kaucsár T, Bodor C, Godó M, Szalay C, Révész C, Németh Z, Mózes M, Szénási G, Rosivall L, Söti C, Hamar P. (2014) LPS-induced delayed preconditioning is mediated by Hsp90 and involves the heat shock response in mouse kidney. *PLoS One*, 9(3):e92004. IF(2013): 3.534

Paşca SP, Dronca E, Nemeş B, Kaucsár T, Endreffy E, Iftene F, Benga I, Cornean R, Dronca M. (2010) Paraoxonase 1 activities and polymorphisms in autism spectrum disorders. *J Cell Mol Med*, 14(3):600-7. IF: 4.608

Paşca SP, Dronca E, Kaucsár T, Craciun EC, Endreffy E, Ferencz BK, Iftene F, Benga I, Cornean R, Banerjee R, Dronca M. (2009) One carbon metabolism disturbances and the C677T MTHFR gene polymorphism in children with autism spectrum disorders. *J Cell Mol Med*, 13(10):4229-38. IF: 5.228

Köszönetnyilvánítás

Először a témavezetőmnek, **Dr. Hamar Péter**-nek szeretném megköszönni, hogy támogatta és irányította kutatómunkámat a PhD képzésem során, és hogy rávilágított az *in vivo* kísérletek fontosságára.

Hálásan köszönöm a Kórélettani Intézetből az összes munkatársam segítségét: **Dr. Rosivall László** Professzor Úr-nak, az Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének a lehetőséget és a bizalmát a PhD tanulmányaimhoz. **Dr. Szénási Gábor**-nak a nélkülözhetetlen tanácsokat és hogy megosztotta velem gazdag kutatási tapasztalatait; **Godó Mária**-nak, **Révész Csabá**-nak, **Cser Ágnes**-nek, **Dr. Szalay Csabá**-nak, **Dr. Rácz Zsuzsanna**-nak és **Bodor Csabá**-nak a számos metodika megtanulásában és kivitelezésében nyújtott segítséget; **Dr. Kökény Gábor**-nak az értékes javaslatait, amelyekkel az értekezésemet tökéletesíthettem;

Külön köszönettel tartozom **Dr. Thomas Thum** Professzor Úr-nak, **Dr. Johan Lorenzen**-nek, **Dr. Bátкаи Sándor**-nak és a Molekuláris és Transzlációs Terápiás Stratégiák Intézet (Hannoveri Orvosi Egyetem, Németország) összes munkatársának, hogy befogadtak és támogattak a KAAD ösztöndíjam során, és hogy velük dolgozva részt vehettem és tanulhattam az ott folyó innovatív kutatásokból.

Szeretném megköszönni korábbi témavezetőimnek **Dr. Ioana Berindan Neagoe**-nak és **Dr. Maria Dronca**-nak (Iuliu Hatieganu Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Románia), hogy bevezettek az orvos-biológiai kutatásokba, és hogy támogatták jelentkezésem a PhD képzésre.

Sok köszönet a **ReNnaissance Tanulmányi Ház** közösségének (és **Kiss Ulrich SJ** atyának) hogy a “második családom” volt a budapesti PhD tanulmányaim során.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **szüleimnek**, **nővéremnek** és **nagyszüleimnek** a bizalmat, a bátorítást és a feltételek nélküli támogatást a szakmai képzéseim során.

Az értekezés kutatásainak finanszírozását biztosította: az E.Á. Nemzeti Egészségügyi Intézetének (NIH) #R03 TW07069 számú kutató pályázata (Fogarty Nemzetközi Központ és a Nemzeti Diabetes, Emésztőrendszeri- és Vese-betegségek Intézete); az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) K81972, NF69278 számú pályázata; az Egészségügyi Tudományos Tanács 011-07/2009 pályázata; a T.T. és J.L. által megnyert Else-Kröner-Fresenius Alapítvány pályázata. Köszönet a Hannoveri Orvosi Egyetem Sejt-osztályozó Core Facility közreműködéséért, melyet Braukmann-Wittenberg-Herz-Alapítvány és a Német Kutatási Alapítvány támogat. A németországi kutatásaimat a Katolikus Akadémiai Csereszolgálat (KAAD) ösztöndíja tette lehetővé.