

# **A PARP gátlás sejtvédő hatásának szerepe, Akt aktiváció és a mitokondriális védelem oxidatív stresszben**

**Ph.D. értekezés tézisei**

**Tapodi Antal**

**Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar**

**Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**2007**

**A PARP gátlás sejtvédő hatásának szerepe,  
Akt aktiváció és a mitokondriális védelem  
oxidatív stresszben**

**Ph.D. értekezés tézisei**

**Tapodi Antal**

**Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar**

**Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**Ph.D. Programvezető: Prof. Sümege Balázs, D.Sc.**

**2007**

## Rövidítések jegyzéke

PARP .....	poly(ADP-ribose) polymerase
C1 and N3 .....	mammalian expression vector construct
FCS .....	fetal calf serum
GFP .....	green fluorescent protein
GSK.....	glycogen synthase kinase
JC-1 .....	5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolylcar- bocyanine iodide
MEM.....	minimum Eagle's medium
MTT .....	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
PAR.....	poly(ADP-ribose)
PARP-DBD.....	N-terminal DNA binding domain of PARP
PI3-kinase .....	phosphatidylinositol 3-kinase
siRNA .....	small interfering RNA
MPT .....	Mitochondrial Permeability Transition
ROS.....	Reactive Oxygen Species
AIF.....	Apoptosis Inducing Factor
PTPC.....	Permeability Transition Pore Complex
VDAC .....	Voltage Dependent Anion Channel
ANT .....	Adenine Nucleotide Translocase
IM.....	Inner Membrane
OM.....	Outer Membrane
$\Delta\Psi$ .....	Mitochondrial Membrane Potential
CsA .....	cyclosporine A
Rh123.....	Rhodamine 123
DRh123 .....	Dihydrorhodamine 123
Resorufin.....	N-acetyl-8-dodecyl-3,7-dihydroxyphenoxazine
PI.....	Propidium Iodide
SCAV.....	1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrrol-3- ylmethyl

## Bevezetés

A reaktív oxigén gyökök (ROS) által okozott károsodások fontos szerepet játszanak számos betegség patogenezisében. Különböző forrásokból származhatnak a szabadgyökök, pl. a xantin oxidáz rendszerből, a mitokondriális respirációs lánc tökéletlen működése következtében, az arahidonsav anyagcsere ciklooxigenáz útvonalából és a fagocitáló sejtek átmeneti respirációs aktivitásfokozódása következtében, amelyek aztán, számos egyéb károsodás mellett, egyes-láncú DNS töréseket okoznak. A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP, EC 2.4.2.30) egy multifunkcionális nukleáris enzim, amelyet az egyes-láncú DNS törések aktiválnak, és amely  $\text{NAD}^+$ -ot használva szubsztrátként különböző nukleáris fehérjéken, pl. hisztonokon és saját magán kovalensen kapcsolt, elágazó-láncú poli(ADP-ribóz) szálakat szintetizál. A PARP-1-nek szerepe van a kromatin "remodelling"-jében, a DNS hibajavításban, a genomikus stabilitás megőrzésében; és ezeket a szerepeket részben poliADP-riboziláló aktivitása révén éri el. Enyhe DNS károsodás esetén a PARP-1 szükséges a hibajavításhoz, de oxidatív stressz során, amikor a nagy mennyiségű DNS törés a PARP-1 túlzott aktivációját okozza, az enzim depletálhatja a  $\text{NAD}^+$ -ot, illetve a  $\text{NAD}^+$  reszintézisének nagy energia-igénye miatt az ATP-t is, ami sejthalált eredményez. A PARP inhibitorok védenek a miokardiális ischemia, neuronális ischemia, akut tüdőgyulladás, akut szepszis, akut szeptikus sokk, zimogén-indukálta többszervi elégtelenség és a diabetikus pankreasz károsodás ellen mutatva, hogy milyen jelentős a túlzott PARP-1 aktiváció szerepe a sejthalál kiváltásában. A klasszikus elképzelés szerint a PARP inhibitorok a  $\text{NAD}^+$  és ATP depléció megakadályozásával védenek az oxidatív stressz ellen, de néhány új adat a citoprotekció egy sokkal összetettebb mechanizmusát sugallja.

Kísérletesen bizonyított, hogy a PARP aktiváció hozzájárulhat a mitokondriális károsodások és a mitokondriális ROS termelés megnövekedéséhez, mutatva, hogy a PARP a magon kívüli folyamatokat is képes befolyásolni. Friss eredmények szerint létezik mitokondriális PARP, ami gátolható PARP-1 inhibitorokkal, ezért, fontos azt tisztázni, hogy a mitokondrium védelem a mitokondriális ADP-ribozilációs folyamatok gátlásának egyenes következménye, vagy a nukleáris PARP-1 befolyásol olyan, egyelőre nem tisztázott mechanizmusokat, amelyek a mitokondriális protekciót eredményezik.

Saját korábbi eredményeink szerint PARP inhibitorok az Akt foszforilációját, ezáltal aktivációját eredményezték lipopoliszahariddal kezelt egerek májában, tüdejében és lépében, ami annak lehetőségét veti fel, hogy a PARP inhibitorok védő hatása a PI3-kináz/Akt útvonalon keresztül mediálódik. Ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy a PARP inhibitorok védő hatása sokkal komplexebb lehet, mint a  $\text{NAD}^+$  és ATP depléciónak megakadályozása, mivel az Akt kináz képes számos regulátoros fehérjére, így a GSK-3 $\beta$ , a kaszpáz-9, a BAD, vagy a FKHR foszforilálására, amely folyamatok involválva vannak a mitokondriális membrán rendszerek stabilizálásában.

A sejtek lecsökkent energia töltése következtében rosszul működő pumpafunkciók eredményeként beáramló  $\text{Ca}^+$ , a megemelkedett inorganikus foszfát, valamint a ROS külön-külön és együttesen is mitokondriális permeabilitás tranzícióhoz (mPT) vezetnek. Mind a fiziológiás, mind a patológiás sejthalál velejárója az mPT, mely természetesen több szintű reguláció alatt áll. Számos pro-apoptotikus másodlagos hírvivő felelős közvetlenül az mPT kialakulásáért; pl.: a már említett ROS és  $\text{Ca}^{2+}$  mellett lipid származékok is (ceramide és ganglioside GD3), valamint a stressz-kinázok. Mindent összevetve elmondhatjuk, hogy a pro-apoptotikus fehérjék kiváltják, az anti-apoptotikus fehérjék pedig gátolják az mPT kialakulását. A mitokondriumok belső membránja (inter membrán: IM) átjárhatatlan a metabolitok számára. Ennek köszönhetően alakulhat ki a légzési lánc komplexei által generált membránpotenciál különbség az IM két oldalán. Az mPT alatt végbemenő duzzadást a szabadon be és ki áramló metabolitok váltják ki, mely az u.n. "mega-pórus" (mPT-Pore) megnyitásán keresztül jön létre.

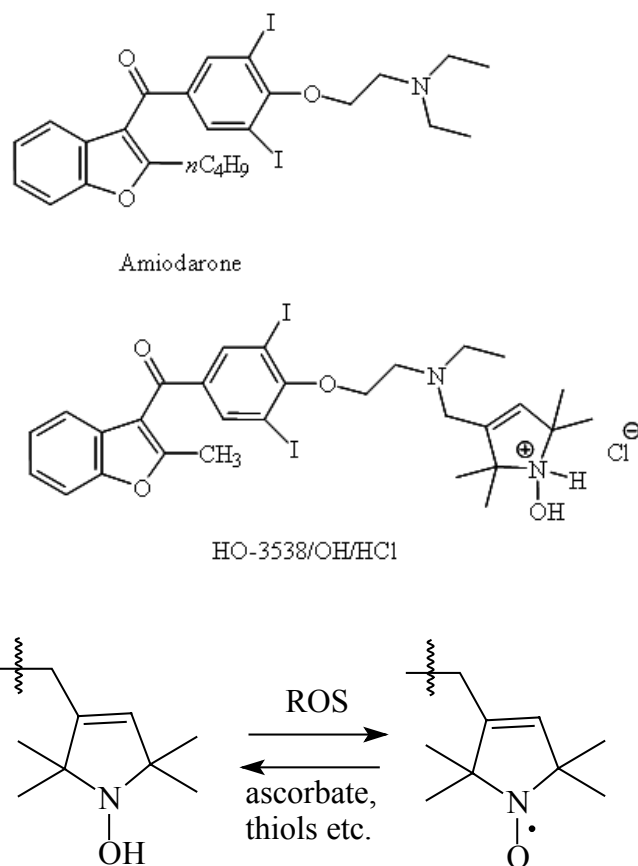
Korábbi eredményeink szerint az Amiodarone (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethylamino)-ethoxy]-3,5-diiodophenyl-ketone hydrochloride), amely egy III. kategóriájú antiarritmiás ágens, és a klinikai gyakorlatban számos szívritmuszavar kezelésében használnak, bizonyítottan jótékony hatással rendelkezik a postischemiás szívekre, mivel javítja a mitokondriumok energia metabolizmusát, és mPT gátló hatással is rendelkezik. Az Amiodarone kis koncentrációban gátolja, nagy koncentrációban viszont indukálja a mitokondriális duzzadást, valamint a mitokondriális membránpotenciál összeomlását okozza. Megvizsgáltuk az Amiodarone patkány szívre gyakorolt hatásait. Langendoff-perfúzió során,  $^{31}\text{P}$ -NMR spektroszkópiával. Eredményeink szerint az Amiodarone, a mitokondriális energia metabolizmusra pozitív,

protektív hatású ischemia és reperfüzió alatt. A szívsejtekre és egyéb extrakardiális sejtekre gyakorolt hatásukat cardiomyocytá ill. májsejt sejt kultúrákon vizsgáltuk. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy az Amiodarone alacsony koncentrációban a mitokondriumokra gyakorolt pozitív hatásai (mPT gátlás, ROS képződés gátlás, mitokondriális fehérjekiáramlás gátlás) miatt jótékony hatású a postischemiás szívekre. Feltételezéseink szerint az Amiodarone pozitív tulajdonságaiért a szerkezetében egy amincsoporton található etyl csoport lehet a felelős, mivel metabolitja a Desethylamiodarone, nem mutat cardioprotektív és mitokondriumvédő hatásokat.

Mivel az Amiodarone előnyös tulajdonságai miatt nélkülözhetetlen az orvostudomány számára, a közelmúltban jelentős erőt fektettek különféle Amiodarone analógok kifejlesztésébe. Az Amiodarone molekula szerkezetének megváltoztatásával próbált számos csoport olyan molekulákat keresni, melyek mutatják az Amiodarone mind a mitokondriumokra, mind a szívre gyakorolt pozitív hatásait, miközben elkerülhetővé válnak a negatív mellékhatások.

Prof. Hideg Kálmán és munkatársai által szintetizált és számunkra rendelkezésre bocsátott új Amiodarone analógok lehetőséget jelentettek számunkra, hogy tulajdonságaikat megvizsgálva találjunk egy olyan új Amiodarone analóg molekulát, mely megfeleljen a fenti kívánalmaknak.

Tíz-nél több új analóg molekula hatásait vizsgáltuk a mitokondriális permeabilitás tranzicióra, és Langendorff perfundált szívekre. Ezen vizsgálataink eredményeként jutottunk el a HO-3538 nevű molekulához, mely a leghatékosabb Amiodarone-analóg molekulának tűnik.



**Fig. 1. The chemical structures of amidarone HO-3538 and SCAV**

Az amidarone kémiai szerkezete (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethylamino)-ethoxy]-3,5-diidophenyl-ketone hydrochloride), HO-3538 (2-Methyl-3-(3,5-diidó-4-{2-[N-ethyl,N-(1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihidro-1H-pyrrol-3-ylmethyl)ethyl]}oxybenzoyl)benzofurane 2HCl salt). A HO-3538 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihidro-1H-pyrrol-3-ylmethyl komponense (SCAV), mely gyökfogó tulajdonsággal rendelkezik.

A HO-3538 szerkezetileg egy oldalláncban tér el az Amiodarone molekulától (Fig.1.). Az Amiodarone Etyl oldalláncát helyettesítették egy 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihidro-1H-pyrrol-3-ylmethyl oldallánccal, mely önmagában is gyökfogó tulajdonságokkal rendelkezik. Összehasonlítottuk a HO3538 és az Amiodarone mitokondriumokra (mPT, fehérjekiáramlás), szívekre és sejtekre gyakorolt hatásait.

## Célkitűzések.

1. Számos tudományos munka bizonyítja, hogy a különböző PARP gátlók jótékony hatással bírnak a sejtek túlélésére oxidatív stresszben. Valóban a PARP-1 aktiválásának közvetlen mérséklődéséhez köthető ez a citoprotekció, vagy inkább más, ADP-ribózilált fehérjék aktivációjának csökkenésével áll összefüggésben?
2. Széles körben elfogadott tény, hogy a PARP gátlás citiprotektív hatásai oxidatív stresszben a  $\text{NAD}^+$  és közvetve az ATP szintjének a megőrzésén alapszik. Egyedül a sejtek energetikájának a megőrzése felelős ezért a jótékony hatásért, vagy más mechanizmusok is részt vehetnek ebben?
3. Korábbi munkáink során megállapítottuk, hogy az amiodarone az mPT-re bifázisos hatást gyakorol. Alacsony koncentrációban megvédi a mitokondriumokat a duzzadástól, míg nagyobb koncentrációnál CsA független úton mPT-t idéz elő. Feltételezhető, hogy elő tudunk állítani olyan amiodarone származékot, amely nem rendelkezik mPT indukáló hatással, amellet, hogy a mitokondriumra gyakorolt jótékony hatásait megőrzi?
4. Számos amiodarone származékot vizsgáltunk meg, míg kiválasztottunk egy olyan új amiodarone analógot (HO-3538), melynek egyik ethyl- oldalláncát egy SOD-mimetikus csoportra cseréltük. Milyen előnyös hatásai vannak az mPT gátlásnak és a szabadgyök fogó képesség kombinációjának oxidatív stresszben vagy ischemia-reperfúzió körülményei között?



## **Módszerek**

### ***A PARP DNS-kötő doménjének transzdomináns expressziója***

A PARP N-terminális DNS-kötő doménjének kódoló régióját (PARPN214, 1-214 aminosavak [34]) PCR technikával kiterjesztettük és "in-frame" beillesztettük pEGFP-C1/N3 vektorokba (Clontech, Palo Alto, CA) Hind III és EcoRI restriktációs enzimek (Fermentase, Vilnius, Lithuania) segítségével. Annak érdekében, hogy a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) tartalmazó PARP-N214 a magba juthasson, az erősítéshez nukleáris lokalizációs szignált kódoló PCR primert alkalmaztunk. A tisztított rekombináns pPARPGFP-C1/N3 vektorokat transziensen transzfektáltuk WRL-68 humán máj sejtvonalba Lipofectamine2000 (Invitrogen, Frederick, MD) segítségével. Hatásos transzdomináns expresszió érdekében egy második transzfekciót is végeztünk 48 órával később és a sejteket 40 órával ezt követően használtuk fel a kísérletekhez.

### ***A PARP-1 szupressziója kis interferáló RNS (siRNS) technikával***

WRL-68 sejteket transziensen transzfektáltunk a gyártó (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) által a PARP-1 szupressziójára tervezett siRNS-sel Lipofectamin2000 segítségével. A PARP hatásos elnyomása érdekében még két transzfekciót végeztünk 48 órás időközökkel és a sejteket 40 órával ezt követően használtuk fel a kísérletekhez.

### ***Sejthalál mérése***

A sejteket 96-lyukú tálcákon tartottuk, a kiindulási sejtszám  $10^4$  sejt/lyuk volt. Az oxidatív stressz kiváltásához a sejteket 3 órán át  $H_2O_2$  tartalmú médiumban tartottuk inhibitorok jelenlétében és távollétében, majd a médiumot lecseréltük 0.5% 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT<sup>+</sup>) tartalmú médiumra. További 3 órás inkubáció után Anthos Labtech 2010 ELISA leolvasóval 550nm hullámhosszon megmértük a képződött kék formazán festék mennyiségét, amely arányos volt az élő sejtek számával. Minden kísérletet 3-szor ismételtünk kísérletenként 4 párhuzamost használva.

### ***Western blot analízis***

A sejteket az előzőekhez hasonlóan kezeltük, majd proteáz- és foszfatázgátlót tartalmazó pufferben homogenizáltuk. Zsebenként 35  $\mu$ g fehérjét vittünk fel 12%-os poliakrilamid géltre, és blotolást követően a nitrocellulóz membránt 5% zsírintes tejben 1:1000 arányban hígított primér antitest oldatban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. A második

antitest tormagyökér peroxidáz-konjugált anti-nyúl IgG volt, a vizualizálást SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce Chemical, Rockford, IL) használatával végeztük. Minden kísérletet 4-szer ismételtünk.

### ***Fluoreszcens mikroszkópia***

A vad típusú, vagy transzfektált WRL-68 sejteket poli-L-lizinnel borított (2.5-5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) üveg fedőlemezekre tenyésztettük. A kezelések után a lemezeket mostuk, a sejteket JC-1 membránpotenciál függő festékkel (Molecular Probes, Eugene, OR) feltöltöttük 10 percre, majd ColorView CCD kamerával és alySISR software-rel felszerelt Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal fényképeket készítettünk 60x objektív alatt. A GFP fluoreszcenciához 450-490nm excitációs és >520nm emissziós (zöld) filtereket használtunk. JC-1 fluoreszcenciához ugyanarról a látómezőről 546nm bandpass excitációs és >590nm emissziós (piros), majd zöld filterrel készült kép.

### ***Állatok***

A Wistar patkányokat a budapesti Charles River Hungary Breeding Kft-től vásároltuk

### ***Mitokondriális permeabilitás tranzíció mérés***

Az mPT jelenséget a mitokondriális duzzadás során fellépő abszorbancia csökkenés (540nm-en) regisztrálásával követtük nyomon Perkin-Elmer fluoriméter segítségével. 1mg/ml fehérje koncentrációjú mitokondrium oldatot inkubáltunk standard mPT-pufferben. A mitokondriális permeabilitás tranzíciót  $\text{Ca}^{2+}$ -mal, Amiodaronnal vagy HO-3538-cal indukáltuk. Az  $E_{450}$ -es abszorbancia csökkenést 20 percre detektáltuk.

### ***Mitokondriális membránpotenciál mérés***

A mitokondriumokat Rh123 tartalmú mPT pufferben 1 órán át előkezeltük. A mitokondriumok membránpotenciál csökkenését az mPT indukciót követő, kiáramló Rh123 fluoreszcens festék detektálásával követtük nyomon (ex./em.: 495nm/535nm). A mérés 4 percre tartott.

### ***Antioxidáns hatás mérése sejteken***

A sejteket 96-lyukú tálcákon tartottuk, a kiindulási sejtszám  $10^4$  sejt/lyuk volt. Az oxidatív stressz kiváltásához a sejteket 1,5 órán át  $\text{H}_2\text{O}_2$  tartalmú médiumban tartottuk, majd a médiumot lecseréltük HO-3538 vagy különböző antioxidáns anyagokat tartalmazó médiumra. További 1/2 órás inkubáció után  $1\mu\text{M}$  carboxy- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ -t adtunk a médiumhoz, majd 1 órán át tovább inkubáltuk. A generálódott ROS sztöchiometrikus

arányban oxidálta a carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA fluoreszcens festéket, amit fluoreszcens ELISA leolvasóval ex: 485nm / em:555nm hullámhosszon mértük. Minden kísérletet 3-szor ismételtünk kísérletenként 4 párhuzamost használva.

### ***Langendorff szívperfúzió***

A kísérleti patkányokat 200 mg/ttkg ketamin intraperitoneális beadásával altattuk el, és 100 IU i.p. Na-heparinnal heparinizáltuk. A szíveket a Langendorff módszer szerint az aortán keresztül retrográd perfundáltuk 70 Hgmm-es állandó nyomással 37°C-on. A perfúziós folyadék módosított, foszfátmentes Krebs-Henseleit puffer volt, amely 118 mM NaCl-t, 5 mM KCl-t, 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>-t, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>-t, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>-t, 11 mM glükózt és 0,6 mM oktánsavat tartalmazott, és pH-ját 7,4-re állítottuk. A 15 perces kimosási fázist követően a szíveket 10 percig normoxiás körülmények között perfundáltuk, majd az aorta beáramlási csövének az elzárásával 30 perces globális ischaemiát hoztunk létre, amit 15, 45 illetve 90 perces reperfúziós fázis követett.

### ***NMR spektroszkópia***

A <sup>31</sup>P spektrumokat Varian UNITY<sup>INOVA</sup> 400 WB készülékkel detektáltuk. A perfundált szívek <sup>31</sup>P méréseit (161,9 MHz) 37°C-on Z•SPEC 20 mm-es „broadband” mintavételi fejjel végeztük (Nalorac Co., Martinez, California, USA) a felvétel alatt GARP-1 proton lecsatolást alkalmazva. A mező homogenitását a proton jel ( $w_{1/2} = 10\text{--}15$  Hz) követésével állítottuk be. A spektrumokat 3 percenként gyűjtöttük, minden FID (free induction decay) jelben 120 tranziens összegyűjtésével.

## Eredmények

1. Számos tudományos munka bizonyítja, hogy a különböző PARP gátlók jótékony hatással bírnak a sejtek túlélésére oxidatív stresszben. Bebizonyítottuk, hogy mindhárom módszer, a farmakológiai gátlás, a PARP fehérje mennyiségének elnyomása siRNS technikával, illetve a kompetitív, de nem farmakológiai gátlás, a PARP-DBD transzdomináns expressziója megvédte a sejteket az oxidatív károsodásokkal szemben. Mind a siRNS, mind a PARP-DBD konstrukció a PARP-1 szekvenciája alapján készült, így kísérleteink nyomán egyértelművé vált, hogy a nukleáris PARP aktivációja, és nem egyéb ADP-ribosilációs folyamatok felelősek az oxidatív stressz kiváltotta sejthalál mediálásában.
2. Sikerült cáfolnunk azt a klasszikus elképzelést, hogy a PARP gátlás citoprotektív hatása kizárólag a sejtek NAD<sup>+</sup> illetve ebből kifolyólag az ATP szintének megőrzésén alapszik oxidatív stresszben. Az Akt aktivációjának gátlása -specifikus inhibitorokkal szignifikánsan csökkentette a PARP gátlás jótékony hatásait oxidatív stresszben. Így a PARP gátlás indukálta Akt aktiváció is egyértelműen felelőssé tehető a citoprotektív hatásokért az oxidatív károsodásokkal szemben. Bebizonyítottuk, hogy a PARP gátlás jótékony hatásai oxidatív stresszben két különböző útvonalon mediálódnak: a sejtek energetikájának megőrzésén, valamint az Akt/PI3K mint ismert túlélési jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül.
3. Számos amiodarone származékot szintetizáltunk és megvizsgáltunk az mPT-e gyakorolt hatásaikat, míg kiválasztottunk egy olyan új amiodarone analógot (HO-3538), melynek egyik ethyl- oldalláncát 1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-ylmethyl csoportra cseréltük, mely SOD-mimetikus aktivitást hordoz. A HO-3538 alacsonyabb koncentrációban tökéletesen gátolta a Ca<sup>2+</sup> indukálta mitokondriális duzzadást, míg nagyobb koncentrációban nem okozott mitokondriális permeabilitás tranzíciót.
4. A HO-3538 bár kisebb szabadgyök fogó aktivitással rendelkezik, mint más antioxidáns vegyületek, vagy éppen saját SOD-mimetikus szubsztituens oldallánca önmagában, mégis sokkal hatékonyabbnak bizonyult az

amiodaronnal szemben-vagy egyéb vizsgált vegyületeknél- mind ischemia-reperfúzió során, mind oxidatív stresszben. A protektív hatás –minden kétséget kizáróan- az mPT gátló tulajdonság SOD-mimetikus aktivitással való kombinálásának köszönhető. A HO-3538 egy új típusú gyökfogó tulajdonságokkal rendelkező mPT inhibitor molekula, amely alapjául szolgálhat új cardioprotektív és az Amiodaronéhoz hasonló hatású gyógyszerek kifejlesztéséhez.

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sümegi Balázs professzor Úrnak és Ifj. Gallyas Ferenc docens Úrnak a támogatásukért és irányításukért.

Köszönöm Dr. Várbíró Gábor adjunktus Úrnak, valamint közvetlen munkatársaimnak: Dr. Bognár Zitának és Dr. Hantó Katalinnak; kollégáimnak, barátaimnak az együttműködést és segítségüket.

Köszönöm a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi kémiai Intézet asszisztenseinek, technikusainak; Pásztor Istvánnénak, Halász Helenának, Girán Lászlónak és Horváth Bertalannak a segítségüket és tanácsaikat, melyek jelentősen megkönnyítették munkámat. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, feleségemnek, gyerekeimnek, szüleimnek a biztatást és szeretetet, mellyel mellettem állnak.