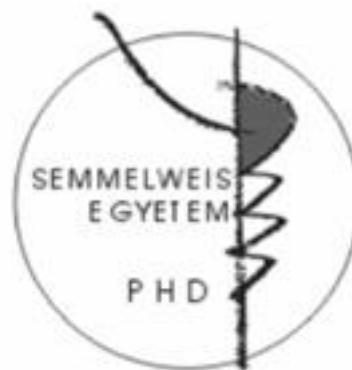


Állványfehérjék szerepe a tirozin kinázokkal működő jelpályákban

Doktori tézisek

dr. Pesti Szabolcs

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Buday László egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Csontos Csilla egyetemi docens, CSc.
Dr. Németh Tamás egyetemi tanársegéd, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Benyó Zoltán egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pál Gábor egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Balla András tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2015

Bevezetés

Állvány- és a hasonló funkcióval rendelkező kapcsoló fehérjékkel főleg a tirozin kinázokkal működő jelpályákban találkozunk.

Tirozin kinázok

A protein tirozin kinázok olyan enzimek, melyek az ATP gamma foszfát csoportját helyezik át különböző fehérjék tirozin oldalláncára foszfát észter kötés kialakulása mellett. Kinázokat két nagy csoportra lehet osztani: a receptor tirozin kinázokra és a nem receptor tirozin kinázokra.

Az Eph receptorok a tirozin kináz receptorok legnagyobb családja. Emlősökben eddig 14 Eph receptort és 9 ephrin ligandot azonosítottak. Az ephrinek sejtfelszíni ligandok, melyek szomszédos sejtek Eph receptoraival lépnek kölcsönhatásba. Az EphrinA ligandok glikozilfoszfoinozitol horgonnyal rögzülnek a membránhoz. Az EphrinB-k ezzel szemben transzmembrán proteinek. Maguk a receptorok meglehetősen konzervált extra és intracelluláris doménekkal rendelkeznek. Az Eph receptorok homo- és heterodimerizációra képesek. Ligandaktiváció hatására, a receptorok, de maguk a ligandok is oligomerizálódnak és clusterek kialakításában vesznek részt, melyek mint jelátviteli centrumok funkcionálnak. Ligand kötődés hatására mind a juxtamembrán régió, mind a tirozin kináz domén foszforilálódik, aktiválódik. Ezt nevezzük forward jelpályának. Azonban a

ligandok is közvetíthetnek jelet. Az EphrinB-k intracelluláris régiója is foszforilálódhat. Az EphrinA-k pedig integrinhez kapcsolódva okozhatnak sejt adhézióban bekövetkező változást. Ezt nevezzük reverse jelpályának.

Eph receptorok részt vesznek a szinapszis képződésben, mint a dendritikus tüskék kialakítása, átalakítása, vagy az axon vezetés. Kimutatták, hogy EphB1/B2 és B1/B2/B3 génihiányos egerekben sérül a dendritikus tüskék kialakulása.

Állvány- és kapcsoló fehérjék

Az állványfehérjék tehát olyan fehérjék, melyek multiprotein komplexek kialakításában vesznek részt, melyben különböző fehérjéket hoznak egymás fizikai közelségébe. A komplexben megnő a lokális koncentráció, ezáltal mehetnek gyorsabban végbe a reakciók. A kapcsoló fehérjék pedig azok a kisebb molekulatömegű fehérjék, melyek kettő vagy három fehérje-fehérje interakcióra alkalmas doménnel rendelkeznek.

A laborunk által régebb óta vizsgált Caskin az állványfehérjék tipikus szerkezetét mutatja. A fehérje szerkezetén látható, hogy számos fehérje-fehérje interakcióra alkalmas doménnel rendelkezik. A Caskin kapcsolódását kimutatták a LAR receptor protein tirozin foszfatázzal, a Dock-kal, mely az Nck kapcsoló fehérje *Drosophilában* előforduló homológja, a neurexin2, a synaptotagmin proteinekkel, illetve munkacsoportunk korábbi eredménye alapján az Abi2-vel.

A munkacsoportunk által kutatott Tks4 és Tks5 fehérjék is az állványfehérjék közé tartoznak. A Tks5-ről kimutatták, hogy kifejeződik az invazív tumorsejtek podoszómáiban. A Tks4 pedig az Src és az EGF receptoron keresztüli aktin citoskeleton szabályozás egy fontos állványfehérjéjévé emelkedett az elmúlt időszakban. A Tks4 egyedfejlődésben betöltött szerepére Frankter Haar szindrómát hordozó családok és gén-hiányos egerek vizsgálata mutatott rá.

Az Nck a kapcsoló fehérjék egy tipikus képviselője. A katalitikus aktivitás nélküli, 47kDa nagyságú fehérje 3 SH3 (Src-homology 3) és 1 SH2 doménből áll. Az SH3 domének prolin-gazdag régiókhoz, az SH2 domén pedig foszforilált tirozin oldalláncokhoz tud kötődni.

Az Nck szerepét kimutatták az integrin jelpályában, a T limfociták aktivációjában, az axonvezetés szabályozásában. Azt mondhatjuk, hogy az Nck-nak a citoskeleton átrendeződéssel járó szignáltranszdukcióban van jelentősége.

SH3 domén

Az SH3 domén más fehérjék prolin-gazdag szakaszait felismerni és kötni képes konzervált szerkezeti egység, melyet 1988-ban írtak le. A domén egyike a legjobban jellemzett interakcióra alkalmas fehérje moduloknak.

Az elmúlt két évtizedben számos olyan jelátviteli fehérjét azonosítottak, melyekben az SH3 domén tirozinon

foszforilálódik. Ezen vizsgálatok eredményei bebizonyították, hogy az SH3 domén hidrofób zsebében lévő konzervált tirozinok foszforilációja fontos szerepet játszhat a domén ligandkötő képességének szabályozásában. A legtöbb ismert esetben ez a szabályozás negatív, azaz a foszforiláció gyengíti az SH3 domén ligandkötő képességét.

Célkitűzések

Munkacsoportunk az elmúlt években intenzíven kutatta a Caskin1 állványfehérjét. Élesztő két-hibrid rendszerben vizsgálva sikerült több Caskin1 kötő fehérjét azonosítani. Korábban Balázs Annamária ezen lehetséges kapcsolatok közül az Abi2 Caskin1 interakciót bizonyította és térképezte fel mind *in vitro*, mind *in vivo* módszerekkel. Szerettük volna azonban a többi interakcióra képes proteinnel való kapcsolatot is megvizsgálni.

- Első lépésként a Caskin1 és az Nck adapter fehérje kapcsolatát kívántuk bizonyítani.
- További célkitűzések közé tartozott az interakció pontos feltérképezése, annak kimutatása, hogy a fehérjék mely doménjei asszociálódnak egymással.
- Terveink között szerepelt a jelátviteli út felderítése is. Olyan fehérje, fehérjék keresése, mely vagy melyek a Caskin1-hez az Nck fehérjén keresztül kötődhetnek. Korábbi eredményeink ráirányították a figyelmünket az EphB1-Nck interakcióra.
- Végző célunk így az esetleges Caskin1-Nck-EphB1 komplex létrejöttének és funkciójának az azonosítása volt.

A Caskin1 mellett a laborban kutatott másik állványfehérje családba tartozó Tks4 esetében pedig meg kívántuk vizsgálni a Frank-ter Haar szindromában Iqbal és munkatársai által leírt mutánsok expresszióját és intracelluláris lokalizációját.

Módszerek

DNS konstrukciók

A GST fúziós fehérjét E.coli baktériumokban termeltettük, majd glutation-agaróz gyöngyök segítségével tisztítottuk. A fúziós fehérjéhez kötődő proteinek azonosításához ezeket a gyöngyöket sejt-, vagy agykivonattal inkubáltuk. A fehérjék expresszióját és tisztítását SDS gélelektroforézist követő Coomassie festéssel ellenőriztük.

Biotinilált foszfopeptideket és a hozzájuk tartozó foszfospecifikus ellenanyagokat a Life Technologies céggel csináltattuk. A pontmutációkat az Agilent Technologies által forgalmazott QuickChange mutagenézis készlet segítségével hoztuk létre.

Ellenanyagok

A legtöbb antitestet kereskedelmi forrásból szereztük be. A monoklonális anti-Caskin1 ellenanyagot az AbDSerotec céggel készítettük. A foszfospecifikus poliklonális ellenanyagokat a GenScript céggel szintetizáltattuk.

Sejtvonalak, tranziens transzfekció és stimuláció

Az értekezésben bemutatott legtöbb kísérletet COS7 sejteken végeztük. Ezeket 10% magzati borjúsérumot és antibiotikumot tartalmazó DMEM-ben tartottuk fent. A különböző plazmidokkal való tranziens transzfekciót Lipofectamine reagens segítségével végeztük. Ephrin B1 stimulációhoz a sejteket 20 percig kezeltük a liganddal.

Immunprecipitáció és Western Blot

A sejteket, illetve patkány agyat Triton X-100-at és proteáz gátlókat tartalmazó pufferben tártuk fel. A kivonatból különböző antitestekkel immunprecipitáltuk a fehérjéket. A lizátumok és immunprecipitátumok fehérjéit SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével választottuk el, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk őket. A Western Blot-okat torma peroxidázhoz kapcsolt másodlagos ellenanyagokkal hívtuk elő.

Caskin SH3 doménjének tisztítása

A szerkezeti vizsgálathoz az SH3 fehérjét *E. coli*-ban expresszáltuk. Sejtfeltárást és szonikálást követően a fehérjét ÄKTAexplorer protein tisztító rendszerrel (GE Healthcare) tisztítottuk. A fehérjék tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük.

In vitro foszforiláció

A kináz reakció során a foszforilációt a reakcióelegyhez adott jéghideg ATP-vel indítottuk. A kontroll elegy nem tartalmazott receptort. Az inkubációt asztali rázón végeztük 1 órán keresztül 30 °C-on. Natív gélelektroforézis céljára a foszforiláció hasonlóan történt, azzal a kivétellel, hogy az inkubáció 15 °C-on zajlott a megjelölt időpontokig.

CD spektroszkópia

A távoli és közeli UV cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumot Jasco J-720 spektropolariméterrel vettük fel,

folyamatos módban, 1 mm, vagy 1 cm útvonalhosszú kvarcküvetttel, 1 nm-es sáv szélességgel, 8 másodperces válaszütemmel és 20 nm/perces szkennelési sebességgel. A protein nélküli háttérspektrumot kivontuk a fehérjék jelenlétében felvett spektrumból.

Caskin1 SH3 doménjének 3D modellezése

A patkány Caskin1 SH3 doménjének 3D struktúráját a szabadon elérhető I-TASSER szerkezet-jósló szerverrel modelleztük.

Natív gélelektroforézis

Natív gélelektroforézis során a gél és a pufferek nem tartalmaztak sem SDS-t, sem redukálószeret. A Caskin1 SH3 doménjének az ExPASy bioinformatikai portál alapján becsült izoelektromos pontja 6.67. Így a natív fehérje a pH 8.8-as Tris pufferben negatív töltésű, ezért a pozitív pólus felé vándorol.

Immunfluoreszcens festés

A Tks4 és mutánsainak sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálatához COS7 sejteket fedőlemezekre ültettünk ki. A sejteket a megfelelő transzfekciók és kezelések után monoklonális anti- α -tubulin és poliklonális anti-V5, majd másodlagos Alexa Fluor 488 anti-egér és Alexa Fluor 546 anti-nyúl ellenanyagok követték. A sejtmagokat DAPI-val festettük. A képeket inverz konfokális mikroszkóppal készítettük.

Eredmények

Első lépésként endogén Caskin1-et immunprecipitáltunk monoklonális anti-Caskin1 ellenanyaggal patkány agykivonatból. Sikerült kimutatni, hogy agykivonatban az endogén Caskin1 lehozza magával az Nck fehérjét. Más rendszerben is megvizsgáltuk a két fehérje interakcióját. V5 címkével jelzett Caskin1-et és GFP jelölt Nck-t expresszáltunk különböző kombinációkban COS7 sejtekben. Megfigyeltük, hogy a mindkét fehérjét koexpresszáló sejtekben a Caskin1 képes megkötni az Nck-t.

Következő lépésként pontosítani szeretnénk volna a két fehérje interakcióját, megvizsgálni, hogy mely domének kapcsolódnak. A GST precipitációs mérés során azt találtuk, hogy csak azokban a konstrukciókban, ahol az Nck mindhárom SH3 doménje megtalálható volt kapcsolódott a Caskin1 az Nck-hoz.

Az irodalomban ismert, hogy az EphB1 tirozin kináz receptorhoz kötődhet az Nck. Miután sikerült kimutatnunk a Caskin1 Nck kapcsolatot, feltételeztük, hogy az Nck kötő partnerként szolgálhat mind a Caskin1, mind az EphB1 számára, és ezáltal egymás fizikai közelségébe, interakcióra alkalmas helyzetbe hozza őket.

A feltevés megválaszolására először EphB1-et tranziensen expresszáló COS7 sejteket stimuláltunk a receptort aktiváló Ephrin B1 liganddal. Meglepve tapasztaltuk, hogy EphB1

expresszió hatására már önmagában is aktiválódik, tirozin foszforilálódik a receptor, és ligand hozzáadása nem fokozta a foszforiláció mértékét. Ezt követően mi is kimutattuk az EphB1-Nck komplexet. Végül a három fehérje (EphB1/Nck/Caskin) által alkotott komplex létezését kívántuk bizonyítani. A kísérletben V5-Caskinnal, illetve V5-Caskinnal és HA-EphB1-gyel kotranszfectált COS7 sejt kivonatot használtunk. Sikeresen kimutatni, hogy a Caskin1 lehozza magával mind az Nck, mind az EphB1 fehérjét azokban a sejtekben, ahol mindkét fehérjét expresszáltuk. Ezt követően Streptavidin gyantához kötött biotinilált foszfopeptidekkel is sikerült patkány agykivonatból precipitálni az Nck/Caskin1 komplexet. Így a korábbi kísérleteket is figyelembe véve kijelenthetjük, hogy a Caskin1 az Nck-n keresztül az EphB1 receptorhoz kötődik.

Feltételeztük, hogy az aktivált EphB1 receptorhoz Nck-n keresztül kötődő Caskin1 esetleg tirozinon foszforilálódhat. A kérdés megválaszolására elvégzett kísérletben azt találtuk, hogy EphB1 jelenlétében a Caskin1 állványfehérje jelentősen foszforilálódik.

Szerettük volna meghatározni a pontos foszforilációs hely(ek)et. Első körben ezért tömegspektrometriás analízist végeztünk, mely során úgy találták, hogy noha számos szerin/treonin már alap esetben foszforilálva volt, EphB1 hatására csak két új tirozin foszforilációs hely jelent meg: a Caskin1 296. és 336. tirozinja.

Meglepve tapasztaltuk, hogy mindkét tirozin az állványfehérje SH3 doménjében helyezkedik el.

Ezt követően modelleztük a foszforilált tirozinok helyzetét a Caskin SH3 doménjének 3D szerkezetében. A 296. tirozin az első két béta-redőt összekötő flexibilis RT loopban, a 336. tirozin a jóval kompaktabb negyedik béta-redőben foglal helyet.

Bizonyítandó a tömegspektrometria eredményét, hogy valóban a 296. és 336. tirozin foszforilálódik, újra elvégeztük a foszforilációs vizsgálatot a létrehozott különböző mutáns konstrukciókkal. Ezekben fenilalaninra mutáltuk a 296-os (Y296F), vagy a 336-os (Y336F), vagy mindkét (Y296/336F) tirozint.

Kimutattuk, hogy a korábbi kísérlethez hasonlóan a vad típusú Caskin1 EphB1 jelenlétében tirozinon foszforilálódik. A Caskin mutánsok esetében már a Y296F és Y336F konstrukciók esetében is jelentős csökkenést figyeltünk meg a foszforiláció szintjében. A legalacsonyabb foszforilációs jelet a mindkét tirozin helyett fenilalanint tartalmazó mutáns esetében láttuk. A jel itt szinte a foszforiláció nélküli állapotot mutatta.

Szerettük volna másik oldalról is megközelíteni a foszforilációs helyek vizsgálatát, ezért a két foszfortirozin ellen termeltetett ellenanyaggal is elvégeztük az előbbi kísérletet. Megfigyeltük, hogy a 296. foszfortirozin elleni ellenanyaggal a Caskin foszforilációját egyértelműen ki lehetett mutatni. Látható volt

továbbá, hogy a jel teljesen eltűnt az Y296F és Y296/336F mutáns konstrukciók esetében. Az anti-pTyr336-os foszfospecifikus ellenanyag is tisztán kimutatta a vad típusú Caskin1 esetén a foszforilációt. Itt is detektálható, hogy mind az Y336F, mind a dupla mutáns (Y296/336F) esetében jelentősen, az alap szintig csökkent a foszforilációs jel

Összefoglalva az előbbi kísérleteket kijelenthetjük, hogy a Caskin1, amikor az Nck kapcsoló fehérjén keresztül az EphB1 receptorhoz kötődik, foszforilálódik a 296. és a 336. tirozinon.

Végezetül feltérképeztük a foszforiláció hatására létrejövő szerkezeti változásokat. Tisztított, szolubilis SH3 domént állítottunk elő, melyet megfoszforiláltunk, majd újra megtisztítottuk. Az *in vitro* foszforilációs kísérletben sikerült bizonyítanunk, hogy az EphB1 receptor közvetlenül, további fehérje kinázok aktiválódása nélkül foszforilálja a Caskin1-et. A következő lépésben CD spektroszkópiával távoli UV tartományban vizsgáltuk meg a tisztított Caskin1 foszforilált és foszforilálatlan SH3 doménjét. Irodalomból ismert, hogy a távoli UV tartományban felvett CD spektrummal a fehérjék másodlagos szerkezetének megváltozását lehet kimutatni. A kísérletben azt találtuk, hogy nincs különbség a foszforilált és foszforilálatlan SH3 domének ellipticitásában. Mindez arra utal, hogy a másodlagos térszerkezet nem változik meg a foszforiláció hatására. Közeli UV tartományban is megvizsgáltuk a fehérjénket,

mellyel a fehérjék harmadlagos, negyedleges szerkezetében bekövetkező változásokat lehet kimutatni. Ebben az esetben jelentős különbség mutatkozik foszforiláció hatására a minták között. Úgy tűnik, hogy a tirozinok körüli kémiai környezet érzékeny a foszforilációra, következésképpen az SH3 domén harmadlagos szerkezete megváltozik a foszforilált tirozinok körül. Felmerül azonban annak a lehetősége, hogy a létrehozott SH3 konstrukció dimerizálódik, és az így kialakuló negyedleges szerkezetet tudjuk a közeli UV tartományban kimutatni. Hogy kizárjuk ennek a lehetőségét idő-kinetikát is alkalmazva megfoszforiláltuk a mintáinkat, majd natív gélelektroforézist végeztünk. Kimutattuk, hogy a tirozinon foszforilált Caskin SH3 domén gyorsabban vándorol, mint a nem foszforilált fehérje. A gyorsabb vándorlást a foszfátcsoportok miatt megjelenő negatív töltéstöbbletnek tulajdoníthatjuk. Végeredményként kijelenthetjük, hogy valóban a harmadlagos szerkezet változik meg foszforiláció hatására.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a Caskin1 mellett a laborban kutatott másik állványfehérje, a Tks4 esetében milyen sejten belüli expressziót és lokalizációt mutatnak a Frank-ter Haar szindromában Iqbal és munkatársai által leírt R43W, illetve a csonkolt fehérjéket (Tks41-48 és Tks41-341) eredményező mutánsok. Kimutattuk, hogy a Tks4¹⁻⁴⁸ nem fejeződik ki a sejtekben. A másik két mutáns fehérje pedig abnormális sejten

belüli lokalizációt mutat. A Tks4^{R43W} mutáns fehérje egy része az aggresszómába, míg a Tks4¹⁻³⁴¹ a sejtmagba lokalizálódik.

Következtetések

A fent bemutatott eredmények tézisszerűen a következőképpen foglalhatóak össze:

1. Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a Caskin1 kötődik az Nck kapcsoló fehérjéhez.
2. Kimutattuk továbbá, hogy a Caskin1 az Nck SH3 doménjeihez kapcsolódik.
3. Sikerült kimutatnunk az EphB1-Nck-Caskin1 komplexet.
4. A Caskin1 és az EphB1 receptor molekuláris közelségét az is bizonyítja, hogy a tirozin kináz foszforilálja *in vivo* az állványfehérjét.
5. A két potenciális foszforilációs hely a Caskin1 SH3 doménjében található 296-os és 336-os tirozin.
6. Foszforiláció hatására a fehérje harmadlagos szerkezete átalakul a foszfortirozinok körül.
7. Kimutattuk továbbá, hogy a Tks4 állványfehérje Tks4^{R43W} és Tks¹⁻³⁴¹ mutánsai rendellenes sejten belüli elhelyezkedést mutatnak.

A jelátviteli út modellje tehát a következő: Az EphrinB ligand által aktivált EphB1 receptor 594. foszfortirozinjához kötődik az Nck kapcsoló fehérje. Az Nck emellett komplexet képez a Caskin1 állványfehérjével az SH3 doménjein keresztül. A Caskin1 kihorgonyzódása az aktivált EphB1 közelébe az állványfehérje foszforilációját eredményezi az SH3 doménben található 296. és 336. tirozinon.

Az EphB1 receptorok Nck fehérjén keresztüli jelátvitele fontos szerepet játszik a dendritikus tüskék alakjának szabályozásában. Összevetve az irodalmi és a saját adatainkat valószínűsíthetjük, hogy az aktiválódott EphB1 receptorhoz kötődő Nck és Caskin1 közreműködhet a citoszkeleton átrendeződésben, és ezáltal a dendritikus tüskék morfogenezisének szabályozásában.

Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Pesti S, Balázs A, Udupa R, Szabó B, Fekete A, Bögel G, Buday L. (2012) Complex formation of EphB1/Nck/Caskin1 leads to tyrosine phosphorylation and structural changes of the Caskin1 SH3 domain. *Cell Commun Signal*. 10(1):36.1-13.

Ádám C, Fekete A, Bögel G, Németh Z, Tőkési N, Ovádi J, Liliom K, Pesti S, Geiszt M, Buday L. (2015) Accumulation of the PX domain mutant Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 in aggresomes. *Cell Commun Signal*. 13:33 doi: 10.1186/s12964-015-0108-8

Az értekezés témájától független közlemény

Fekete A, Bögel G, Pesti S, Péterfi Z, Geiszt M, Buday L. (2013) EGF regulates tyrosine phosphorylation and membrane-translocation of the scaffold protein Tks5. *J Mol Signal*. 8(1):8.1-8.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik nélkül az értekezés nem születhetett volna meg.

Először is köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Buday László professzornak, aki TDK-s koromtól kezdve irányította a pályámat. Bevezetett a tudományos módszerek és gondolkodás világába, és mindenben támogatott a dolgozat elkészüléséig vezető hosszú úton.

Köszönöm a labor összes dolgozójának a segítségét. Külön szeretném megemlíteni Dr. Balázs Annamáriát és Roopesh Udupát, akik szintén a Caskin fehérjével foglalkoztak. Továbbá köszönöm Dr. Bögel Gábornak és Haidarné Solti Zitának, hogy bármilyen felmerülő probléma esetén nyugodtan fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm Szabó Beátának és Fekete Annának, az MTA TTK Enzimológiai Intézetből a rengeteg segítséget a CD spektroszkópiában és az SH3 domének tisztításában és foszforilációjában.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Mandl Józsefnek és Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak, intézetünk korábbi és jelenlegi igazgatójának, hogy lehetővé tették munkámat az Intézetben. Továbbá köszönet illeti az Intézet valamennyi dolgozóját segítségükért.

Külön köszönöm Prof. Dr. Mandl Józsefnek, a Patobiokémia PhD program vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy a Doktori Iskola hallgatója legyek.

Végezetül hálával tartozom feleségemnek, édesanyámnak, az egész családomnak, hogy biztos háttérrel nyújtottak számomra, és támogattak a legnehezebb pillanatokban is. Utolsóként köszönöm édesapámnak, hogy megtanított a kitartásra. Ezt a dolgozatot az ő emlékének ajánlom.