

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem
Multidiszciplináris Doktori Iskola

RITKA IONCSATORNA BETEGSÉGEK KLINIKAI ÉS GENETIKAI ELEMZÉSE

PhD Tézis

Dr. Borbás János

Témavezető:
Prof. Dr. Sepp Róbert

Belgyógyászati Klinika - Kardiológiai Központ
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Szeged
2024

A tézissel közvetlenül kapcsolatos publikációk

1. Sepp R, Hategan L, Bácsi A, Cseklye J, Környei L, **Borbás J**, Széll M, Forster T, Nagy I, Hegedűs Z. Timothy syndrome 1 genotype without syndactyly and major extracardiac manifestations. *Am J Med Genet A* 2017; 173(3):784-789. doi: 10.1002/ajmg.a.38084. (Q2, IF: 2.264)
2. **Borbás J**, Vámos M, Hategan L, Hanák L, Farkas N, Szakács Zs, Csupor D, Tél B, Kupó P, Csányi B, Nagy V, Komócsi A, Habon T, Hegyi P, Sepp R. Geno- and phenotypic characteristics and clinical outcomes of *CACNA1C* gene mutation associated Timothy syndrome, "cardiac only" Timothy syndrome and isolated long QT syndrome 8: A systematic review. *Front Cardiovasc Med* 2022; 9:1021009. doi: 10.3389/fcvm.2022.1021009. (Q1, IF: 3,6)
3. Déri Sz,* **Borbás J**,* Hartai T, Hategan L, Csányi B, Visnyovszki Á, Madácsy T, Maléth J, Hegedűs Z, Nagy I, Arora R, Labro AJ, Környei L, Varró A, Sepp R, Ördög B. Impaired cytoplasmic domain interactions cause co-assembly defect and loss of function in the p.Glu293Lys *KNCJ2* variant isolated from an Andersen-Tawil Syndrome patient. *Cardiovasc Res* 2021; 117:1923–1934. doi:10.1093/cvr/cvaa249 (D1, IF: 13,081). *Shared first authorship.
4. **Borbás J**, Takács H, Környei L, Katona M, Ördög B. Andersen–Tawil-szindrómás betegek EKG-jellegzetességeinek kvalitatív és kvantitatív elemzése. *Cardiologia Hungarica* 2019; 49: 344–348. doi: 10.26430/CHUNGARICA.2019.49.5.344
5. **Borbás J**, Erdős B, Katona M, Környei L, Ördög B. Congenitalis dysmorfhiával, kamrai aritmiával és periodikus paralízissal járó ioncsatorna-betegség: Andersen-Tawil-szindróma. *Cardiologia Hungarica* 2019; 49: 358–364. doi: 10.26430/CHUNGARICA.2019.49.5.358

1. Bevezetés

1.1 Ioncsatorna betegségek

Az ioncsatorna betegségek egy sokszínű betegség csoport, amelyek az ioncsatorna alegységek vagy azokhoz kapcsolódó fehérjék működési zavarából erednek. Ezek a rendellenességek genetikai eredetűek lehetnek, vagy egyéb egészségügyi állapotok, farmakológiai szerek vagy környezeti toxinok révén alakulnak ki.

A szívizomsejtek specializált ingerelhető sejtek, amelyek képesek akciós potenciált (AP), egy elektromos jelet létrehozni és továbbítani, amely végül a szívizom összehúzódását eredményezi. A szív ioncsatorna betegségek olyan gének mutációiból származnak (akár funkcióvesztés, akár funkciónyerés formájában), amelyek különböző ioncsatorna membránokhoz kapcsolódnak.

Míg néhány ioncsatorna betegség, mint például a hosszú QT-szindróma (LQTS), a rövid QT-szindróma (SQTS), a Brugada-szindróma (BS) vagy a katekolaminerg polimorf kamrai tachycardia (CPVT) tünetei elsősorban a szívre korlátozódnak, több olyan ioncsatorna betegség is létezik, mint például az Andersen-Tawil szindróma (ATS) vagy

a Timothy-szindróma (TS), ahol a tünetek több szervet érintenek, és az alapul szolgáló mutáció multisisztémás rendellenességet okozhat. Az Andersen-Tawil szindrómát, amelyet a *KCNJ2* gén mutációi okoznak, és a Timothy-szindrómát, amelyet a *CACNA1C* gén mutációi okoznak, olyan ritka állapotoknak tekintik, amelyek több szervrendszert érintenek, és kardiális manifesztációkat is magukban foglalnak, beleértve a QT-megnyúlást és a kamrai aritmiákat.

1.2. Andersen-Tawil szindróma

Az Andersen-Tawil szindróma (ATS) egy autoszomális domináns, multisisztémás rendellenesség, amelyet időszakos paralízis, kamrai aritmiák, valamint jellegzetes arc- és csontdeformitások jellemeznek. Emellett hypoplasztikus veséket és billentyűbetegségeket is leírtak ATS-sel összefüggésben. A rendellenességre jellemző a jelentős intrafamilialis variabilitás és az inkomplett penetrancia miatt.

Az ATS kardiális manifesztációi közül a leggyakoribbak az elektrokardiogram (EKG) rendellenességek. Néhány beteg EKG-ja enyhe QTc-megnyúlást mutat, azonban a legjellemzőbb tulajdonságok a QU intervallum jelentős meghosszabbodása és a kifejezett U hullámok jelenléte. Ezek az U hullámok általában szélesek és magasak, ez leginkább a precordiális V2-3 elvezetésekben látható. Az ATS-ben megfigyelt aritmiák közé tartoznak a gyakori kamrai extraszisztolék, a bidirekcionális couplet-ek és a polimorf kamrai tachycardiák (VT).

A *KCNJ2* gén mutációi általában módosítják a káliumcsatorna szerkezetét és működését, vagy megakadályozzák, hogy a csatorna megfelelően illeszkedjen a sejtmembránhoz. Sok mutáció rontja a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP2) molekula csatornához való kötődését, amely kulcsfontosságú a csatorna működésének szabályozásában. Jelenleg 103 mutáció ismert az irodalomban, ami jelentős növekedés az elmúlt néhány évhez képest. Az esetek többsége missense vagy nonsense mutációkat tartalmaz, és csak néhány kis deléció-t figyeltek meg.

1.3. Timothy szindróma

A Timothy-szindróma (TS) egy multisisztémás rendellenesség, amelyet szindaktília (ujjak összenövése) és szívritmuszavarok jellemeznek, amelyek végül hirtelen szívhalálhoz vezethetnek. A TS gyakran társul kognitív, neurológiai és kraniofaciális rendellenességekkel, valamint immunhiánnyal. Ez egy különálló, súlyos és ritka formája a hosszú QT-szindrómának (LQTS), amelyet LQT8-nak neveznek, mivel a *CACNA1C* génhez kapcsolódik, amely a LQTS-hez társul. Ez a gén kódolja a Cav1.2 L-típusú kalciumcsatornát. A Timothy-szindróma klinikai megnyilvánulásai több szervrendszert érintenek, beleértve a bőrt, a szívet, az immunrendszert, az agyat, a szemeket és a fogakat. A TS-es betegek EKG-ján meghosszabbodott QT-intervallum látszódhat, valamint bradikardia, atrioventrikuláris blokk, torsades de pointes kamrai tachycardia és kamrafibrilláció alakulhat ki.

A *CACNA1C* gént érintő mutációk számos klinikai megnyilvánulása lehet. Ezek közé tartozik a tipikus Timothy-szindróma (1-es típus), amelyet QTc-megnyúlás, AV-blokk, veleszületett szívhibák, arcdismorfizmusok, epizodikus hipoglikémia és neurológiai

tünetek, beleértve a fejlődési késéseket, esetleges autizmust, görcsrohamokat és intellektuális fogyatékoság jellemeznek. Az atípusos Timothy-szindróma (2-es típusú) betegeinél nincs syndactylia, de a betegség számos egyéb multiszisztémás megnyilvánulását hordozzák. A *CACNA1C* gén mutációinak további klinikai megnyilvánulása a "csak kardiális" Timothy-szindróma (COTS), amelyet QTc-megnyúlás és veleszületett szívhibák jellemeznek extracardialis megnyilvánulások nélkül. Az említett fenotípusokkal ellentétben, néhány *CACNA1C* gén mutációja izolált QTc-megnyúlással jár (izolált hosszú QT-szindróma 8, LQT8), amely csak QTc-megnyúlást mutat további szív- vagy extracardialis megnyilvánulások nélkül. Mivel a *CACNA1C* gén volt a nyolcadik gén, amelyről bebizonyosodott, hogy QTc-megnyúlást okoz, történelmileg LQT8-nak nevezték, de ma már egyértelmű különbséget tesznek a több szervrendszert érintő Timothy-szindróma és az izolált LQT8 között.

2. CÉLOK

PhD munkám során a következő célokat tűztem ki:

1. A Timothy-szindrómát okozó mutációk felderítése magyar ioncsatorna betegek körében;
2. A *CACNA1C* génmutációval társuló Timothy-szindróma, „csak kardiális” Timothy-szindróma és izolált hosszú QT-szindróma 8 genotípusos és fenotípusos jellemzőinek, valamint klinikai kimeneteleinek értékelése szisztematikus irodalomkutatás segítségével;
3. Új és ismert *KCNJ2* génmutációk azonosítása magyar Andersen-Tawil szindrómás betegeknél;
4. Az Andersen-Tawil szindrómás betegek EKG-jellemzőinek kvalitatív és kvantitatív elemzése.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek

A PhD dolgozatban bemutatott különböző kutatási projektek páciensei a Szegedi Tudományegyetem Kardiológiai Központjának belső adatbázisából kerültek kiválasztásra, amely az ioncsatorna betegséggel küzdő páciensek klinikai adatait rögzíti. Az adatbázis (CardioAdmin) részletei korábban már publikálásra kerültek. A regiszter egy egyközpontú, megfigyeléses adatbázis, amely az ioncsatorna betegséggel diagnosztizált, kezelt és követett betegek adatait gyűjti a Szegedi Tudományegyetem Kardiológiai Központjának fekvő- vagy járóbeteg osztályain.

3.1.1. A *CACNA1C* gén mutációinak szűrése egy feltételezett egyes típusú Timothy-szindrómás beteg esetében

Egy ritka, 2:1 AV-blokkal járó hosszú QT-szindrómás esetet a Szegedi Tudományegyetem Kardiológiai Központjába irányítottak országos együttműködés keretében. A fiú beteg egy egészséges, 31 éves nő és 31 éves férfi második gyermekeként született, mindkettő kaukázusi származású. Rokoni házasságra nem volt

utalás. A családi anamnézis negatív volt korai hirtelen szívhalál, ritmuszavarok, szindaktília, arcdysmorphismus vagy autizmus tekintetében. A terhesség komplikációmentes volt. A 37. gesztációs héten intermittáló magzati bradikardiát (72 bpm) észleltek, de a baba a 38. héten normál szüléssel született, Apgar értékei 9 és 10 voltak. Születés után a babának 2:1 atrioventricularis (AV) vezetése és meghosszabbodott QTc-intervalluma volt, amit propranolol és mexiletin kezelésével stabilizáltak, megoldva az AV vezetési problémát is. Korai echokardiográfia során nyitott foramen ovalét és enyhén tágult jobb kamrát mutattak ki, más jelentős szívhibát nem találtak. A baba normálisan fejlődött, 7,5 hónaposan segítség nélkül ült, 12 hónaposan pedig önállóan járt, autizmus vagy gyakori fertőzések jelei nélkül. Kétéves korában egy hipoglikémiás epizód miatt kórházi kezelésre szorult, de jelenleg 3 éves, egészséges, normálisan fejlődik és segítség nélkül jár óvodába.

3.1.2. A *CACNA1C* génmutációval társuló Timothy-szindróma, „csak kardiális” Timothy-szindróma és izolált hosszú QT-szindróma 8 genotípusos és fenotípusos jellemzőinek, valamint klinikai kimeneteleinek értékelése szisztematikus irodalmi áttekintés kapcsán

Átfogó irodalomkutatást végeztünk a MEDLINE (PubMed-en keresztül), Embase, Web of Science és Scopus adatbázisokban 2004 és 2019 között, a *CACNA1C* gén mutációival érintett Timothy-szindrómás vagy izolált hosszú QT-szindróma 8 (LQT8) betegekről szóló teljes szövegű publikációkra fókuszálva. A mozaik betegek jelentéseinek kizárása után összesen 134 beteget azonosítottunk. A legtöbb publikáció egy eset adatait közölte, míg 16 tanulmány több beteg/család genotípusos és klinikai adatait összegzi.

Mivel a genotípusok és fenotípusok között jelentős átfedés volt, összehasonlító csoportokat határoztunk meg mind a genotípus, mind a fenotípus alapján. A 134 beteg közül 85 volt index beteg, és 49 további családtag. A 85 index beteg közül 59-en szenvedtek TS-ben, 6-an COTS-ban és 20-an izolált LQT8-ban. Az egész betegpopulációban (index betegek és hozzátartozók) 60 beteg volt TS-es, 15 beteg COTS-os és 59 beteg izolált LQT8-os.

3.1.3. A *KCNJ2* gén mutációinak szűrése feltételezett Andersen-Tawil szindrómás betegek esetében

A feltételezett Andersen-Tawil szindrómás betegeket ioncsatorna beteg adatbázisunkból választottuk ki az irodalomban közölt javasolt klinikai kritériumok alapján. Hét beteg felelt meg az előre meghatározott kritériumoknak (betegek L5.0, L49.0, L84.0, L111.0, L114.0, L131.0, L154.0). A diagnózis idején az életkor átlagosan 12 ± 7 év volt. A probandek között hat nő és egy férfi volt. Három betegnél jellemzően periódikus paralízis volt megfigyelhető, míg egy további betegnél izomgyengeség jelentkezett. Öt esetben diszmorfikus jellemzőket (mikrognáthia, hipertelorizmus, alacsonyan álló fülek, alacsony termet) észleltünk. Syndactyilia vagy klinodactyilia nem fordult elő a betegeknél. Minden esetben gyakori korai kamrai ütéseket (PVB-eket) figyeltek meg, míg négy esetben nem tartós kamrai tachycardiát (NSVT) regisztráltak, mindegyik bidirekcionális formában. Három probandnál abortált szívhalál történt 24, 38 és 20 éves korban, ami implantálható kardioverter defibrillátor (ICD) beültetését

indokolta. A gyógyszeres kezelés kapcsán béta-blokkolót alkalmaztak hat esetben, és flekainidet három esetben. Az L84.0 betegnél a *KCNJ2* gében a p.Val302del mutációt találtuk, ez egy új variáns. Az L114.0 betegnél a *KCNJ2* p.Glu293Lys mutációt azonosítottuk, a mutáció celluláris elektrofiziológiai elemzésekor új patofiziológiai mechanizmust mutattunk be.

3.2 Módszerek

3.2.1. A *CACNA1C* gén mutációinak szűrése egy feltételezett egyes típusú Timothy-szindrómás beteg esetében

A 13 LQT-t okozó gén kódoló szekvenciáit és exon-intron határait új generációs szekvenálással elemeztük az Agilent SureSelect technológia segítségével, egyedi tervezésű 120-mer RNS bait alkalmazásával, amelyek a target régióra specifikusak (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Egyesült Államok). A célzott újraszekvenálást egy SOLiD 5500xl rendszerrel (Life Technologies, Grand Island, NY, Egyesült Államok) végeztük. A célzott újraszekvenálással azonosított variánsokat standard kapilláris szekvenálással validáltuk, egyedi tervezésű primerek használatával.

A SOLiD reakciók mappingjét a Genomic Workbench 7.0.3 (CLC Bio) verziója végezte, az emberi genom hg19 összeállítását referenciaként használva. A variánsok detektálása és annotálása ugyanazon szoftverrel történt. Az aminosavváltozások funkcionális hatását, amelyeket missense mutációk okoztak, a SIFT és PROVEAN programokkal prediktáltuk.

Az azonosított variánsokat a 2015-ben az Amerikai Orvosi Genetikai és Genomikai Kollégium (ACMG) és a Molekuláris Patológiai Társaság (AMP) által kiadott szekvencia variánsok értelmezésére vonatkozó szabványok alapján értékelték, és benignus (B), valószínűleg benignus (LB), ismeretlen jelentőségű variáns (VUS), valószínűleg patogén (LP) és patogén (P) kategóriákba soroltuk. A variánsokat a CardioClassifier segítségével elemeztük. Új variánsok esetében, amelyek nem rendelkeztek ClinVar bejegyzéssel és amelyeket a CardioClassifier nem fedett le, a Varsome (<https://varsome.com/>) vagy a Franklin online értelmezési programokat használtuk.

3.2.2. A *CACNA1C* génmutációval társuló Timothy-szindróma, „csak kardiális” Timothy-szindróma és izolált hosszú QT-szindróma 8 genotípusos és fenotípusos jellemzőinek, valamint klinikai kimeneteleinek értékelése szisztematikus irodalmi áttekintés révén

Ez a szisztematikus irodalmi áttekintés a szisztematikus áttekintések és meta-analízisek jelentésére vonatkozó PRISMA nyilatkozatnak megfelelően került jelentésre. Az előre meghatározott áttekintési protokollunkat a PROSPERO adatbázisban publikáltuk, a CRD42020184737 regisztrációs számmal.

Átfogó keresést végeztünk a MEDLINE (PubMed-en keresztül), Embase, Web of Science és Scopus adatbázisokban 2004 és 2019 között, a *CACNA1C* gén mutációival érintett Timothy-szindrómás vagy izolált hosszú QT-szindróma 8 (LQT8) betegekről szóló teljes szövegű publikációkra fókuszálva. A bevonásra érdemes tanulmányokat a

következő keresési lekérdezés teljes szöveges keresésével azonosítottuk: "Timothy syndrome" OR ("LQT8 OR *CACNA1C*").

A szisztematikus áttekintés bevonási kritériumai a következők voltak: 1) Adatok jelentése dokumentált *CACNA1C* gén mutációval rendelkező betegek és/vagy hozzátartozók esetében angol nyelven; 2) Az eset részletes geno- és/vagy fenotípusos jellemzőinek leírása; 3) Adatok jelentése klinikai adatokról.

A mozaik betegekről szóló jelentések kizárása után összesen 34 publikációt azonosítottunk, amelyek 134 beteg adatait tartalmazzák.

3.2.3. A *KCNJ2* gén molekuláris genetikai elemzése

A *KCNJ2* gén genetikai elemzését a 3.2.1 pontban részletezték szerint végeztük. A nukleotid- és aminosav-változásokat az Ensembl adatbázis (85-ös kiadás) alapján jelentettük, a *KCNJ2* referenciaként a RefSeqGene LRG_328 szekvenciát használva.

3.2.4. Genetikailag igazolt Andersen-Tawil szindrómás betegek EKG-jellemzőinek elemzése

Az ATS és LQTS betegek klinikai értékelése során standard nyugalmi 12-elvezetéses EKG-felvételeket készítettünk. A kvalitatív rendellenességek között a kamrai extraszisztolék (VES)/bigeminia, valamint a couplet-ek és az NSVT (nem tartós kamrai tachycardia) jelenlétét értékeltük. A kvantitatív EKG-paraméterek közé tartozott a korrigált QT (QTc) és QU (QUc) intervallum, az U-hullám hossza és az U-hullám amplitúdója, amelyeket a V2 vagy V3 elvezetésben mértünk. A szívfrekvencia korrekcióját a Bazett-formula alkalmazásával végeztük. Az adatokat kor- és nem szerinti illesztett LQTS-es kontroll betegekkkel hasonlítottuk össze.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A Timothy-szindrómát okozó mutációk azonosítása magyar ioncsatorna betegségeiben szenvedő betegek körében

Három különböző heterozigóta genetikai variánst azonosítottunk három génben célzott újraszekvenálással, új generációs szekvenálás segítségével: p.Gly406Arg (c.1216G>A, rs79891110) a *CACNA1C* gén 8A exonában; p.Tyr94Cys (c.281A>G, rs781717051) a *KCNQ1* gén 1. exonában; és p.Ile3252Thr (c.9755T>C, rs36210417) az *ANK2* gén 37. exonában. Mindhárom variánst korábban már jelentették. A *KCNQ1* p.Tyr94Cys variánst a PROVEAN károsnak, a SIFT pedig toleránsnak jósolta, a ClinVar nem jelentette, és a CardioClassifier VUS-ként (ismeretlen jelentőségű variáns) osztályozta. Az *ANK2* p.Ile3252Thr variánst mindkét predikciós módszer semlegesnek/toleránsnak jósolta, és a ClinVar benignus/valószínűleg benignus variánsként annotálta.

Azonban a *CACNA1C* gén 8A exonában azonosított p.Gly406Arg variánst, amelyet a ClinVar patogénként osztályozott, a Timothy-szindróma 1 okozó mutációjának tekintették, és ezért patogénnek minősítették. Bár a *CACNA1C* gén 8 és 8A exonja közötti szekvencia homológia magas, számos „exon specifikus” nukleotid jelenléte lehetővé tette a két exon megkülönböztetését. A *CACNA1C* gén 8 és 8A exonjának minden elérhető publikált szekvenciájával való összehasonlítás bebizonyította, hogy a

betegünk valóban a *CACNA1C* gén 8A exonját érintő p.Gly406Arg variánst hordozta. A *CACNA1C* p.Gly406Arg variáns jelen volt az index beteg szájnyalakártya-, uroepithel-, és hajhagyma sejtekből kivont DNS-mintájában is. A mutáns nukleotid csúcs magassága hasonló volt a különböző mintákban, és megegyezett a normál nukleotid csúcs magasságával.

4.2. A *CACNA1C* génmutációval társuló Timothy-szindróma, „csak kardiális” Timothy-szindróma és izolált hosszú QT-szindróma 8 genotípusos és fenotípusos jellemzőinek, valamint klinikai kimeneteleinek értékelése

Összesen 33 *CACNA1C* mutációt azonosítottunk a jelentésekből. Huszonnyolc mutáció (85%) kapott patogén (P), valószínűleg patogén (LP) vagy ismeretlen jelentőségű variáns (VUS) értékelést, amelyek inkább a P/LP irányába hajlottak, akár a ClinVar, akár a Varsome szerint. Általánosságban a ClinVar adatok száma alacsony volt (1–4 adat). Csak öt mutáció (p.Ala28Thr, p.Met456Ile, p.Gly1783Cys, p.Arg1906Gln, p.Gly1911Arg) kapott benignus (B), valószínűleg benignus (LB) vagy VUS értékelést.

4.2.2. A Timothy-szindróma különböző alcsoportjainak meghatározása érdekében a betegcsoportok összehasonlítása

4.2.2.1. A Timothy-szindróma különböző alcsoportjainak összehasonlítása, amelyek genotípus alapján kerültek meghatározásra (8A exon p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegek vs. 8 exon p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegek; vs. 8 exon p.Gly406Arg/p.Gly402Ser mutációval rendelkező betegek; vs. minden 8 exon mutációval rendelkező beteg)

A demográfiai adatok, klinikai és EKG-megnyilvánulások, valamint kimenetelek összehasonlítása során csak a syndactylia volt szignifikánsan gyakoribb az exon 8A p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegeknél az összes összehasonlításban, és a kopaszság is gyakrabban fordult elő az exon 8A p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegeknél az exon 8 p.Gly406Arg/Gly402Ser mutációval rendelkező vagy minden exon 8 mutációval rendelkező beteghez képest. Az AV blokk jelenléte is gyakoribb volt, és az életkor az első súlyos szív-érrendszeri eseménynél (MACE) alacsonyabb volt az exon 8A p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegeknél az összes exon 8 mutációval rendelkező beteghez képest. Ezenkívül az exon 8A p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegeknél szignifikánsan fiatalabb korban diagnosztizálták a betegséget (medián 0 vs. 32 hónap; $p=0,019$), és több beteget diagnosztizáltak az életük első évében (89 vs. 44%; $p=0,009$). Jelentős QTc-megnyúlás (>500 ms) volt jelen minden betegnél, kivéve két exon 8 mutációval rendelkező beteget. A QTc-megnyúlás mértéke (maximális QTc) hasonló volt a csoportokban (medián ≥ 600 ms mindegyik csoportban). Nem volt különbség a pacemaker/ICD beültetés vagy a bal oldali cervikális szimpathektómia alkalmazásában. A súlyos szív-érrendszeri események (MACE) aránya magas volt (67–83%), de nem volt különbség a csoportok között.

4.2.2.2. A Timothy-szindróma különböző fenotípusai alapján meghatározott alcsoportjainak összehasonlítása (Timothy-szindrómák syndactyliával vagy syndactylia nélkül)

Csak a kopaszság volt gyakoribb, és a súlyos szív-érrendszeri események (MACE) bekövetkezésének életkora volt alacsonyabb a syndactyliával rendelkező Timothy-szindrómás betegekénél. A QTc-megnyúlás mértéke nagyobb volt (medián ≥ 600 ms mindkét csoportban), és a MACE aránya magas volt (68–71%), de statisztikailag nem mutatott különbséget.

4.2.3. A CACNA1C génnel társított betegségek különböző formáit meghatározó betegcsoportok összehasonlítása

4.2.3.1. A CACNA1C génnel társított betegségek különböző formáinak összehasonlítása, genotípus alapján meghatározva (8/8A exon CACNA1C mutációval rendelkező betegek vs. nem 8/8A exon CACNA1C mutációval rendelkező betegek)

A CACNA1C gén 8/8A exonjában mutációval rendelkező betegek jelentősen fiatalabbak voltak a diagnózis idején, és magasabb százaléknál diagnosztizáltak a betegséget születéskor vagy az élet első évében. A 8/8A exon mutációval társult fenotípus túlnyomórészt TS volt 49 betegnél (96%), COTS 1 betegnél (2%) és izolált LQT8 2 betegnél (2%), míg a nem 8/8A exon mutációval rendelkező betegekénél TS volt 10 betegnél (29%), COTS 5 betegnél (15%) és izolált LQT8 18 betegnél (56%) ($p < 0,001$). Az extracardialis megnyilvánulások jelentősen gyakoribbak voltak a 8/8A exon mutációval rendelkező betegekénél (94 vs. 32%; $p < 0,001$). Mivel a TS volt a domináns fenotípus a 8/8A exon mutációval rendelkező betegekénél, a TS fő fenotípusos jellemzői is szignifikánsan gyakoribbak voltak ezeknél a betegekénél. A QTc-megnyúlás minden 8/8A exon mutációval rendelkező betegnél jelen volt (52 beteg), míg a nem 8/8A exon mutációval rendelkező betegekénél csak 79%-ban ($p = 0,0025$). A QTc-megnyúlás mértéke (maximális QTc) sokkal kifejezettebb volt a 8/8A exon mutációval rendelkező betegekénél (medián 606 vs. 498 ms; $p < 0,0001$), és a > 500 ms QTc-megnyúlással rendelkező betegek aránya is sokkal magasabb volt (92 vs. 36%; $p < 0,001$). AV blokkot is szignifikánsan több esetben figyeltek meg a 8/8A exon mutációval rendelkező betegekénél (74 vs. 33%; $p = 0,002$). A pacemaker/ICD beültetés vagy a bal oldali cervikális szimpathektómia alkalmazásában nem volt különbség. Az eredmények tekintetében jelentős különbség mutatkozott, mivel a 8/8A exon mutációval rendelkező betegek sokkal nagyobb arányban haltak meg (33 vs. 9%; $p = 0,017$) vagy tapasztaltak súlyos szív-érrendszeri eseményeket (MACE) (71 vs. 34%; $p = 0,001$).

4.2.3.2. A CACNA1C génnel társított betegségek különböző formáinak összehasonlítása fenotípus alapján meghatározva (Timothy-szindrómás betegek vs. „csak kardiális” Timothy-szindróma vs. izolált LQT8)

A TS-es betegek jelentősen fiatalabbak voltak a diagnózis idején, mint a COTS vagy izolált LQT8 betegek (medián 1 hónap vs. 180 hónap vs. 174 hónap; $p < 0,001$). Ezen kívül, jelentősen több TS-es beteget diagnosztizáltak születéskor vagy az életük első

évében. A QTc-megnyúlás mértéke sokkal kifejezettebb volt a TS-es betegek esetében, mint a COTS vagy izolált LQT8 betegek esetében (medián 603 ms vs. 490 ms vs. 480 ms; $p < 0,001$), és a >500 ms QTc-megnyúlással rendelkező betegek aránya is sokkal magasabb volt (94% vs. 17% vs. 20%; $p < 0,001$). Nem volt szignifikáns különbség a PM/ICD/AED beültetés vagy a bal oldali cervikális szimpathektómia alkalmazása tekintetében a csoportok között. Az eredmények tekintetében jelentős különbség mutatkozott, mivel sokkal több TS-es beteg halt meg, mint a COTS vagy izolált LQT8 betegek (32% vs. 17% vs. 0%; $p = 0,006$), vagy tapasztalt súlyos szív-érrendszeri eseményeket (MACE) (71% vs. 33% vs. 30%; $p = 0,004$).

4.3. Ismert és új *KCNJ2* mutációk azonosítása magyar Andersen-Tawil szindrómás betegekben

4.3.1. Mutációs adatok

A *KCNJ2* génben hét mutációt azonosítottunk hét betegnél. Minden mutáció egyedi volt, mindegyik csak egy családban fordult elő.

A hét mutáció közül hat missense mutáció volt, és egy egyetlen aminosav deléció (NM_000891.3:c.905_907del, NP_000882.1:p.Val302del). Két mutáció az N-terminális részt, míg öt mutáció a fehérje C-terminális részét érintette. Három mutáció (p.Val302del, p.Glu293Lys, p.Cys54Tyr) új volt, míg a többi korábban már leírták. Minden variánst a Franklin patogénnek/valószínűleg patogénnek osztályozott.

4.4. Az EKG-jellemzők kvalitatív és kvantitatív értékelése Andersen-Tawil szindrómás betegekben

Az életkor ($25,4 \pm 11,6$ vs. $26,0 \pm 9,3$ év; $p = 0,9249$) és a nemek eloszlása (6 nő/1 férfi vs. 6 nő/1 férfi; $p = 1,000$) tekintetében nem volt szignifikáns különbség az ATS és LQTS betegcsoportok között, mely az életkor és nem szerint illesztettünk.

ATS esetek 71%-ában (5/7) gyakori kamrai extraszisztolék (vagy bigeminia) volt jelen. Tipikus bidirekcionális extraszisztolék (ES) vagy NSVT-t figyeltek meg az ATS esetek 57%-ában (4/7). Ezeket az EKG jellemzőket egyetlen LQTS beteg esetében sem figyeltük meg.

A kvantitatív EKG paramétereket tekintve a korrigált QT-intervallum szignifikánsan rövidebb volt az ATS betegekben az LQTS betegekhez képest ($451,2$ vs. $518,4$ ms, $p < 0,04$), míg a korrigált QU-intervallum nem különbözött szignifikánsan ($575,7$ vs. $583,8$ ms, $p < 0,84$). Az ATS esetek 57%-ában (4/7) a QTc a normál tartományon belül volt (< 460 ms). Az U-hullámok szignifikánsan hosszabbak (U-hullám időtartama: $143,0$ vs. $78,5$ ms, $p < 0,004$) és magasabbak (U-hullám amplitúdója: $0,139$ vs. $0,064$ mV, $p < 0,0002$) volt az ATS betegekben.

5. DISZKUSSZIÓ

5.1. A Timothy-szindrómát okozó mutációk azonosítása magyar ioncsatorna betegségekben szenvedő betegek körében

Munkánk során beszámoltunk egy Timothy-szindróma variáns esetéről, amelyet egy TS1-specifikus *CACNA1C* exon 8A p.Gly406Arg mutáció okozott. A klinikai fenotípus jellemzői közé tartozott az újszülöttkori 2:1 AV blokk és a kifejezett QT-megnyúlás. Azonban a beteg hiányában volt sok más TS1 jellemzőnek, mint például a syndactylia, és nem voltak jelen egyéb jelentős extracardiális megnyilvánulások sem.

A syndactylia az esetek 100%-ában előfordul a *CACNA1C* exon 8A p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegeknél. Ezenkívül a syndactylia jelen van a mutáció szomatikus vagy germline mozaikos hordozóinak esetében is. Az egyik ilyen esetben közvetlenül kimutatták a *CACNA1C* exon 8A p.Gly406Arg mutáció jelenlétét a bal/jobbszár bőrminta biopsziáiban, becsült 6,5%-os mozaikizmussal. Mivel a Cav1.2 magas szinten expresszálódik a fejlődő ujjak apikai ektodermális gerinc sejtjeiben, a syndactylia vélhetően a TS-ben a Ca²⁺-indukálta sejthalál következtében alakul ki az apikai ektodermális gerincben.

Számos lehetséges magyarázat van arra, hogy miért hiányzik a syndactylia és a jelentős extracardiális megnyilvánulások a mi esetünkben. Az egyik lehetséges ok a *CACNA1C* gén 8A és 8 exonainak változó kifejeződése lehet a különböző szövetekben. Egy másik magyarázat a variáns fenotípusra a szomatikus mozaikizmus lehetséges jelenléte a betegünkben, mivel a TS1 mozaikos betegeiről szóló beszámolók részleges fenotípust írnak le, amely hasonló a miénkhez. Azonban mivel négy szövetforrásunk volt (limfociták, buccalis sejtek, uropithel sejtek, hajhagymák), és mindegyikben kimutatták a mutációt, közvetlen bizonyíték az előző magyarázatra nem áll rendelkezésre. Ennek ellenére a mozaikizmus teljesen nem zárható ki, mivel nem álltak rendelkezésre minták a TS által jellemzően érintett szövetekből (pl. agy és ujjak).

Összefoglalva, leírtunk egy Timothy-szindróma 1 genotípust syndactylia és jelentős extracardiális megnyilvánulások nélkül. Az eset tovább hangsúlyozza a Timothy-szindróma fenotípusos változatosságát. A legfontosabb, hogy rámutat arra, hogy a syndactylia hiánya nem zárja ki a Timothy-szindróma 1 genotípus jelenlétét.

5.2. A *CACNA1C* génmutációval társuló Timothy-szindróma, „csak kardiális” Timothy-szindróma és izolált hosszú QT-szindróma 8 genotípusos és fenotípusos jellemzőinek, valamint klinikai kimeneteleinek értékelése

A szisztematikus áttekintésünk a *CACNA1C* génmutációval társult Timothy-szindrómát (TS), „csak kardiális” Timothy-szindrómát (COTS) és izolált hosszú QT-szindrómát 8 (LQT8) vizsgálta, kiemelve a jelentős klinikai különbségeket közöttük. Ezek a különbségek genotípus vagy fenotípus alapján határozhatók meg. Az irodalomban vita folyik a Timothy-szindróma osztályozásáról, több javaslat is született az eredeti TS1 és TS2 jelentések óta. Egy javaslat szerint minden *CACNA1C* mutációból eredő TS fenotípust TS1-nek kellene nevezni, amíg egy másik TS betegség génjét nem fedezik fel. Egy másik javaslat szerint a TS1 és TS2 csak az exon 8A (TS1) vagy exon 8 (TS2)

p.Gly406Arg mutációval rendelkező betegeket foglalja magában, míg a többi allélt atípusos TS-nek kellene nevezni. Megállapítottuk, hogy a syndactylián vagy kopaszságon kívül nincsenek jelentős különbségek a klinikai megnyilvánulásokban vagy a kimenetekben TS1 és TS2 között. Mindkét altípus extrém QTc-megnyúlást (medián ≥ 600 ms) és magas MACE arányt mutat, ami a TS1 és TS2 közötti különbségtételt potenciálisan elavulttá teszi. Ehelyett a „klasszikus TS” (syndactyliával) és a „nem klasszikus TS” (syndactylia nélkül) használata megfelelőbb lehet.

A Timothy-szindróma jelentősen különbözik a COTS-tól és az izolált LQT8-tól, korábbi betegség kezdet, kifejezettebb QTc-megnyúlás és magasabb halálozás jellemzi. A fenotípusos különbségek képezik az alapot ezen betegség formák kategorizálásához, és áttekintésünk először mutatja be az EKG paraméterek és klinikai kimenetek közötti különbségeket. A TS-ben a QTc-megnyúlás gyakran meghaladja a 600 ms-t, míg a COTS-ban vagy LQT8-ban általában kevesebb mint 500 ms, ami magyarázza a klinikai komplikációk magasabb arányát TS-ben. Ezek az eredmények támogatják a TS, COTS és izolált LQT8 klinikai kimenetekre alapuló kategorizálását. Különbségek is megjelennek az exon 8/8A mutáció hordozói és a nem exon 8/8A mutáció hordozói között. Az exon 8/8A mutációk a TS esetek 83%-át, de csak a COTS esetek 17%-át és az izolált LQT8 esetek 10%-át teszik ki, ami fiatalabb betegség kezdetéhez, gyakoribb TS fenotípusokhoz, kifejezettebb QTc-megnyúláshoz és súlyosabb klinikai kimenetekhez vezet az exon 8/8A mutáció hordozók körében.

A TS genetikailag homogén, az exon 8 vagy 8A p.Gly406Arg mutáció felelős az esetek 70%-áért, és a 402-407 kodonokat érintő mutációk az esetek 85%-áért. A legerősebb kapcsolat az exon 8A p.Gly406Arg mutáció és a „klasszikus” TS között van, amely az esetek 93,5%-ában jelen van. A COTS és az izolált LQT8 genetikai szempontból diverzebb, az okozó mutációk a gén különböző részein találhatóak. A *CACNA1C* mutációk által okozott sejtszintű elektrofiziológiai változások önmagukban nem magyarázzák a TS, COTS és LQT8 fenotípusos különbségeit. Míg a *CACNA1C* mutációk funkcionyerés alléleket hoznak létre, amelyek meghosszabbítják a szív akciós potenciálját és a QT-intervallumot, a csatorna működési zavarának specifikus mechanizmusai mutációnként eltérőek.

A fenotípusos kifejeződés széles variációit befolyásolhatják olyan tényezők, mint a szülői vagy egyéni mozaikizmus, ahol egy „de novo” mutáció gametogenezis vagy embrionális fejlődés során alakul ki. Emellett a *CACNA1C* gén komplex transzkriptum profílja, amely számos új exont és transzkriptumot tartalmaz, arra utal, hogy különböző izoformák befolyásolhatják a fenotípusos kifejeződést. Tanulmányok azt mutatják, hogy a sejtek egy bizonyos arányú mutáns *CACNA1C* csatornát tolerálhatnak, de egy küszöbértéket meghaladva az akciós potenciálok instabillá és aritmogénné válnak. Az „repolarizációs tartalék” fogalma, ahol más repolarizáló áramok kompenzálják a sérült csatornákat, szintén szerepet játszhat. Ezek az eredmények hangsúlyozzák a TS, COTS és izolált LQT8 fenotípusos kifejeződésének összetettségét és további kutatások szükségességét a mechanizmusok teljes megértéséhez.

5.3. Ismert és új *KCNJ2* mutációk azonosítása magyar Andersen-Tawil szindrómás betegekben

Tanulmányunk során, amely magyar Andersen-Tawil szindrómás betegek csoportját vizsgálta, összesen hét különböző *KCNJ2* mutációt azonosítottunk. Ezek a mutációk a következők voltak: p.Arg218His, p.Arg312Glu, p.del302Val, p.Glu293Lys, p.Met307Ile, p.Cys54Tyr és p.Arg82Gln. Három mutáció új volt, és mindegyik csak egy családban fordult elő.

A funkcionális elemzés során kimutatásra került, hogy a p.Glu293Lys mutáció funkcióvesztést okoz és domináns-negatív hatást fejt ki a Kir2.1 áramokra, amit patch-clamp kísérletek igazoltak. Fontos megjegyezni, hogy a domináns-negatív hatást egy fiziológiailag releváns membránpotenciál tartományban (-70 és -10 mV között) figyelték meg, és az összehasonlítható volt egy jól ismert ATS1 variánssal, a p.Arg218Gln-nal. Továbbá, a Glu293 fontos szerepet játszik a Kir2.1 ioncsatorna komplexben a szubegység interakciók közvetítésében, valószínűleg fenntartva egy sóhíd hálózatot a CD-I-nél. A p.Glu293Lys variánsban a töltés megfordulása a szubegységek hibás összeépüléshez vezet a homomerikus csatornában, amelyek p.Glu293Lys szubegységekből állnak, és kapuzási rendellenességeket okoz a WT és p.Glu293Lys szubegységekből álló heteromerikus komplexekben. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a p.Glu293Lys egy új kóroki *KCNJ2* variáns az ATS1-ben, domináns-negatív hatást gyakorolva a WT allélra heterozigóta genetikai háttér mellett. Ezek az eredmények igazolják a p.Glu293Lys mutáció okozó szerepét az ATS1-ben.

A második új *KCNJ2* mutáció, a p.Val302del, az ATS teljes klinikai spektrumával társult, beleértve a periodikus paralízist, a kamrai aritmiákat és a diszmorfikus jellemzőket. A szív tünetek közé tartozott az enyhe QT-megnyúlás, kifejezett U-hullámok, gyakori korai kamrai ütések és bidirekcionális kamrai tachycardia. A mutáció funkcionális elemzése heterológ expresszióval kimutatta, hogy a p.Val302del Kir2.1 variáns normál membrántranszporttal rendelkezik. Azonban a WT és a p.Val302del Kir2.1 ko-expressziója dóziszfüggő gátló hatást mutatott a WT Kir2.1 áramokra. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a WT és a p.Val302del mutáns szubegységek együtt épülnek be a sejtmembránba, és a mutáció befolyásolja a kálium vezetőképességet és/vagy a WT/Val302del heteromerikus Kir2.1 csatornák kapuzását, erősen jelezve a p.Val302del mutáció okozó szerepét.

A harmadik új *KCNJ2* variáns, a p.Cys54Tyr funkcionális elemzésének eredményei még nem állnak rendelkezésre. Azonban az annotációs programok a variánst valószínűleg patogénként osztályozták, és egy másik, ugyanezt az aminosavat érintő variánst, a p.Cys54Phe-t patogénként jelentették a ClinVar-ban. Ezért a *KCNJ2* p.Cys54Tyr variánst valószínűleg patogénként osztályoztuk.

5.4. Az EKG-jellemzők kvalitatív és kvantitatív értékelése Andersen-Tawil szindrómás betegekben

Eredményeink azt mutatják, hogy az ATS-es betegek jellegzetes EKG-változásokat mutatnak, például gyakori kamrai extraszisztolék, bidirekcionális bigeminia vagy run-

ok. A korrigált QT-intervallum (QTc) gyakran rövidebb, és akár a normál tartományba is eshet. Az U-hullám ezeknél a betegeknél hangsúlyosabb, hosszabb és magasabb.

Klinikailag jelentős, hogy bizonyos felszíni EKG-rendellenességek és a T hullám alakja különböző LQT alcsoportokban eltérőek és alcsoportra jellemzőek lehetnek. Úgy tűnik, hogy ilyen megkülönböztető EKG-jellemzők az Andersen-Tawil szindrómában (ATS) is léteznek. Zhang és munkatársai voltak az elsők, akik az ATS-ben megfigyelt EKG-jellemzőket vizsgálták. Az általuk tanulmányozott populációban (96 ATS-beteg) a QTc-megnyúlás mértéke nem volt jelentős (20 ms), és a medián QTc érték (440 ms) a normál tartományon belül volt. Csak a betegek 17%-ának volt a QTc értéke 460 ms felett. A betegek 91%-ánál a T-U hullám morfológiája, különösen a megnagyobbodott U hullám, jellemző volt. Néhány betegnél a T hullám leszálló ága meghosszabbodott, és az U hullám bipoláris volt.

Kukla és kollégái megpróbálták standardizálni az ATS-betegek EKG-jellemzőit az ATS-betegek EKG-elemzése során megfigyelt diagnosztikai jellemzők leírásával: (a) tachycardiás ATS-betegeknél, amikor a P hullám és az U hullám "összeolvad", P-pulmonale morfológia alakul ki, és a P hullám magassága meghaladhatja a 3 mm-t; (b) figyelembe véve az U hullám jelenlétét és kizárva azt a számításokból, a betegek QTc időtartama a normál tartományon belül van; (c) a VES-t követő első szív ciklusban a T és U hullámok összeolvadhatnak, ami pseudo-LQTS morfológiát eredményez; (d) a V2-3 elvezetésekben az U hullám jelen lehet, és annak amplitúdója tachycardia esetén tovább növekedhet, ellentétben az egészséges kontrollokkal; (e) az adrenalin provokációs teszt során az U/T hullám arány változik <1-ről >1-re.

Az ATS-ben megfigyelt ritmuszavarok közül a gyakori kamrai extraszisztolék, a lehetséges bigeminia és a bidirekcionális polimorf kamrai tachycardia (VT) a legjellemzőbbek. A VT tipikusan nem tartós és viszonylag lassú, ≤ 150 /perc frekvenciájú. Bár a VT nem gyors és általában jól tolerálható, az ES és VT epizódok száma tachycardia okozta kardiomiopátiához vezethet. Fontos különbséget tenni az ATS-ben megfigyelt bidirekcionális VT és a digitális toxicitás, valamint a katekolaminerg polimorf kamrai tachycardia (CPVT) között, mivel az ATS és a CPVT prognózisa és kezelése eltérő. A két betegség genetikai teszteléssel különíthető el, mivel a legtöbb CPVT eset és az ATS esetek körülbelül 60%-a genetikai módszerekkel diagnosztizálható.

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS EREDETI MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Egy *CACNA1C* gén exon 8A p.Gly406Arg mutációt azonosítottunk, amely specifikus az egyes típusú Timothy-szindrómára, egy olyan betegnél, aki a Timothy-szindróma variáns fenotípusával rendelkezik, amelyet syndactylia és jelentős extracardiális megnyilvánulások hiánya jellemezett.

Esetünk felhívja a figyelmet a Timothy-szindróma fenotípus variánsaira. Hangsúlyozni kell, hogy a syndactylia hiánya nem zárja ki az egyes típusú Timothy-szindróma genotípus jelenlétét.

2. A *CACNA1C* génmutációval társult Timothy-szindróma, „csak kardiális” Timothy-szindróma és izolált hosszú QT-szindróma 8 genotípusos és fenotípusos jellemzőinek,

valamint klinikai kimeneteleinek értékelése során azt figyeltük meg, hogy a *CACNA1C* génmutációkhoz társuló klinikai fenotípusok fontos klinikai különbségeket mutatnak.

A Timothy-szindróma a legsúlyosabb klinikai fenotípussal és a legmagasabb morbiditási és mortalitási kockázattal társul. Azonban az adatok nem támasztják alá a TS altípusok bármilyen formában történő megkülönböztetését.

3. Új és ismert *KCNJ2* génmutációkat azonosítottunk magyar Andersen-Tawil szindrómás betegeknél.

Egy magyar ioncsatorna betegekből álló betegcsoportban 7 *KCNJ2* mutációt azonosítottunk (p.Arg218His, p.Arg312Glu, p.del302Val, p.Glu293Lys, p.Met307Ile, p.Cys54Tyr, p.Arg82Gln). Három mutáció új volt. A mutációkat 17 betegnél azonosítottuk, akik 7 családhoz tartoztak.

4. Az Andersen–Tawil szindrómás betegek EKG-jellemzőinek kvalitatív és kvantitatív elemzése során azt találtuk, hogy az ATS-es betegek általában tipikus EKG-változásokat mutatnak, mint például gyakori kamrai ES, bigeminia vagy NSVT.

A korrigált QT-intervallum meghosszabbodása nem tipikus, és a QTc normál tartományban lehet. Az U-hullámok hangsúlyosabbak, hosszabbak és magasabbak ezeknél a betegeknél.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek, Prof. Dr. Sepp Róbertnek a PhD-tanulmányaim és kapcsolódó kutatásaim folyamatos támogatásáért, türelméért, motivációjáért és hatalmas tudásáért. Az ő iránymutatása segített a kutatás és a dolgozat írás minden percében.

Őszinte köszönetemet fejezem ki továbbá Prof. Dr. Varró Andrásnak, Prof. Dr. Forster Tamásnak, Prof. Dr. Szili-Török Tamásnak, akik lehetőséget adtak számomra, hogy PhD-hallgatóként csatlakozzak intézetükhöz, és hozzáférést biztosítottak a laboratóriumi és kutatási létesítményekhez. Az ő értékes támogatásuk nélkül nem lett volna lehetséges ez a kutatás. Hálával és csodálattal adózom Prof. Dr. Varró Vince és Prof. Dr. Csanády Miklós életútjának, akik példamutató iránymutatása nélkül nem lennék itt.

Köszönöm laboratóriumi társaimnak (Dr. Csányi Beáta, Dr. Lidia Hategan) a kedves segítségüket a PhD-m alatt. Különösen hálás vagyok Molnár Jánosné Klárinak, aki nélkül örökre elvesztem volna a laboratóriumi munka útvesztőjében.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, szüleimnek, feleségemnek és barátaimnak, akik minden lehetséges módon támogattak a dolgozat írása és az életem során általában.