

AT-gazdag DNS-kötő fehérjék jellemzése a fejlődő agyban

PhD értekezés tézisei

Készítette:

György Andrea

Témavezetők:

Dr. Dorgai László, Dr. Ágoston Dénes

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány
Biotechnológiai Intézet
&
Uniformed Services University of Health Sciences
2006.

I. Bevezetés

Az idegrendszer fejlődésének egyik legfontosabb része a sejt differenciáció szabályozása. Néhány faktort már azonosítottak, amelyek ezt a folyamatot befolyásolják: a legtöbb közülük több lépést is szabályoz, és a különböző jelátviteli folyamatok közt párbeszéd is történik, ami tovább bonyolítja a képet. A neuronális progenitor sejteknek először el kell magukat kötelezniük az idegsejt-sors mellett, majd a neuronális progenitor sejtek megállnak az osztódásban és differenciálódni kezdenek. Végül kialakulnak az érett neuronok.

A fent említett faktorok egy része úgy fejt ki hatását, hogy specifikus DNS szekvenciához kötődik, míg mások a DNS speciális másodlagos szerkezetét ismerik fel. Ilyen különleges másodlagos szerkezet jellemző a hosszú AT-gazdag szekvenciákra. Az AT-gazdag régióknak két csoportja van: a rövid (<20bp) AT-gazdag szekvenciák és a hosszú (>200-1000bp) AT-szigetek. Az utóbbiak közül sok "matrix attachment region"-ként, avagy MAR-ként működik: ezeken keresztül kapcsolódik a DNS a nukleáris mátrixhoz. A MAR szekvenciák mátrixhoz való kötődése szerepet játszik a kromatin domének elhatárolásában, így a transzkripció szabályozásában is.

Az eukarióta sejtekben a DNS kromatin formájában van jelen. A kromatin DNS-fehérje komplex, melyben a fő fehérjekomponensek a hisztonok. A DNS és a hisztonok kovalens módosításai határozzák meg, hogy a DNS szorosan feltekereselt állapotban, így a transzkripció apparátus számára hozzáférhetetlen heterokromatin formájában található, vagy a DNS egy lazább, transzkripció szempontjából hozzáférhetőbb eukromatinként van-e jelen. A nukleosomális hisztonok N-terminális végének acetilációja például a nyitott struktúrának kedvez, míg a metilációt többnyire a zárt szerkezettel hozták összefüggésbe. A kromatin szerkezeti átrendezését speciális (chromatin remodeling) enzimrendszerek végzik. Ezek nemcsak a hisztonokat módosíthatják, hanem magukat a nukleosómákat is átrendezhetik. Az egyik ilyen kromatin átrendezésben szerepet játszó enzimkomplex a Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation (NuRD) komplex.

Ebben a tanulmányban azokat a transzkripciós szabályozó mechanizmusokat vizsgáltuk, melyek a fejlődő agyban befolyásolhatják a sejsorsról való döntést. Modellként az enkefalin (ENK) gént választottuk. Az ENK gén az agyban olyan neuropeptideket kódol, melyek fontos szerepet játszanak egyes érzelmek, a szociális viselkedés és a jutalmazás szabályozásában. Az ENK kifejeződése felnőttkorban főként a striátumra korlátozódik. Mi azt az egyedfejlődés során történő szabályozást tanulmányoztuk, melynek eredményeképp csak bizonyos neuronok válnak enkefalinerg neuronokká. Mivel az enkefalin először az embrionális fejlődés 16. napján (E16) jelenik meg, és születés után hamarosan eléri a felnőttkori mintázatot, így ezt az fejlődési szakaszt vizsgáltuk. Különböző technikák alkalmazásával azonban azonosítottak több olyan szakaszt a távolabbi 5' régióban, amelyek szerepet játszhatnak az enkefalinerg fenotípus bizonyos neuronokra való korlátozásában.

Ezek közül az egyik egy AT-gazdag DNS szakasz volt, mely megtalálható patkány, ember és egér ENK génben egyaránt. Két fehérjét is azonosítottak, amelyek ehhez a régióhoz kötődnek: az egyik az mRNS-stabilitást szabályozó AUF1 volt, a másik egy ismert mátrix-kötő fehérjéhez, a SATB1-hoz hasonló SATB2.

II. Az alkalmazott módszerek rövid összefoglalása

1. A vizsgált SATB2 mRNS mennyiségének koronkénti összehasonlítására szemi- kvantitatív reverz transzkripció PCR-t (RT-PCR) használtuk.
2. Fehérjék kimutatására munkánk során a Western blot technikát, és egyes, illetve kettős immunhisztokémiát alkalmaztunk.
3. Az immunhisztokémiai metszetekről Leica DM RXA mikroszkópra rögzített digitális kamerával készítettünk felvételeket (20x nagyításhoz), vagy Zeiss Pascal lézer scanning konfokális mikroszkópot használtunk a 63x nagyításokhoz a sejten belüli kolokalizáció bizonyítására. Végül a digitális képkiértékelést a TIFFANY3 képfeldolgozó programmal (Caffeine software) és egy Mathematica 5.7 (Wolfram Research Inc.) programra írt saját script és a segítségével végeztük.
4. Az *in vitro* DNS-fehérje kölcsönhatás specifikitásának bizonyítására a DNA Affinity Preincubation Specificity Test of Recognition (DAPSTER) módszert használtuk.
5. Az *in vitro* fehérje-fehérje kölcsönhatást ko-immunoprecipitációval (Co-IP) mutattuk ki.
6. Az *in vivo* fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálatához kromatin immunoprecipitációt (ChIP) használtunk, melyet a fejlődő agyra optimalizáltunk.
7. A SATB2 fehérje represszor tulajdonságát tranziens transzfekciós kísérletekkel bizonyítottuk C6 sejtvonalat használva. Trichostatin (TSA) kezeléssel gátolva az HDAC1 aktivitását azt mutattuk be, hogy a SATB2 által közvetített represszió függ az HDAC1 aktivitásától.

III. Célkitűzések

- Első célunk az AUF1 és a SATB2 expressziós mintázatának meghatározása volt a fejlődő agyban. Noha mindkét fehérjéről ismert volt, hogy az agyban kifejeződnek, arról nem volt információ, hogy pontosan hol, mikor és hogyan fejeződnek ki abban az intervallumban, mikor a fejlődő idegrendszerben az enkefalinergeronok differenciációja történik.
- A második cél az volt, hogy bebizonyítsuk, hogy a két AT-kötő fehérje specifikusan kötődik az ENK gén AT-gazdag régiójához mind *in vitro*, mind *in vivo*.
- Harmadik célunk a SATB2-val esetleg kölcsönható fehérjék azonosítása volt. Mivel a SATB2 aminosav-szinten igen hasonló a SATB1-hoz, amiről ismert volt, hogy több kromatin-átrendezésben szerepet játszó enzimkomplex tagjaival is kölcsönhat, ezért valószínűnek tűnt, hogy a SATB2 is hasonló fehérjékkel működhet együtt.
- Negyedik célunk volt a SATB2 és partner-fehérjéinek kölcsönhatását jellemezni: meghatározni, hogy a fehérjék kötődnek-e egymáshoz *in vitro* és hogy együtt kötődnek-e az ENK gén 5' AT-gazdag régiójához *in vivo* is, az agyfejlődés általunk vizsgált szakaszában.
- Arra is kerestük a választ, hogy a partner-fehérjék milyen szerepet töltenek be a SATB2 által történő génszabályozásban, azaz mennyire függ a szabályozás maga a partnerfehérje aktivitásától?
- Végül célunk pedig az volt, hogy a SATB2-mediált génexpresszió szabályozás mechanizmusát meghatározzuk.

IV. Eredmények

1. Az AUF1 expressziós mintázatának meghatározása a fejlődő agyban.

Immunhisztokémiával feltérképeztük az AUF1 fehérjét kifejező sejteket a fejlődő agyban. Az embrionális fejlődés 16. napján (E16) az AUF1 pozitív sejteket találtunk a ventrikuláris zónában, a pallidális szubventrikuláris zónában és a telencephalon falában. Ez arra utal, hogy az AUF1-nak szerepe lehet az osztódásban és/vagy differenciálódásban is. E18-ban majdnem az összes agykérgi sejt valamint a striátum egy része is AUF1 pozitív. Születés után két nappal (P2) AUF1 immunoreaktív sejteket csak olyan régiókban találtunk, melyek nem fejeznek ki enkefalint, úgymint a kéreg, a szeptum és a talamusz. Nagy nagyítással meghatároztuk az AUF1 sejten belüli eloszlását is: a fejlődő agyban az AUF1 kizárólag a magban, de nem egyenletes eloszlásban található, hanem kis szemcsékbe tömörülve. (A. Dobi et al., 2006, JBC és 2005. Neuroscience poszter)

2. Az AUF1 specifikusan köt az AT-gazdag régióhoz in vitro és in vivo

DNA Affinity Preincubation Specificity Test of Recognition (DAPSTER assay) segítségével bebizonyítottuk, hogy az AUF1 specifikusan kötődik az AT-gazdag kettősszálú DNS-hez *in vitro*. A kötés specifikus (kettősszálú AT-gazdag) kompetitor jelenlétében megszűnt, míg a mutáns kompetitor nem befolyásolta, ezért elmondhatjuk, hogy a kötés specifikus.

Kromatin immunoprecipitációval (ChIP assay) pedig azt bizonyítottuk be, hogy az AUF1 *in vivo*, a fejlődő kéregben is köt az ENK gén AT-gazdag régiójához, valamint a TATA-regióhoz is. (A. Dobi et al., 2006, JBC és 2005. Neuroscience poszter)

3. A SATB2 mRNS és fehérje expressziója a fejlődő agyban

Szemi-quantitatív reverz transzkripció PCR-al (RT-PCR) meghatároztuk a SATB2 mRNS mennyiségét. Igen alacsony szintet találtunk E14-es korban, majd egyre többet P2-ig, végül felnőtt korban szinte teljesen eltűnt a SATB2 mRNS. Nem találtunk SATB2

mRNS-t a csecsmőmirigyben, ahol pedig a SATB1 expresszió ebben a korban magas szintet ér el.

Immunoblottal hasonlóképpen azt találtuk, hogy E18 és P2 között van a legtöbb SATB2 fehérje, és egyáltalán nem találtunk E14-es és felnőtt korban.

Immunhisztokémiával meghatároztuk a SATB2-t expresszáló sejtek eloszlását. Kizárólag az agykéregben találtunk SATB2 pozitív sejteket minden vizsgált életkorban. E16-ban látható először SATB2 a kéreg felszíni rétegeiben, E18-ra jelentősen tovább terjed, majd P2 korban éri el a maximális kiterjedését, és P4-ra gyakorlatilag ismét alig detektálhatóvá csökken. A BrdU és SATB2 kettős festés azt mutatta, hogy a SATB2 kizárólag már nem osztódó sejtekben fejeződik ki, mivel nem találtunk kettőspozitív sejtet sem E18 sem P2 korban. (*M. Szemes and A György et al., 2006., Neurochem. Res.*)

4. A SATB2 fehérje *in vitro* kölcsönhat a NuRD komplex két tagjával.

SATB2 specifikus antitesttel sikeresen ko-immunprecipitáltuk (IP) fejlődő agykérgi magi fehérje -extraktumból magát a SATB2 fehérjét és a vele kölcsönható HDAC1- t és MTA2-t, a NuRD komplex két tagját.

DAPSTER assay segítségével bebizonyítottuk, hogy ez az *in vitro* kölcsönhatás kettősszálú AT-gazdag DNS jelenlétében is fennáll: a SATB2 specifikusan kötődött az AT-gazdag DNS-re, és vele együtt az HDAC1 és az MTA2 is. A kötés specifikus (kettősszálú AT-gazdag) kompetitor jelenlétében megszűnt, míg a mutáns kompetitor nem befolyásolta, ezért a kötés specifikus. (*A. György et al., publikálás alatt*)

5. A SATB2 fehérje és több kromatin átrendezésben résztvevő fehérje *in vivo* köt az ENK gén AT-gazdag szakaszához.

Kromatin immunoprecipitációval azt találtuk, hogy az ENK gén AT-gazdag régiója felamplifikálható volt a SATB2, MTA2, HDAC1 (a NuRD komplex tagjai) és az CHRAC17 (egy másik, az CHRAC/ACF kromatin átrendezését végző komplex tagja) elleni antitesttel precipitált mintából, míg a negatív kontrollként használt EGFR antitesttel precipitáltból nem. Ez azt bizonyítja, hogy ez a három fehérje, melyek két kromatin

átrendezéséért felelős komplex tagjai, a SATB2-val együtt kötődnek az ENK AT-gazdag szakaszához. (A. György *et al.*, publikálás alatt)

6. A SATB2, MTA2 és HDAC1 ko-lokalizációja

SATB2-MTA2, illetve SATB2-HDAC1 kettős immunhisztokémiával azt találtuk, hogy mind E18, mind P2 korban a SATB2 a fenti két fehérjével együtt fejeződik ki, ugyanazokban a sejtekben. Míg E18-ban a SATB2 csak az agykéreg marginális részén fejeződik is, és mind az HDAC1 mind az MTA2 szélesebb elterjedést mutat, addig P2 korban a SATB2 az egész neokortexben elterjed, míg mind az MTA2, mind az HDAC1 visszaszorul a SATB2 pozitív régiókra. Ezáltal a kettős pozitív terület jelentősen megnő. Olyan agyterület egyik vizsgált életkorban sem volt, ahol a SATB2 fehérje MTA2, vagy HDAC1 nélküli sejtekben fejeződne ki. (A. György *et al.*, publikálás alatt)

7. A SATB2 fehérje AT-gazdag DNS függő módon represszálja a reporter gént, és HDAC1 aktivitást igényel a represszióhoz.

C6 glióma sejt kultúrát AT-gazdag vagy mutáns kötőhelyet tartalmazó plazmidokkal transzfekálva azt találtuk, hogy a luciferáz reporter gén aktivitása AT-gazdag DNS függő módon negyedére csökkent SATB2 jelenlétében. Ha azonban az endogén HDAC aktivitást trichostatin A (TSA) kezeléssel meggátoltuk, a represszió megszűnt. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a SATB2 által közvetített represszió függ az aktív HDAC1 jelenlététől. (A. György *et al.*, publikálás alatt)

V. Diskusszió

Mindkét azonosított AT-gazdag DNS-kötő fehérje, a SATB2 és az AUF1 is kifejeződik a fejlődő agyban, és hozzájárulhat az ENK fejlődésbeni szabályozásához. Érdekes módon ez a két fehérje szerkezetileg nem rokon egymással, mégis mindkettő specifikusan kötődik az ENK gén AT-gazdag 5' régiójához mind *in vitro*, mind *in vivo*. A fejlődő agyban mindkét fehérje kifejeződése térben és időben meghatározott, és mindkettőt a sejtmagi kifejeződés jellemzi.

A SATB2 aminosav szinten igen hasonlít a hozzá közel rokon SATB1-hoz, amiről ismert, hogy mind a NuRD, mind az CHRAC/ACF kromatin átrendezéséért felelős enzimkomplexek tagjaival kölcsönhat. Az is bizonyított, hogy akárcsak a SATB2, MAR szekvenciákhoz köt a genomban. Immunprecipitációval, DAPSTER assay segítségével és kromatin immunoprecipitációval bebizonyítottuk, hogy a SATB2 ugyancsak komplexet képez a NuRD két tagjával, az MTA2-val és az HDAC1-al az ENK AT-gazdag régiójához kapcsolódva. Ezt alátámasztotta a kettős immunhisztokémia is, mely megmutatta, hogy a SATB2 elsősorban olyan sejtekben fejeződik ki, melyek a vizsgált partnerfehérjéket is expresszálják. A SATB2 funkciójáról a tranziens transzfekció azt mutatta, hogy repressziót közvetít, HDAC1 függő módon. Meglepő módon az általánosan elterjedtnek hitt két fehérje, az MTA2 és az HDAC1 is térben és időben meghatározott módon fejeződik ki a fejlődő agyban.

A fenti eredmények ismeretében a következő hipotézist állítottuk fel a az AUF1 és a SATB2 funkciójáról: valószínű, hogy mindkét fehérje több, hasonlóan AT-gazdag szekvenciához kötődve a genomban, a kromatin átrendezéséért felelős enzim-komplexeket irányítja oda az AT-gazdag kötőhelyekhez, több gén együttes szabályozását téve így lehetővé.

VI. A dolgozathoz kapcsolódó saját közlemények:

1. Szemes M, Gyorgy A, Paweletz C, Dobi A, Agoston DV *The first two authors contributed equally to this work*

Isolation and Characterization of SATB2, a Novel AT-rich DNA Binding Protein Expressed in Development- and Cell-Specific Manner in the Rat Brain.
Neurochem Res. 2006 Apr 4. PMID: 16604441

2. Albert Dobi, Marianna Szemes, Cheol Lee, Miklos Palkovits, Francis Lim, Andrea Gyorgy, Mark A. Mahan, Denes V. Agoston

AUF1 is expressed in the developing brain, binds to AT-rich dsDNA and regulates enkephalin gene expression
Módosítással elfogadva: Journal of Biological Chemistry (JBC), 2006.

3. Andrea Gyorgy, Marianna Szemes, Denes V. Agoston

The special AT-rich DNA binding protein SATB2 is co-expressed with chromatin remodellers in a subset of developing neocortical neurons and regulates gene expression through altered histone acetylation

Publikálás alatt: J. Neurochemistry, 2006.

A dolgozathoz kapcsolódó saját konferencia poszterek:

A) D.V. Agoston, C. Lee, A. Dobi, M. Palkovits, A. Gyorgy, M. Szemes.

The hematopoietic master-regulator SATB1 is expressed in the developing brain and regulates the development of the enkephalin phenotype through chromatin modifications.
Program No. 35.7. 2004. Society for Neuroscience.

B) A. Gyorgy, C. Lee, M. Szemes, A. Dobi, D.V. Agoston. Molecular and functional multitasking: the regulator of mRNA stability AUF1/hnRNP D controls gene expression upon binding to AT-rich dsDNA, participates in chromatin remodeling and is involved in regulating adult de novo neurogenesis.

Program No. 478.8. 2005 Society for Neuroscience, 2005.

A dolgozathoz nem kapcsolódó saját közlemények:

4. Rutkai E, Gyorgy A, Dorgai L, Weisberg RA

Role of secondary attachment sites in changing the specificity of site-specific recombination. J Bacteriol. 2006 May;188(9):3409-11. PMID: 16621836

5. Kovacs L, Marczinovits I, Gyorgy A, Toth GK, Dorgai L, Pal J, Molnar J, Pokorny G.

Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3(213-228) in primary Sjogren's syndrome.

Rheumatology (Oxford). 2005 Aug;44(8):1021-5. Epub 2005 May 11. PMID: 15888503

6. Marczinovits I, Kovacs L, Gyorgy A, Toth GK, Dorgai L, Molnar J, Pokorny G.

A peptide of human muscarinic acetylcholine receptor 3 is antigenic in primary Sjogren's syndrome.

J Autoimmun. 2005 Feb;24(1):47-54. Epub 2005 Jan 20. PMID: 15725576

Társzerzői Nyilatkozat

Alulírott, Dr. Ágoston Dénes, mint a doktorjelölt, György Andrea 5. éves PhD hallgató témavezetője nyilatkozom, hogy a csatolt doktori értekezésben felhasznált eredmények tükrözik a jelölt hozzájárulását, mivel Andrea munkája mindhárom közleményben jelentős mértékű volt.

Az értekezés címe:

"The molecular function of AT-rich DNA binding proteins in the developing brain."

A hivatkozott cikkek:

1. Isolation and characterization of SATB2, a novel AT-rich DNA binding protein expressed in development- and cell-specific manner in the rat brain

Fő szerző (corresponding author): Denes V Agoston

Első szerzők: Mariann Szemes, Andrea György: *a két első szerző azonos mértékben járult hozzá a közlemény létrejöttéhez.*

Társzerzők: Cloud Paweletz, Albert Dobi

Megjelent: Neurochemical Research, 2006. Ápr 4.

2. AUF1 is expressed in the developing brain, binds to AT-rich dsDNA and regulates enceph gene expression

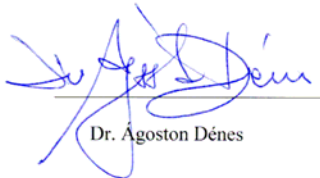
Szerzők: Albert Dobi, Marianna Szemes, Cheol Lee, Miklos Palkovits, Francis Lim, Andrea György, Mark A. Mahan, Denes V. Agoston

módosítással elfogadva: Journal of Biological Chemistry (JBC), 2006.

3. The special AT-rich DNA binding protein SATB2 is co-expressed with chromatin remodellers in a subset of developing neocortical neurons and regulates gene expression through altered histone acetylation

Szerzők: Andrea György, Marianna Szemes, Denes V. Agoston

Publikálás alatt: J. Neurochemistry, 2006.



Dr. Ágoston Dénes

2006. április 24., Bethesda, Maryland



BIOCENTER
Laboratóriumi Szolgáltató Kft. **Laboratory Supplier Ltd**
6726 Szeged Temesvári krt. 62.
Temesvári krt. 62. H-6726 Szeged, Hungary
Tel: (62) 599 750 Phone: +36 62 599 750
Fax: (62) 599 751 Fax: +36 62 599 751
E-mail: info@biocenter.hu E-mail: info@biocenter.hu

Nyilatkozat

Ezennel tanúsítom, hogy György Andrea Ph.D. hallgató hozzájárulása az alábbi publikációban közölt munkához érdemi, jelentős és a szerzői sorrenddel arányos.

Edit Rutkai, Andrea György, László Dorgai and R. A. Weisberg: *Role of secondary attachment sites in changing the specificity of site-specific recombination*
Journal of Bacteriology, May 2006, 188(9) 3409-3411

Szeged, 2006-04-25

Dr. Dorgai László
témavezető



•1901•

FEJÉR
MEGYEI
SZENT GYÖRGY
KÓRHÁZ

I. BELGYÓGYÁSZATI OSZTÁLY



Number 12 10 2004

Ikt. sz.:
Tárgy:
Hiv. sz.:
Ügyint.:

Társ szerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Kovács László ezennel kijelentem, hogy a következő közleményben, mely az én elsőszerzőségemmel készült, György Andrea munkája jelentős mértékben hozzájárult a projekt sikeréhez.

A közlemény címe: Clinical associations of autoantibodies to human muscarinic acetylcholine receptor 3(213-228) in primary Sjogren's syndrome.

Szerzők: Kovacs L., Marczinovits I., György A., Tóth GK, Dorgai L., Pál J, Molnár J, Pokorny G.
Megjelent: Rheumatology (Oxford). 2005 Aug;44(8):1021-5.
Epub 2005 May 11., PMID: 15888503.

Székesfehérvár, 2006. március 13.

Dr. Kovács László
részlegvezető főorvos
Fejér Megyei Szent György Kórház
I. sz. Belgyógyászati Osztály
Seregélyesi út 3.
8000 Székesfehérvár

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Igazgató: Dr. Mihály András egyetemi tanár

6724 Szeged, Kossuth L. sgt. 40.
6701 Szeged, Postafiók 427.

Telefon: (62)-545-665
Fax: (62)-545-707

E-mail: titk@anat-fm.szote.u-szeged.hu
<http://www.morpho.szote.u-szeged.hu/anatomy/>

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Marczinovits Ilona ezennel kijelentem, hogy a következő közleményben, mely az én elsőszerzőségemmel készült, György Andrea munkája jelentős mértékben hozzájárult a projekt sikeréhez.

A közlemény címe: A peptide of human muscarinic acetylcholine receptor 3 is antigenic in primary Sjogren's syndrome.

Szerzők: Marczinovits I, Kovács L, György A, Tóth GK, Dorgai L, Molnár J, Pokorny G.

Megjelent: J Autoimmun. 2005 Feb;24(1):47-54.

Epub 2005 Jan 20., PMID: 15725576



Dr. Marczinovits Ilona

Egyetemi adjunktus

SZTE ÁOK Anatómiai, Szövet-és Fejlődéstani Intézet

Szeged, 2006. március 21.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Dorgai Lászlónak és Dr. Ágoston Dénesnek, témavezetőimnek a munkámhoz nyújtott folyamatos szakmai támogatásért.

Köszönettel tartozom Dr. Kálmán Miklósnak és a Bay Zoltán Alapítványnak valamint a Uniformed Services University of the Health Sciences-nek, hogy PhD hallgatóként részt vehettem ebben a színvonalas munkában.

Hálával tartozom Dr. Szemes Mariannának és Dr. Dobi Albertnek, amiért hozzájárultak munkájuk közzétételéhez és folytatásához, valamint folyamatos szakmai segítségükért és biztatásukért.

Köszönetemet szeretném kifejezni munkatársaimnak a Uniformed Services University-n, Cheol Lee-nek, Tinghua Chennek és Mike Lawsonnak. Különös hálával tartozom Dr. Czégé Józsefnek, aki rengeteget segített a digitális képfeldolgozással, és felsorolhatatlanul sok egyébvel.

Köszönöm a Bay Zoltán Intézetből munkatársaimnak, Vörös Andreának, Bálint Arankának, Szamecz Bélának és Rutkai Editnek a támogatást és a segítséget, amit évekig nyújtottak. Külön köszönet Urbán Gabriellának, aki nélkül ez a dolgozat soha nem készül el.

Ezúton köszönöm Dr. Petrovics Györgynek, Dr. Pázmán Cecíliának és Adetoun Adeniji-Adele-nek szakmai segítségüket és a disszertáció kritikus átolvasását.

