

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 összekapcsolja a DNS javítást a sejt jelátviteli folyamataival a Ras és Rac1 GTPázok aktiválásán keresztül

Hajas György

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2015

**A 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 összekapcsolja a DNS javítást a sejt jelátviteli
folyamataival a Ras és Rac1 GTPázok aktiválásán keresztül**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Hajas György
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Dr. Bajtay Zsuzsa, az MTA doktora
Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris
Biológiai Intézet, Élettudományi Épület, 3.506 szoba
2015. szeptember 11., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Vértessy Beáta, az MTA doktora
Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Vértessy Beáta, az MTA doktora
Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
Dr. Bajtay Zsuzsa, az MTA doktora
Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet,
"A" épület tanterme
2015. szeptember 11., 13 óra

1. Bevezetés

Az oxidatív stressz egy olyan evolúciós hajtóerő, melyet gyakran úgy definiálnak, mint az oxidációs és antioxidációs folyamatok közötti kiegyensúlyozatlan állapotot. Számos olyan súlyos betegséggel összefüggésbe hozható, mint amilyen a Parkinson-kór, tumor, Alzheimer-kór, infarktus vagy a krónikus fáradtság szindróma. Másrésztől azonban az élőlények nem lennének képesek túlélésre a reaktív oxigén/nitrogén tartalmú molekulák szabályozott termelése nélkül. A redox változásokra érzékeny aminosavak fontos szerepet játszanak a jelátviteli folyamatokban, pl. a metionin reverzibilis oxidációja gátolhatja a szomszédos Tyr/Ser/Thr tartalmú láncok foszforilációját befolyásolva ezzel főbb jelátviteli útvonalakat.

1.1 Az oxidatív stressz

A környezetünk egyre szennyezettebbé válik oxidációt kiváltó vegyületekkel, sugárzásokkal, köszönhetően a növekvő mennyiségű kemikáliáknak, ionizáló-, és ultraibolya sugaraknak. Ezek a prooxidatív források hathatnak közvetlenül, illetve az oxido-reduktáz enzimeken és/vagy egyes mitokondriális folyamatok aktiválásán keresztül. Amikor a sejt antioxidáns kapacitása nem tudja ellensúlyozni a reaktív oxigén gyököket (ROS), melyek válogatás nélkül károsítják a fehérjéket, lipideket, DNS molekulákat, akkor az megzavarhatja a sejt normál jelátviteli útvonalait. Ugyanakkor a ROS molekulák termelődése a sejtek alapvető fiziológiás folyamatainak elengedhetetlen részét képezik. Említésre méltó ROS források többek között: a mitokondriumok, amelyekben az oxidatív foszforiláció zajlik, a xantin oxidáz, a citokróm P450 és a NADPH oxidázok (NOX1-5, DUOX1-2). Ez utóbbi enzimek rendelkeznek azzal a tulajdonsággal, hogy elektronokat képesek transzportálni a plazmamembránon keresztül, miközben szuperoxidot és más reaktív oxigén molekulákat generálnak. A leggyakoribb ROS molekulák: szuperoxid anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil- (OH^{\bullet}), alkoxi- (RO^{\bullet}), peroxi-gyökök (ROO^{\bullet}), hidrogen-peroxid (H_2O_2), szerves hidroperoxidok ($ROOH$), hipoklórsav ($HOCl$), peroxinitrit ($ONOO^-$).

A szabadgyökök oxidáció által károsíthatják a lipideket és az így keletkező lipid peroxidok tovább módosíthatnak olyan fontos molekulákat, mint például a fehérjék. A proteinek gyakran károsodnak specifikusan egy oldalláncon, esetleg valamelyik

aminosav komponensen (pl. hidrogén-peroxid által), vagy nem specifikusan, a fehérje gerince mentén (pl. hidroxil gyökök által). A fehérje károsodás eredménye lehet a funkció elvesztése (pl. enzim aktivitás, jelátvitel esetén), a szerkezet módosulása (denaturáció, aggregáció) vagy megváltozott interakciós képesség, melyek hozzájárulhatnak különböző kórképek kialakulásához.

Az egyik leggyakrabban előforduló reaktív oxigén intermedier a hidroxil gyök, mely a DNS-sel reagálva kettős kötéseket ad a bázisokhoz egy hidrogén atom elvonásával a timin metil csoportjából és a 2'-dezoxiribóz C-H kötéseiből. Purin bázisok esetében a hidroxil gyök hozzáadódik a C4, C5 és C8 pozícióban levő atomokhoz létrehozván azok OH gyökszármazékát. Eddig több, mint 20 féle, szabad gyökök által létrehozott bázis módosulást azonosítottak, melyek hozzájárulhatnak mutációkhoz, a DNS konformáció megváltozásához, deléciókhoz, esetleg epigenetikai változásokat eredményezhetnek.

1.1.1 A 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG)

A DNS és RNS bázisok között a guanin (Gua) oxidálódik a legkönnyebben az alacsony redukciós potenciálja miatt (-1.29 mV vs. Ni-H elektród). *In vivo*, a DNS-ben és RNS-ben levő guanint nemcsak a hidroxil gyök tudja károsítani, hanem más oxidáló molekulák is, mint pl. a szuperoxid anion, ózon (O₃) szinglet oxigén (¹O₂), hidrogén-peroxid, nitrogén-oxid, (NO), peroxinitrit, nitrozoperoxikarbonát (ONOOCO₂⁻), karbonát anion (CO₃⁻), illetve a napsugárzás UVA komponense. A szabad 8-oxoG jelenléte az extracelluláris folyadékban az egyik legmegbízhatóbb jele a szervezetet ért oxidatív stressznek. Becslések szerint normál fiziológiás körülmények között néhány száz 8-oxoG keletkezik naponta a DNS-ben sejtenként. Oxidatív stressz körülmények között, mint amilyen a kóros vagy előregedett sejtekre/szövetekre jellemző, a 8-oxoG a leggyakrabban előforduló DNS lézió. Emlősökben a kettős hélixen belüli 8-oxoG-t az *E. coli* Fpg homológ 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 (OGG1) enzim ismeri fel és vágja ki mind a nukleáris, mind a mitokondriális genomból a bázis-kivágó javítás (BER) során. Mivel az RNS molekuláknak nincsenek védő fehérjéi, fokozottabban ki vannak téve oxidatív károsodásnak. Becslések szerint a hírvivő RNS-ek 30-70%-a tartalmaz 8-oxoG-t egyrészt a guanin alacsony redox potenciálja, másrészt a javító mechanizmusok hiánya miatt. Mivel az RNS mennyisége közel négyszerese a DNS-ének, ezért egy antioxidáns, védő szerepet is feltételeznek sejtekben található RNS-nek.

1.1.2 A ROS elleni védőmechanizmusok

A sejtek rendelkeznek mind enzimatis, mind nem enzimatis ROS elleni védelemmel. Az enzimek nélküli védelmet leggyakrabban redukáló hatással bíró molekulák biztosítják, mint amilyen a glutation, ubikinon, tiolok (cisztein), tokoferol (E vitamin), aszkorbinsav (C-vitamin), retinoidok (A vitamin) illetve a polifenolok. Amíg a hidrofíli antioxidánsok a citoplazmában védenek, a lipofíli a sejtmembránt védik az oxidációtól. A sejtek tartalmaznak egy antioxidáns enzimekből álló hálózatot, melyek képesek metabolizálni az oxidatív stressz során keletkező intermediereket. Ezek közé az enzimek közé tartozik a glutation-reduktáz/peroxidáz/S-transzferáz, kataláz, szuperoxid diszmutáz valamint számos peroxidáz. Az oxidatív stressz hatására egyúttal aktiválódnak a ROS eliminálásában résztvevő fehérjék génei is, hogy megakadályozzák a további károkat. A sejtekben az egyik legfontosabb ROS elleni antioxidáns fehérjék géneit aktiváló transzkripciós faktor a Nrf2 (NF-E2 related factor 2). Az Nrf2 hozzákötődik az antioxidáns reszponzív elemekhez (ARE), melyek szabályozzák mind az alap, mind az indukálható antioxidáns gének expresszióját válaszként UV sugarakra, xenobiotikumokra, nehézfémekre és más oxidáló ágensekre. A ROS molekulák DNS javító választ kiváltó hatása különböző érzékelő-, és jelátviteli utak segítségével, a sejtciklus ellenőrző pontok, apoptózis és sejtöregedés szabályozásán keresztül érvényesül. Ezek a DNS károsodást érzékelő rendszerek biztosítják a genom integritását, míg a DNS javító mechanizmusok visszaállítják a meghibásodott DNS-t az eredeti állapotába.

1.2 DNS javító mechanizmusok

A ROS molekulák több, mint száz oxidatív DNS károsodást okozhatnak olyanokat, mint egyes/kettős szálú törések, dezoxiribóz oxidáció, DNS-fehérje keresztkötések valamint bázis módosítások. A DNS hibák legnagyobb része belső eredetű, melyek közül az egyik leggyakoribb a DNS-bázis és a dezoxiribóz molekula közötti N-glikozid kötés spontán hidrolízise. A nukleobázis vesztesség esetén egy szabad apurin/apirimidin hely keletkezik, melyek előfordulását sejtenként tízezerre becsülik naponta. A ROS okozta DNS bázishibák közül a 8-oxoG a legintenzívebben tanulmányozott, valamint általában ezt használják a DNS károsodás indikátoraként. A környezet is számos formában képes károsítani a DNS-t. Az UV sugárzás például atipikus kovalens kötések hoz létre

szomszédos pirimidin bázisok között. Egy másik károsító hatás az ionizáló sugárzás, mely megtalálható mind természetes (gamma-sugárzás), mind mesterséges (Röntgen-sugárzás) formában is. Bizonyos kémiai ágensek is nagyon hatékonyak a DNS hibák okozásában. A topoizomeráz I vagy II gátlószereket (topotekán, etopozid) daganatos megbetegedéseknél alkalmazzák egyes/kettős DNS törések előidézésére. A károsodás típusától függően az élőlények többféle útvonalat alkalmaznak a DNS hibák kijavítására. Az emlős sejtek öt fő DNS javítási mechanizmust használnak: össze nem illő bázispárok javítása (mismatch repair, MMR), nukleotidkivágó javítás (nucleotid excision repair, NER), báziskivágó javítás (base excision repair, BER), homológ rekombináció (HR), nem homológ végek összekapcsolása (non-homologous end joining repair, NHEJ).

1.2.1 Össze nem illő párok javítása (MMR)

Az MMR rendszer felismeri és kijavítja a tévesen beillesztett bázisokat, valamint a DNS polimerázok által elkövetett hibás inzerciókat és deléciókat. Azokra az élőlényekre, melyekben meghibásodott MMR gének vannak különböző daganatos megbetegedések jellemzőek, pl. a Lynch-szindróma, mely örökölt nonpolyposis vastagbélrákként is ismert. Az MMR egy szál-specifikus javítás, mely konzervatív maradt a baktériumoktól a főemlősökig. A folyamat három fő lépést tartalmaz: felismerés, kivágás, javítás. Az első lépésben felismerése kerülnek az össze nem illő bázispárok, a másodikban a hibát tartalmazó szál lebontásra kerül, míg a harmadikban a megfelelő DNS szakasz szintézise történik.

1.2.2 Nukleotid-kivágó javítás (NER)

A NER mechanizmus felismeri a DNS hélixet torzító sérüléseket, mint például a ciszplatin-DNS szálon belüli keresztkötések, vagy az UV fény által okozott 6-4 pirimidin-pirimidon, illetve timin dimerek. A folyamat ugyanazon biokémiai lépésekből áll mind a prokariótákban, mind az eukariótákban: hiba felismerés, azonosítás, kétoldali bemetszés, kivágás, javító szintézis és összekapcsolás. Amíg ez a javítómechanizmus a prokariótákban mindössze hat, addig az eukariótákban több mint harminc fehérje részvételét igényli. A folyamat szabályozására jellemző a javító proteinek fokozatos összeépülése a meghibásodás helyén. A NER fehérjék mutációja/elégtelensége esetén olyan súlyos betegségek alakulhatnak ki, mint a xeroderma pigmentosum, Cockayne

szindróma és a trichothiodystrophia. Mindegyik kór fokozott napfényérzékenységgel, tumorra való hajlammal, immunológiai defektusokkal és korai öregedéssel jár. A NER hibajavító rendszer két alútvonalat foglal magába: globális genom-javítás (GG-NER, global genome NER) és transzkripcióhoz kötött javítás (TC-NER, transcription coupled NER). A két alútvonal a hibafelismerő fázisban különbözik: a GG-NER az egész genomban végez javítást, míg a TC-NER-t az aktívan átíródó, megakadt RNS polimeráz aktiválja.

1.2.3 Dupla szálú törés-javítás (Double-Strand Break Repair)

A kettős DNS szál törések (DSBs) veszélyeztetik a genom stabilitását és a sejtek életképességét, amennyiben a kiváltó tényező ionizáló sugárzás, UV fény vagy kémiai anyagok. Ha nem kerülnek javításra, kromoszóma aberrációkat, deléciókat okozhatnak, melyek genom instabilitáshoz vagy tumoros folyamatokhoz vezethetnek. Ugyanakkor természetes módon is előfordulnak az ellenanyagok V(D)J rekombinációja során. Az élőlényekben kétféle út létezik a DSB kijavítására: homológ rekombináció (HR) és a nem homológ végek összekapcsolása (NHEJ). A HR útvonal a nem károsodott testvér kromoszómákat használja templátként és a sejtciklus késői S illetve G2 fázisában működik. A NHEJ javítás a sejtciklus minden fázisa alatt aktív, azonban nem hibamentes, mivel templát felhasználás nélkül kapcsolja össze a törött DNS végeket.

1.2.4 Báziskivágó javítás (BER)

Ez javítási mód távolít el minden, a kettős hélixet nem torzító hibát a DNS-ből. A folyamatot a DNS glikozilázok indítják el, melyek kivágják a nem megfelelő (uracil) vagy módosított, pl. alkilált (3-metiladenin), oxidált (8-oxoG) vagy deaminált (hipoxantin) bázisokat. Legalább tizenkét, nagyon szűk specificitású DNS glikoziláz létezik. Mindegyik egy közös „kihajtó” (flipping) mechanizmust használ, melynek során a hibás bázist a szálon kívülre fordítja, majd levágja. A DNS glikozilázok a dezoxiribóz és a bázisok közti N-glikozid kötéseknek hasítják, ami után egy AP hely alakul ki. Ezeket a bázis nélküli kötőhelyeken az AP endonukleáz 1 (APE1) hidrolizálja a foszfodiészter gerincet 5'-AP hely irányba, aminek következtében egy törés keletkezik a szálon egy 3'-OH és egy 5'-dezoxiribóz-foszfát (5'-dRP) végződésel. Az így keletkezett szakaszt a DNS polimeráz egészíti ki, majd a DNS ligáz zárja össze.

1.2.5 OGG1, egy sokoldalú DNS javító enzim

Az OGG1 a 8-oxoG-t kivágó enzim a bázis-kivágó javítás folyamatában. Az OGG1 egy kettős funkciójú glikoziláz: képes mind a glikozid, mind a foszfodiészter kötések (5' és 3') hasítására, ez utóbbival egyszálú DNS törést hagyva maga után. Az OGG1 által kezdeményezett javítás négy fő lépést foglal magába: az OGG1 felismeri a hibás bázist és kivágja, az APE1 létrehozza az 5' dezoxiribóz-foszfát és 3'-OH végeket, a hiányzó bázisokat a DNS polimeráz β illeszti be, a DNS ligáz végül összekapcsolja a szálakat. Az OGG1 aktivitását különböző poszttranszlációs módosítások befolyásolják: ilyen például a foszforiláció, acetiláció, valamint más javító fehérjékkel való kölcsönhatások. Az OGG1 génnek a C terminális régió utolsó exon szekvenciájától függően két fő variánsa van: a nukleáris (1-es típus, 3 izoformával) és a mitokondriális (2-es típus, 5 izoformával). Mindegyik variáns N-terminális szakasza megegyezik. Eukariótákban az N-terminális régió tartalmazza a mitokondriumba történő transzporthoz szükséges target szekvenciát. A 8-oxoG akkumulálódását a DNS-ben összefüggésbe hozták különböző megbetegedésekkel: felgyorsult telomer rövidülés, gyulladós és öregedési folyamatok. Mindezek mellett a kijavítatlan 8-oxoG bázis adeninnel való kapcsolódása GC \rightarrow AT mutációt okozhat, ami miatt a legmutagénebbként tartják számon az oxidálódott bázisok között. A DNS-ük extrém magas 8-oxoG szintje ellenére az OGG1 knockout (OGG1 $^{-/-}$) egerek élettartalma nem csökken, nincsen szervi károsodásuk és a tumorok kialakulásának valószínűsége is csak mérsékelten növekszik. Sőt, az OGG1 $^{-/-}$ egerek ellenállóbbak az oxidatív stresszel (KBrO₃ által generált) szemben, mialatt a DNS-ük 8-oxoG tartalma 250-500-szorosára növekszik a vad típusú egerekéhez viszonyítva. Mabley és mtsai 3 féle gyulladós modellben tanulmányozták az OGG1 szerepét: endotoxin sokk, diabétesz és kontakt hiperszenzitivitás. Az OGG1 knockout egerek nagyon ellenállóak bizonyultak kontrol (OGG1 $^{+/+}$) társaikhoz képest a lipopoliszacharid (LPS) okozta hatásoknak: LPS indukálta szervműködés csökkenés, neutrofil infiltráció és oxidatív stressz. Többszörös alacsony dózisu streptozocinnal indukált I-es típusú diabétesz esetén az OGG1 $^{-/-}$ egereknek szignifikánsabban alacsonyabb volt a vércukor, és magasabb az inzulin szintje, valamint a diabétesz is kisebb számban fordult elő a kontrol egerekhez képest. Az oxazonon által indukált allergia modellben (kontakt hiperszenzitivitás) az OGG1 knockout egereknél csökkent neutrofil számot, alacsonyabb

kemokín (MIP-1, MIP-2), Th1 (IL-1, TNF- α), Th2 (IL-4) citokín mennyiségeket mérték a fűszövetben. Egyes hipotézisek szerint a DNS-függő protein kinázok felismerik az OGG1 által hagyott helyet és gyulladási folyamatokat indítanak el. Ebből a szempontból előnyösebb az OGG1 leregulálása és 8-oxoG DNS-ben hagyása. Ez a hipotézis szintén megmagyarázza, miért van az OGG^{-/-} egerek DNS-ében kevesebb bemetszés, és miért hajlamosak kevésbé gyulladásokra.

1.3 A kis GTPázok

A kis GTPázok olyan fehérjék, melyek a sejt plazmában találhatóak és szerkezetileg a heterotrimer, nagy G-proteinek α alegységével homológok. Képesek a guanozin-trifoszfát (GTP) hidrolízisére, melynek eredménye egy szervetlen foszfát és egy guanozin-difoszfát (GDP) molekula. GDP-hez kötött formájuk inaktív, ellentétben a GTP kötött formával, mely egy effektor molekulához kötődve további jelátviteli folyamatokat képes elindítani. A kis GTPázok molekuláris kapcsolóként funkcionálnak a guanin-nukleotid kicserélő faktorok (GEF, guanine exchange factor) és a GTPáz aktiváló proteinek segítségével (GAP, GTPase activating protein). A GEF-ek biztosítják a GDP hatékony disszociációját a kis GTPázból, amíg a GAP-ek a GTP gyors hidrolíziséhez járulnak hozzá.

1.3.1 Ras

A Ras protein első tagjait patkány szarkómában fedezték föl, innen is ered a rövidítés (Rat sarcoma). A Ras protein család tagjai a kis GTPázokhoz tartoznak, vagyis aktiválódásukhoz szükséges GTP kötni és hidrolizálni. A Ras fehérjét a *ras* gén kódolja és tipikus képviselője a Ras szuperfamilia, melyek hasonlóak 3D-s szerkezetükben. Változatos sejttevékenységeket szabályoznak és fontos jelátviteli utak részei. A Ras GTPázok aktiválódása a kötött GDP GTP-re cserélődésével kezdődik, melyet guanin-nukleotid cserélő faktorok (GEF) segítenek. A GEF-ek először hozzákapcsolódnak a Ras-hoz, ami elősegíti a GDP disszociációját, aztán a megkötött GTP hatására a GEF leválik és a Ras aktív formába kerül. Jól ismert GEF-ek pl. a Sos (Son of Sevenless), és a Cdc25. A Ras-GTP hozzákötődik a Raf1 molekula RBD doménjéhez, aminek a foszforilálódása szükséges, de nem elégséges a Raf1 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) aktiválásához, mivel ehhez a Raf1 további fehérje-fehérje, és membrán-lipid

kapcsolatot is igényel. A MAPK kaszkád általi jelek a sejt növekedésében és osztódásában részvevő gének átírásához vezetnek. Amíg a GEF-ek egy „toló-húzó” katalízissal érik el a GDP eltávolítását, addig a GTPáz aktiváló fehérjék (GAP-ok) jelentősen megnövelik a Ras GTP hidrolizáló hatását, ami alapállapotban nagyon lassú. Ezáltal a GAP-ok felgyorsítják a Ras inaktiválódását. Mivel a GTP sejten belüli koncentrációja nagyjából tízszerese a GDP-nek, a GTP magától is bediffundál a Ras nukleotid kötő zsebébe. A GEF és GAP aktivitás egyensúlya meghatározza a Ras nukleotid kötő státuszát, ezáltal szabályozva aktiváltsági állapotát. Egy másik fehérje, ami még befolyásolja a Ras aktivitását a GDP disszociációs inhibitor (GDI, GDP dissociation inhibitor), mely lelassítja a GDP GTP-re történő cseréjét, meghosszabbítván a Ras inaktív állapotát. Ras szabályozás alatt levő útvonalak szabályozzák többek között a sejtnövekedést, migrációt, differenciációt, adhéziót, apoptózist, osztódást és túlélést. Klinikai szempontból a Ras alcsalád említésre méltó tagjai közé tartozik a H-Ras, a K-Ras és az N-Ras, főleg a különböző tumorok létrejöttében betöltött szerepük miatt. Tumorokban a Ras és a Ras-sal kapcsolatban levő fehérjék gyakran elveszítik a megfelelő szabályozásukat, ami fokozott áttétképződéshez és csökkent apoptózishoz vezet. A *ras* gén mutációi folyamatosan aktív Ras fehérjét eredményezhetnek, ami a jelátviteli út folyamatos bekapcsoltságát, valamint korlátlan növekedést és osztódást eredményezhet. Az emberi tumorok 20-25%-ban találnak Ras mutációt, de bizonyos tumorok esetében ez az érték elérheti a 90%-ot is (pl. hasnyálmirigyák).

1.3.2 Rac1

A Rac1 (Ras related botulinum toxin substrate 1) egy minden sejtben jelenlévő fehérje, mely fontos szerepet játszik a membránokon keresztüli forgalom, a sejtmozgás és a sejtmorfológia szabályozásában. A *rac1* gén kódolja, és a Rho GTPáz családba tartozik, melynek klasszikus alcsaládjai: a Rac, a Cdc42, a Rho és a Rif. Hasonlóan a többi kis GTPázhoz, a Rho család tagjainak működését is az inaktív GDP-t, és az aktív GTP-t kötő állapot jellemzi. Aktivitásukat ugyanazon funkciójú fehérjék szabályozzák, mint a Ras családot: GEF-ek, GAP-ok, GDI-ok. A Rac alcsalád három izoformát tartalmaz: Rac1, Rac2 és Rac3. A Rac1 megtalálható a legtöbb szövetben, a Rac2 hematopoetikus eredetű sejtekben, míg a Rac3 főleg a központi idegrendszerben expresszálódik. A Rac1 olyan folyamatok szabályozásában vesz részt, mint amilyen a lamellopódium-,

membránfodrok kialakulása, sejtciklus, sejtadhézió és mobilitás. Mindezek mellett a Rac1 szabályozza az excitózisos, endocitózisos, beleértve a klatrin dependens endocitózisos folyamatokat. Vannak más típusú, Rac1-hez kötődő élettani folyamatok is, mint amilyen: sejt redox állapotának, sejtmozgások, jelátviteli utak, gén expressziók és sejt differenciáció szabályozása. Egyes feltételezések szerint a legtöbb típusú sejtben a ROS alacsony szintű, Rac-hoz kötődő fenntartása szerepet játszik a sejt növekedésben, differenciációban, migrációban, angiogenezisben valamint a gyulladásban is. A Rac1 részt vesz a NADPH oxidázok (NOX1, NOX3, NOX4) szabályozásában és kifejeződik nem fagocita sejtekben is, mint pl. a fibroblasztok vagy epitel sejtek, míg a Rac2 elsősorban a fagocita sejtekben levő NOX2 (Gp91phox) szabályozásában játszik fontos szerepet.

1.4 Az OGG1 DNS javítástól független funkciói

Előző tanulmányokban már utaltak az OGG1 DNS javítástól független sejt folyamatokban betöltött szerepére. Kimutatták az OGG1 kolokalizációját centriólumokkal, mikrotubulus hálózatokkal, valamint a mitótikus kromozómákkal, feltételezve a szerepét a kromatin átrendezésben és a transzkripció kezdeményezésben. Az OGG1 chaperonként viselkedve megvédi a mitokondriális akonitázt az oxidatív behatásoktól megelőzve ezzel a mitokondrium károsodását és az apoptózist. TNF α hatására növeli a Cxcl2 (monociták és makrofágok által termelt citokin) expresszióját befolyásolva ezzel a természetes immunválaszt. Az OGG1 a Cxcl2 promóter régiójához kötődve elősegítette bizonyos transzkripciós faktorok (NF- κ B/RelA, Sp1, p-RNS polimeráz II) toborzását.

Ahogy azt már az előzőekben említettük, az OGG^{-/-} egerek rezisztensebbek a gyulladásokkal szemben, ami felveti a lehetőségét, hogy nem a genomban, hanem a BER által kivágott, szabad állapotban levő 8-oxoG jelenti az összekötő lánczemet bizonyos betegségekhez/öregedési folyamatokhoz. Habár már az OGG1 több, DNS javító funkciójától független szerepét leírták, az OGG1 és a szabad 8-oxoG komplex által aktivált kis GTPáz proteinek általi jelátviteli utak még nem kerültek feltárássra.

2. Célkitűzések

Az OGG1^{-/-} egereken végzett előzetes tanulmányok azt sugallják, hogy az OGG1 aktivitás hiánya összefüggésbe hozható oxidatív stresszhez és egyéb sejtválaszokhoz kapcsolódó jelátviteli utak csökkent működésével. Ezek a megfigyelések felvetik a lehetőségét, hogy a DNS-ből kivágott, szabad 8-oxoG fiziológiás/patofiziológiás jelentőséggel bírhat. A célkitűzésünk az volt, hogy kiderítsük vajon a 8-oxoG és/vagy az OGG1 képes-e aktiválni kis GTPázokkal kapcsolatos jelátviteli utakat.

Hipotéziseink:

- a 8-oxoG-nak van további biológiai szerepe a kivágás után és nemcsak DNS javítás semleges mellékterméke,
- mind a kívülről bevitt, mind a DNS-ből kivágott 8-oxoG képes sejtes válaszokat kiváltani,
- a szabad 8-oxoG hozzákapcsolódik az OGG1-hez,
- a 8-oxoG/OGG1 komplex képes aktiválni a Ras és Rac1 kis GTPázokat,
- a 8-oxoG/OGG1 komplex ROS termelést indukál a NADPH oxidázon keresztül a Rac1 aktiválása által.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Sejtkultúrák

Humán diploid fibroblaszt (MRC-5) EMEM, humán cervix carcinoma (HeLa) sejtek DMEM, humán alveoláris epitél sejtek (A549) Ham's F12, humán monocita sejtvonal (U937) RPMI-1640, humán mieloid eredetű monocita sejtvonal (KG-1) IMDM médiumokban voltak fenntartva, 10% főtális borjúsérum szérum (FBS), glutamin, penicillin, streptomycin hozzáadásával, 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó környezetben. A KG-1 sejtek aktiválása 10 ng/ml PMA-val és 100 ng/ml ionomicinnel történt (4 nap, 37 °C). A monocita eredetű dendritikus sejtekhez Buffy Coat-ból izoláltuk Ficoll-Paque gradiensen mononukleáris sejteket, melyekből pozitív szelekcióval tisztítottunk CD14+ monocitákat mágneses gyöngyökkel. A tisztított monocitákat szerummentes AIMV médiumban tenyésztettük 100 ng/ml IL-4, 75 ng/ml GM-CSF hozzáadásával a 0. és a 2. napon. A differenciáltatás az 5. napon, gyulladáscsökkentő koktéllal (TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF, PGE2) történt.

3.2 Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a National Institutes of Health Guidelines for Use of Experimental Animals és a University of Texas Animal Care and Use Committee (Protocol number: 0807044A) irányelvei alapján végeztük. 8 hetes BALB/c egereket kezeltünk intranazálisan 60 μ l, 8-oxoG (1 μ M) tartalmú fiziológiás sóoldattal majd 15 perc elteltével feláldoztuk az állatokat és a tüdejükből lízispuffer segítségével homogenizátumot készítettünk a Ras/Rac1 szintek méréséhez.

3.3 GTP-kötött Ras és Rac szintek mérése

A Ras és Rac szinteket „Active Ras/Rac Pull-down and Detection Kit” segítségével mértük a gyártó (Pierce, Thermo Scientific Inc) utasítása alapján, kisebb módosításokkal. Az aktivált Ras/Rac1 kimutatása Western blottal, a kvantifikálás denzitometriával történt.

3.4 Protein-interakció vizsgálatok

Az OGG1 és a polihisztidinnel (His) jelölt H-, K-, vagy N-Ras közötti kapcsolat vizsgálata nikkel-nitriлотricetsav (Ni-NTA)-agaróz gyöngyök felhasználásával történt. A His-Ras fehérjét interakciós pufferben 4 °C-on, 30 percig inkubáltuk a Ni-NTA gyöngyökkel, majd háromszori mosás után hozzáadtuk az OGG1 ± 8-oxoG-t GTP/GDP jelenlétében vagy hiányában. A mintákat újabb 30 perc, 4 °C-os inkubálás után mostuk kétszer, majd a fehérjét leoldottuk Laemmli pufferrel és Western blottal analizáltuk. Az OGG1 és Rac1 protein közötti kölcsönhatást ELISA-val mutattuk ki. Rac1 ellenanyaggal fedett platyukához adtunk GTP/GDP-vel töltött, vagy guanin nukleotid nélküli Rac1-et PBS-Tween pufferben OGG1/8-oxoG-vel együtt vagy anélkül és 1 órán át szobahőn tartottuk. Mosással eltávolítottuk a le nem kötődött fehérjét és először anti-OGG1, majd HRP-konjugált, másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a mintáinkat, ami után a TMB szubsztráttal kapott színreakciót foszfor-savval leállítottuk és az abszorbanciát mikroplate olvasóval meghatároztuk.

3.5 Western blot analízis

A tüdő vagy sejtlizátumokat centrifugálással üleptítettük, majd a felülúszókat fehérjemérés után mintavivő pufferrel kevertük és 95 °C-on tartottuk 5 percig. A mintákat 5-20% SDS-PAGE gélen megfuttattuk és Hybond-ECL nitrocellulóz membránra transzferáltuk át. A membránokat 3% BSA-val blokkoltuk (TBS, 0,1% Tween) 3 órán át, majd az elsődleges ellenanyagokkal (TBS-Tween-ben hígítva) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Ezután a membránokat mostuk, és hozzáadtuk a 5% tejpórt tartalmazó TBS-Tween pufferben hígított, HRP-konjugált másodlagos ellenanyagokat 1 órára, majd újabb mosás után a sávokat ECL szubsztrát segítségével előhívtuk.

3.6 A 8-oxoG oldat elkészítése

A 8-oxoG-t (és a többi nukleotid bázist) 12 mM-os NaOH felhasználásával oldottuk fel, amiből 4 mM-os törzsoldatot készítettünk, majd tovább hígítottuk a kívánt koncentrációra PBS-ben (pH 7,4).

3.7 Fluoreszcens spektroszkópia

Az OGG1 8-oxoG kötő képességét a fehérje saját triptofán fluoreszcenciájának változása alapján mértük. Röviden, 0,5 μM OGG1-et inkubáltunk növekvő mennyiségű (0,1-2 μM) 8-oxoG-al (8-oxodG-t vagy FapyG-t használtunk kontrollként) 10 percig, 24 °C-on 1 mM DTT-t tartalmazó Tris-HCl pufferben. A triptofán fluoreszcenciát ($\lambda_{\text{em}} = 290\text{--}400\text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 280\text{ nm}$) SPEX FluoroMax spektrofluorométerrel (Horiba Jobin Yvon Inc.) mértük. A K_d értéket a ΔF vs ligand koncentráció függvényében határoztuk meg az alábbi egyenlet alapján: $\Delta F = \Delta F_{\text{max}} [\text{ligand}]/K_d = [\text{ligand}]$.

3.8 Guanin nukleotid-csere esszé

Nukleotidmentes H-Ras-t töltöttünk fel azonos mennyiségű GTP/GDP-vel 20 mM Tris-t (pH 7,5) tartalmazó pufferben, melyhez 50 μg borjúsérum albumint is adtunk. A guanin nukleotid-cserét OGG1 \pm 8-oxoG hozzáadásával indítottuk 10 szerez GTP γ S vagy GDP jelenlétében. 1:1 és 10:1 Ras és OGG1 \pm 8-oxoG moláris arányokat állítottuk be és a mintákat a következő időpontokban vettünk: 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 és 32 perc. A Ras-GTP szintben bekövetkező változásokat aktív Ras pull-down esszével határoztuk meg. A GDP-GTP valamint a GTP-GDP kicserélődését a Rac1 fehérjénél valós idejű fluoreszcens módszerrel határoztuk meg. A Rac1-et ^{Mant}GTP-vel vagy ^{Mant}GDP-vel töltöttük fel 20 mM Tris-t és 50 μg borjúsérum albumint tartalmazó pufferben (30 percig). A GDP-GTP kicserélődésnél a Rac1-^{Mant}GDP és az OGG1/8-oxoG-t kevertük jelöletlen GTP-vel, a GTP-GDP verzióban ^{Mant}GTP-t és jelöletlen GDP alkalmaztunk. A ^{Mant}GTP/GDP fluoreszcenciában bekövetkező változást POLARstar Omega plate olvasóval követtük nyomon, az elemzéshez a POLARstar Omega szoftverét valamint MS Excel-t használtunk.

3.9 Génexpresszió és molekuláris hálózat vizsgálat

MRC-5 sejteket kezeltünk 10 μM 8-oxoG-al, majd a sejteket különböző időpontokban lizáltuk és a mintákból RNS-t izoláltunk. Dupla szálú cDNS és biotinnal jelölt cRNS szintézise után ez utóbbit Affymetrix GeneChip Human Genome Focus Array-ekhez hibridizáltattuk. Az Affymetrix Microarray Suite által kiolvasott elsődleges adatokat

tovább processzáltuk hálózatok, útvonalak, és funkcionális elemzéséhez, melyet Ingenuity Analysis (IPA) szoftver segítségével végeztünk.

3.10 Áramlási citometria

A sejtfelszíni markerek expresszióját direkt vagy indirekt immunfluoreszcens jelöléssel kiviteleztük és FACScalibur áramlási citométeren végeztük. Az elemzéshez 10 ezer sejtet számoltattunk a CellQuest programmal. A szubcelluláris részecskéket kizárása után a további adatelemzést WinMDI szoftverrel végeztük.

3.11 Latex gyöngyök felvételének mérése

A kezeletlen és aktivált sejteket (5×10^5 /ml) 5×10^6 /ml carboxiláttal módosított, 1 μ m átmérőjű latex gyöngyökkel inkubáltuk 48 órán át, 37 °C-on a kontroll sejteket 4 °C-on. A sejtek gyöngyfelvételét mosás után áramlási citometriával mértük.

3.12 Lucifer Yellow felvétel

Aktivált és kontrol sejteket (1×10^6 /ml) inkubáltunk együtt 250 μ g/ml Lucifer Yellow-val 37 °C-on és 4 °C-on 1 óra hosszan át, majd mosás után a mintákat áramlási citometriával elemeztük.

3.13 FITC-dextran felvétel

1 mg/ml FITC-dextránt adtunk 1×10^6 /ml aktivált, illetve kontrol sejtekhez 37 °C-on és 4 °C-on, majd 1 óra inkubálást követő mosás után a mintákat áramlási citometriával elemeztük.

3.14 Kemotaxis esszé

A sejtvándorlást többlyukú, mikrochemotaxis kamrában vizsgáltuk. 1×10^6 sejtet felfuszpendáltunk 1 ml, 0,5 % BSA tartalmú RPMI médiumban. A felső kamrába $3,5 \times 10^5$ sejtet adtunk 350 μ l médiumban, míg az alsó kamrába 430 μ l, különböző koncentrációjú, rekombináns MIP-3 β -t pipettáztunk. A sejteket 3h, 4h és 5h át hagytuk vándorolni 37 °C-on, CO₂ inkubátorban 5 μ m-es filteren keresztül. A vándorló sejtek számát MTT esszével határoztuk meg.

3.15 Génexpresszió leszabályozása

A sejteket 20 nM kontrol vagy génspecifikus siRNS-ekkel transzfektáltuk (H-Ras, K-Ras, N-Ras, Rac1, OGG1, NOX4, p22phox) INTERFERin transzfekciós reagens segítségével 3 órán át szérummentes médiumban, majd további 72h át teljes médium jelenlétében. A célgének mRNS szintjét qRT-PCR, fehérje szintjét Western blot módszerrel határoztuk meg.

3.16 Kvantitatív valós-idejű PCR (qRT-PCR)

A qRT-PCR méréseket SYBRGreen jelöléssel és ABI 7000 készülék és szoftver alkalmazásával végeztük a gyártó ajánlása szerint. A primerek specifikusságát disszociációs fázis hozzáadásával ellenőriztük, az expressziós szinteket a delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) módszerrel határoztuk meg.

3.17 Oligonukleotid bemetszés esszé

A maglizátumokban található OGG1 javító aktivitását egy 8-oxoG-t tartalmazó, radioaktív foszforral (^{32}P) jelölt, 31 tagú oligonukleotid felhasználásával határoztuk meg. Az elhasított terméket az intakt szubsztráttól 8 M ureát tartalmazó, 20%-os poliakrilamid gélen különítettük el Trisborát-EDTA pufferben. A DNS sávok radioaktivitását Storm 860 PhosphorImager-rel tettük láthatóvá és ImageQuant szoftverrel denzitometráltuk.

3.18 Sejtek ROS szintjének meghatározása

A sejtek ROS szintjének meghatározását 2'-7'-dihidro-diklorofluorescein diacetát ($H_2DCF-DA$) felhasználásával végeztük. A sejteket 70%-os konfluenciáig növesztettük majd 50 μM $H_2DCF-DA$ -val inkubáltuk 30 percig szérummentes médiumban 37 °C-on. A sejteket ezután PBS-el mostuk, majd hozzáadtuk a nukleinsav bázisokat, nukleozidokat, illetve az oldószer kontrollt. A DCF fluoreszcenciában bekövetkező változásokat Flx800 mikroplate olvasóval rögzítettük (Ex: 485 nm, Em: 528 nm).

3.19 Mikroszkópos vizsgálatok

A fedőlemezeken tenyésztett sejteket pHyper-Cyto/dMito/Nuc vektorokkal transzfektáltak és 72 h-val később 10 μM 8-oxoG-al vagy 10 μM hidrogén-peroxiddal kezeltük. A jelzett időpontokban a sejteket PBS-el mostuk, 3,7 %-os paraformaldehiddel fixáltuk, szárítottuk, majd tárgylemezre rögzítettük. A képeket Nikon Eclipse Ti System mikroszkóppal készítettük 125x nagyítással.

A kolokalizáció vizsgálatához a fedőlemezeken tenyésztett sejteket 8-oxoG-al (10 μM) illetve kontrol oldattal kezeltük 30 percig, majd 4 %-os paraformaldehiddel fixáltuk 4 °C-on, majd Triton X100-al permeabilizáltuk 37 °C-on. A sejteket 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal (Rac1, OGG1, NOX4, lamin A/C). Másnap, mosás után hozzáadtuk a fluoreszcens festékekkel jelölt másodlagos ellenanyagokat (Alexa-488, Alexa-594 vagy Texas Red) és 1 órát inkubáltuk a mintákat szobahőn, majd a le nem kötődött ellenanyagokat lemostuk. A mikroszkópos felvételeket Nikon Eclipse Ti System mikroszkóppal készítettük (nagyítás: 125x), a kolokalizációkat a vörös és zöld jelölésű felvételek szuperimpozíciójával, a Nikon NIS Elements szoftverrel tettük láthatóvá. A kolokalizációs koefфициenseket a Mander's féle formulából kaptuk: $R = \frac{\Sigma S1 \times S2}{\sqrt{\Sigma(S1)^2 \times \Sigma(S2)^2}}$, amiben S1, S2 = pixelek szignál intenzitása az 1. ill. 2. csatornában, az átfedési koefфициensek k_1 és k_2 felosztják a kolokalizációt egy pár különálló paraméterre: $k_1 = \frac{\Sigma S1 \times S2}{\Sigma(S1)^2}$; $k_2 = \frac{\Sigma S1 \times S2}{\Sigma(S2)^2}$.

3.20 Statisztikai elemzés

Az adatokat az átlag \pm standard deviáció (SD) formában adtuk meg. Az eredmények szignifikánságát ANOVA teszttel és Student-féle t-próbával elemeztük. A különbségeket szignifikánsnak vettük amennyiben $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4. Eredmények és megbeszélés

4.1 A 8-oxoG általi transzkripció szinten aktivált jelátviteli utak

Szabad 8-oxoG kizárólag az OGG1 által kezdeményezett DNS javítás során keletkezik. A sejten belüli 8-oxoG szintemelkedés modellezéséhez 8-oxoG-t adtunk aktiv OGG1-el rendelkező diploid sejtekhez (MRC-5) és elemeztük a transzkripció szinten bekövetkező változásokat Affymetrix GeneChip-ek felhasználásával. A microarray adatok alapján az Ingenuity Pathway Analysis (IPA) azt mutatta, hogy a legelső 10 aktivált jelátviteli útvonal közül 8-ban szerepet játszik a Ras kis GTPáz.

4.2 Ras aktiváció sejtvonalakban és tüdőben

A sejtekhez adott 8-oxoG dózis-, és időarányosan változtatta meg a GTP-kötött Ras mennyiségét, megerősítvén ezzel a transzkripció szinten látott Ras aktivációt. A Ras-GTP szint időbeli emelkedése arányos volt a 8-oxoG gyors felvételével: az LC/IDMS mérések alapján 1 perccel a hozzáadás után a 8-oxoG 70 %-a sejtekbe jutott. A legalacsonyabb 8-oxoG koncentráció, ami még kimutathatóan emelte a Ras-GTP mennyiségét MRC-5 sejtekben 100 nM volt. 10 µM 8-oxoG koncentráció fölött már nem mértünk változást az aktivált Ras mennyiségében. A szabad 8-oxoG egyedülálló módon emelte a Ras-GTP szintjét, amire sem a 8-oxodG vagy guanin, sem más oxidált bázis (FapyG, 8-oxoA) nem volt képes. A sejtvonalakon kapott eredmények *in vivo* relevanciáját egereken teszteltük. Az intranazálisan adott 8-oxoG szignifikánsan megnövelte a kezelt egerek tüdejében a Ras-GTP szintet a kontroll csoporthoz viszonyítva.

4.3 A Ras nem aktiválódik, ha az OGG1 csendesített

Mivel a 8-oxoG-t az OGG1 ismeri fel és vágja ki a DNS-ből, feltételeztük, hogy a Ras aktiválást a 8-oxoG az OGG1-hez kötötten fejt ki. A hipotézisünk bizonyításához csendesítettük az OGG1 fehérjét MRC-5 valamint HeLaS sejtekben és 8-oxoG kezelés után megmértük a Ras-GTP mennyiségét. Az siRNS csendesítés az MRC-5 illetve a HeLaS sejt kultúrákban lecsökkentette az OGG1 RNS szintjét (20%-ra a kontrollhoz viszonyítva) és a 8-oxoG kezelés nem okozott emelkedést a Ras-GTP szintben.

4.4 A kivágott 8-oxoG Ras aktiváló hatása: a KG-1 model

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk az intracellulárisan felszabadult 8-oxoG szerepét a Ras aktivációjában, egy humán akut mieloid leukémia sejtvonalat (KG-1) használtunk, ami a hematopoetikus differenciáció egy korai fázisában megrekedt. A sejtvonalt túlnyomó részt mieloblastokból és promielocitákból áll és a sejtek képesek spontán monocita-, valamint granulocita-szerű sejtekké differenciálódni. Megfelelő citokin koktéllal kezelve a KG-1 sejtek dendritikus sejt-szerű (DC) morfológiát és fenotípust vesznek föl. Funkcionálisan a KG-1 eredetű DC-k képesek allogén T-sejtes választ kiváltására és latex gyöngyök felvételére.

Korábbi kísérleteink során már jellemeztük a KG-1 sejtek néhány funkcionális tulajdonságát összehasonlítva a monocita eredetű éretlen DC-vel. Azt találtuk, hogy a KG-1 sejtek pinocitózis (Lucifer Yellow felvétel), valamint makropinocitózis (FITC-dextrán felvétel) készsége hasonló az éretlen dendritikus sejtékéhez és expresszálják mannóz receptort (CD206) is. A fagocitózis képességük (latex gyöngyök felvétele) ugyanakkor kevésbé hatékony az éretlen DC-kéhez képest. Migrációs készségük (MIP-3 β kemokin hatására), a magas CCR7 kemokin receptor expressziójuk ellenére, messze elmarad a monocita eredetű DC-kétől. A megfigyeléseink azt sugallják, hogy a KG-1 sejtek több szempontból is összevethetők a professzionális antigén prezentáló sejtekkel, azonban bizonyos fenotípusos és funkcionális tulajdonságukat aktiváció után is megtartják.

A KG-1 sejteket az OGG1 fehérje hőlabilitással járó mutációjára (OGG1^{R229Q}) teszteljük alkalmas modellé a kivágott 8-oxoG hatásainak a tanulmányozására. Ezen mutáció következtében az OGG1 fehérje 25 °C-on aktív, azonban 37 °C-on nem, ami lehetővé teszi a 8-oxoG mennyiségének jelentős megnövekedését a DNS-ben fiziológias hőmérsékleten. Megjegyzendő, hogy ez a mutáció nem befolyásolja a sejtek életképességét, viszont lehetővé teszi a 8-oxoG javítás következményeinek vizsgálatát ROS hozzáadása nélkül.

Az OGG1 működésének ellenőrzésére KG-1 és U937 sejt(mag)lizátumok 8-oxoG kivágó és Ras aktiváló képességét teszteltük 25 °C illetve 37 °C-on. A kontrollként használt U937 sejt OGG1 aktivitása nem mutatott lényeges különbséget 25 °C ill. 37 °C-on, ellentétben a KG-1 sejtékével, melyek 37 °C-on nagyon gyenge, viszont 25 °C-on az U937-es kontrollhoz hasonló aktivitást mutattak. A Ras-GTP szint

méréséhez a KG-1 sejteket 37 °C-ról áttettük 25 °C-ra 45 illetve 90 percre, míg a kontroll sejteket 37 °C-on hagytuk. Az eredményeink szerint a Ras-GTP szint 25 °C-on 45 percnél megemelkedett és 90 percnél tovább nőtt, amíg 37 °C-on nem történt mérhető Ras aktiváció. Az U937-es sejtek esetében nem volt különbség a 25 °C és a 37 °C-on mért Ras-GTP szintek között. Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltételezésünket, hogy az OGG1 által kezdeményezett bázis-kivágó javítás kapcsolatban van a Ras GTPáz aktivációval.

A GEF-ek és a GAP-ek működését befolyásolhatja a hőmérséklet-változás, ami hatással lehet a Ras-GTP ill. a Ras-GDP szintekre. Azért, hogy KG-1 sejtekben kizárjuk ennek a lehetőségét, siRNS-el leszabályoztuk az OGG1-et, azután 25 °C-on tartottuk azokat 90 percig. Az OGG1 csendesített sejtekben nem mértünk Ras aktivációt ellentétben a kontroll siRNS-el transzfektált sejtekkel.

4.5 Az OGG1 képes a szabad 8-oxoG-t a katalitikus zsebtől független helyen megkötni

Sok esetben a ligand megkötnése megváltoztatja a protein saját triptofán (és/vagy tirozin) fluoreszcenciáját, ha a ligandkötő hely elég közel van triptofánhoz (Trp) vagy a kötődés konformáció változással jár. Ezekben az esetekben a ligand megkötnése a saját fluoreszcencia kioltását eredményezheti és az intenzitáscsökkenésből meghatározható az adott protein-ligand kötésre jellemző disszociációs állandó (K_d) értéke. A koncentráció-függő Trp fluoreszcencia csökkenés az OGG1 esetében a szabad 8-oxoG megkötnése által okozott konformáció-változásra utal. A 8-oxoG erős kötődését jelenti a $0,56 \pm 0,19$ nM disszociációs állandó, amit a kötődési izotermák alapján határoztunk meg. A kontrollként használt 8-oxodG illetve FapyG nem kötődött az OGG1-hez, annak ellenére, hogy a DNS-ben mindkettő szubsztrátja. Azt is megfigyeltük, hogy a 8-oxoG kötődése koncentráció-arányosan megnövelte az OGG1 aktivitását, ami szintén azt támasztja alá, hogy az OGG1 rendelkezik egy katalitikus zsebtől független 8-oxoG kötő hellyel.

4.6 Az OGG1/8-oxoG komplex GEF-ként működik a Ras fehérjével kapcsolatba lépve

Az OGG1 és Ras lehetséges kapcsolatát vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az OGG1 a 8-oxoG jelenlétében volt képes hozzákötődni a H-Ras fehérjéhez. Mivel az OGG1 magában nem kötődött a Ras-hoz, az arra engedett következtetni, hogy a 8-oxoG megkötése általi konformáció-változás szükséges a kapcsolódáshoz. A legerősebb kötődést a nukleotidmentes Ras esetében, a Ras-GDP-hez gyengébb, a Ras-GTP-hez pedig a leggyengébb kötődést mértük. Ezek az eredmények egybecsengtek az irodalomban közölt adatokkal, amelyek szerint a nukleotidmentes Ras képes kialakítani a legstabilabb konformációt az adott GEF molekulával. Az OGG1 8-oxoG jelenlétében a Ras-hoz kötött GDP-t GTP-re cserélte le azonos vagy nagyobb moláris H-Ras:OGG1 aránynál. A 8-oxoG vagy OGG1 önmagában nem okozott GDP-GTP cserét. Az OGG1/8-oxoG komplex, a GTP GDP-re történő cserében is hatékony volt, ami azt sugallja, hogy hasonlóan más Ras-GEF-ekhez, működése független Ras-hoz kötött nukleotidtól.

4.7 A 8-oxoG általi Ras aktiváció MAPK-ok foszforilációját eredményezi

A Ras-GTP hozzákötődik a Raf1 szerin/treonin kináz Ras-kötő doménjéhez (RBD), és aktiválja a mitogén-aktivált protein kinázt (MAPK). MRC-5 sejtekben a 8-oxoG kezelés megnövelte mind a MAPK kinázok (MEK1/2), mind az extracellulárisan szabályozott kinázok (ERK1/2) foszforiláltságát, valamint az utóbbi sejtmagba történő transzlokációját. A PD98059 MEK1/2 inhibitor viszont gátolta a 8-oxoG valamint a PDGF általi foszforilációt és transzlokációt. Annak igazolására, hogy a 8-oxoG kezelt sejtekben az ERK1/2 foszforilációja Ras-függő, siRNS-ekkel lecsendesítettük a fő Ras izoformákat (H-, K-, N-Ras). Az eredményeink alapján, MRC-5 sejtekben elsősorban az N-Ras vesz részt az ERK1/2 foszforilálásában 8-oxoG kezelés hatására. Az eddigi eredmények azt sugallják, hogy az OGG1 a 8-oxoG kivágásával (és megkötésével) komplex jelátviteli útvonalakat képes aktiválni.

4.8 A 8-oxoG kezelés megnöveli a sejtekben a ROS szintet

Irodalmi adatok alapján az OGG1 csendesítése lecsökkenti a poratka kivonat által indukált ROS mennyiségét MLE-12 sejtvonalban. Azt feltételezik, hogy az OGG1 kifejeződése befolyásolja az oxidatív stressz mértékét asztmatikus körülmények között. Ezekből az előzetes eredményekből kiindulva megnéztük, hogy szabad 8-oxoG hozzáadásával megnövekszik-e a sejtekben a ROS mennyisége valamilyen OGG1-től függő mechanizmuson keresztül. Azt találtuk, hogy 8-oxoG kezelés hatására a ROS szint megnövekedett mind az MRC-5, mind az A549 sejtvonalakban. Előkezelve a sejteket N-acetil-L-ciszteinnel (glutation szintézis prekursor), egy antioxidánsal, meg tudtuk akadályozni a 8-oxoG általi ROS szint emelkedését. Mindemellett az OGG1 csendesítésével szignifikánsan csökkent a 8-oxoG által indukált ROS mennyisége. Az összehasonlító vizsgálatainkban sem az adenin, guanin, 8-OH-Ade vagy a FapyG nem volt ilyen ROS növelő hatással. A 8-oxoG által indukált ROS szint emelkedés kinetikája egy indirekt, más közvetítő/szabályzó molekulákat is magába foglaló mechanizmusra enged következtetni

4.9 A 8-oxoG NADPH oxidázon (NOX) keresztül növeli a ROS szintet

Feltételezésünk szerint a 8-oxoG általi ROS növekedés a sejtben található oxidoreduktázok aktiválásán keresztül történik, melyek kis GTPázok közreműködését is igénylik. Az egyik ilyen szóba jövő fehérje, mely aktívan közreműködik a ROS termelésben és sejt redox állapotának a szabályozásában a NADPH oxidázokon keresztül a Rac1. A hipotézisünk bizonyítására a 8-oxoG hozzáadása előtt előkezeltek a sejteket DPI-al, egy gyakran alkalmazot NADPH oxidáz inhibitorral. A DPI kezelés lecsökkentette a 8-oxoG által indukált ROS szintet $62\pm 3\%$ -kal MRC-5 és $70\pm 7\%$ -kal A549-es sejtek esetén. A NADPH oxidáz szerepének felderítésére a p22phox, Rac1 és NOX4 fehérjéket siRNS-el csendesítettük MRC-5 és A549 sejtekben. A p22phox csendesítése a 8-oxoG által indukált ROS-t $64\pm 8\%$ -kal csökkentette MRC-5 és $69\pm 6\%$ -kal A549 sejtekben. A NOX4 specifikus siRNS MRC-5 esetében $67\pm 9,5\%$ -kal, az A549-ében $76\pm 4\%$ -kal, a Rac1 specifikus siRNS pedig $72\pm 3\%$ -kal MRC-5 és $68\pm 7\%$ -kal csökkentette a ROS szintet 8-oxoG kezelés után. Ezek az eredmények felhívták a figyelmünket a Rac1 fontosságára, ezért a következőkben megvizsgáltuk az OGG1 szerepét a Rac1 aktivációjában.

4.10 Rac1 aktiváció sejt kultúrákban

Először is megnéztük, hogy a szabad 8-oxoG megváltoztatja-e a sejtekben a Rac1-GTP mennyiségét. Az időkinetika alapján a GTP-hez kötött Rac1 szintje 0 percnél $0,78 \pm 0,2\%$ volt MRC-5, és $0,74 \pm 0,1\%$ A549 sejtekben, 5 percnél felment $6,5 \pm 2\%$ -ra MRC-5 illetve $7,05 \pm 1,7\%$ -ra A549 esetében. Ezen adatok alapján a Rac1 aktiválódása gyorsabban ment végbe, mint a Ras GTPázé. Annak megerősítésére, hogy a Rac1-GTP szint növekedése is az OGG1-en keresztül történik, siRNS-el csendesítettük az OGG1-t mindkét sejtvonalban. Az eredményeink azt mutatták, hogy akár csak a Ras proteinnél a Rac1 esetében is az OGG1 szükséges a 8-oxoG általi aktivációhoz.

4.11 Rac1 aktiváció a tüdőben

A következőkben megvizsgáltuk, hogy a 8-oxoG bázis szöveti környezetben is megnöveli-e a Rac1-GTP mennyiségét. Intranazálisan 8-oxoG oldatot juttattunk egerek tüdejébe, majd a tüdőlizátumból Rac1 aktivációt mértünk. A fiziológiás kontrollhoz viszonyítva egy erős növekedést tapasztaltunk a Rac1-GTP szintben 15 perccel a kezelés után, ami egybevágott a sejteken kapott eredményeinkkel. A Rac1 nagy mennyiségben fordul elő a tüdőszövetben, ellentétben a Rac2 ill. a Rac3 izoformával, akár csak a modellként használt tüdő fibroblaszt (MRC-5) illetve tüdő alveoláris epitél (A549) sejtvonalainkban.

A Rac1 számos szerepet tölt be a tüdőszövetben. Az egyik ilyen, részvétel az aktin citoskeleton újrendezésében, ami az endoteliális határok visszaállításához és az endoteliális rések megszüntetéséhez vezet. A tüdő endotél sejteji NOX-ok minden összetevőjét tartalmazzák és fő termelői a tüdő gyulladásos folyamataiban megjelenő ROS-nak.

4.12 A ROS szint megváltozása a perinukleáris membránál kezdődik

A 4-es típusú NADPH oxidáz (NOX4) többféle sejt folyamatban is részt vesz, mint amilyen a helyi redox szabályozás vagy jelátvitel. A NOX4 elhelyezkedését leírták mind a citoplazmás terekben, mind a sejtmag membránjában. A 8-oxoG indukálta ROS termelés helyének meghatározása végett a sejteket oxidációra érzékeny és specifikus helyeken expresszálódó pHyper bioszenzor molekulákkal transzfektáltuk: pHyper-Cyto,

sejtplazma; pHyper-dMito, mitokondrium; pHyper-Nuc, sejtmag. A H₂O₂ kontrol a citoplazmában, a mitokondriumokban és a sejtmagban is indukált ROS-t. Amikor a sejteket 8-oxoG-al kezeltük a pHyper-Nuc fluoreszcencia jelent meg először a perinukleáris régióban (10-12 perc), azután a pedig a magban (~20 perc) és 60 perc alatt alapszintre esett vissza. A pHyper-Cyto által generált fluoreszcencia a sejtmag körül kezdődött (10-12 perc) és tovább terjedt a citoplazmába. A pHyper-dMito fluoreszcenciája kb. 20 percnél tűnt fel és csak néhány mitokondriumot érintett, ami azt sugallja, hogy ezen sejtszervekben a pHyper-dMito oxidáció csak másodlagos következménye volt a NOX4 által termelt ROS-nek. Az eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a ROS termelő NOX4 a nukleáris membránban helyezkedik el és a 8-oxoG által indukált ROS átmeneti jelenség.

4.13 A Rac1, OGG1 és NOX4 egymás közelében helyezkedik el magmembránban

Azért, hogy pontosabb képet kapjunk az OGG1, Rac1 és NOX4 egymáshoz való elhelyezkedéséről a magmembrán térségében, A549 sejteket jelöltünk specifikus ellenanyagokkal. Az irodalmi adatoknak megfelelően az OGG1 nagyobbik hányada a sejtmagban helyezkedett el, azonban kis része a magmembrán közvetlen közelében. A mikroszkópos felvételek azt mutatták, hogy a Rac1 és a NOX4 elhelyezkedése is a nukleáris membránhoz asszociált. A Manders formula segítségével, amely megbízhatóan jelzi a fehérjék egymáshoz való közelségét, meghatároztuk az OGG1 Rac1-hez és NOX4-hez való közelségét. Az eredmények az OGG1 kolokalizációját mutatták mind a Rac1-gyel, mind a NOX4-gyel, ami megerősíti a ROS termelés magmembránhoz kapcsolódó jellegét. A kontrollként használt lamin A/C fehérje jelölés szintén magmembrán elhelyezkedést mutatott, azonban Manders formula alapján nem kolokalizált az OGG1-el. Amíg az OGG1 kolokalizációja a Rac1-gyel és a NOX4-gyel egy új megfigyelés, más források már dokumentálták a NOX4 membrán asszociáltságát (a NOX1, NOX2-ét szintén) és komponenseik (p22phox, p47phox) valamint a Rac1 szerepét a lokális ROS termelésben.

4.14 Az OGG1 interakciója a Rac1 kis GTPázsal

Megnéztük, hogy az OGG1 és a Rac1 közötti kapcsolat hasonló-e, mint amit a Ras esetében láttunk. Az ELISA és Ni-NTA pull-down eredményeink azt mutatják, hogy az

OGG1 önmagában csak nagyon gyengén kötődik a nukleotidmentes Rac1-hez, amit viszont a 8-oxoG jelenléte jelentősen megnövel. Az OGG1/8-oxoG legerősebben a GDP-kötött, azután a nukleotidmentes, végül leggyengébben a GTP-vel töltött Rac1-hez kötődött. Ezek az adatok egyrészt bizonyítják a Rac1 és OGG1/8-oxoG közötti fizikai kapcsolódást, másrészt rámutatnak, hogy a legkedvezőbb kötődési konformációval a Rac1-GDP rendelkezik

4.15 Az OGG1/8-oxoG komplex a Rac1 GEF-jeként működik

Fluoreszcensen jelölt guanin nukleotid ($^{Mant}GTP/^{Mant}GDP$)-csere esszével teszteltük a lehetőségét annak, hogy az OGG1/8-oxoG komplex a Rac1 esetében is GEF-ként funkcionál. Amikor a Rac1 fehérjét ^{Mant}GDP -vel töltöttük meg (1:1 arányban), a fluoreszcencia intenzitás $1,36 \times 10^5$ FU-ról megnövekedett $1,9 \times 10^5$ FU-ra. Az OGG1/8-oxoG hozzáadása után, jelületlen GTP jelenlétében, a fluoreszcencia sebesen lecsökkent, jelezvén a ^{Mant}GDP kicserélődését GTP-re (50 %-kal 45 s alatt). A csak OGG1+GTP-t tartalmazó kontroll esetében nem változott a Rac1- ^{Mant}GDP fluoreszcenciája. Amikor ^{Mant}GTP -vel töltöttük a Rac1-et az alap fluoreszcencia érték megnövekedett $1,38 \times 10^5$ FU-ról $2,02 \times 10^5$ FU-ra, amit az OGG1/8-oxoG hozzáadása (jelületlen GDP-vel együtt) csak nagyon lassan csökkentett. Ezek az eredmények szinkronban vannak a Rac1-GTP valamint az OGG1/8-oxoG között tapasztalt gyenge kötődéssel és azzal, hogy a komplex hatékonyan katalizálja a GDP cseréjét GTP-re. A megfigyeléseink hasonlóak az ismert Rac1-GEF-ek (pl. Tiam vagy Vav2) működését leíró eredményekhez sőt, egyes GEF-ek esetében leírták kofaktorok vagy posztranzlációs módosítások szabályozó szerepét a hatékony GDP-GTP katalízishez. Például a foszfoinozitidek a Tiam pleksztrin homológ doménjához (PH) kötődve megnövelik annak GEF aktivitását. Az adataink azt sugallják, hogy az OGG1/8-oxoG komplex hasonlóan működik más Rac családhoz tartozó GEF-ekhez, melyek egy kofaktor (8-oxoG) megkötését igénylik a megfelelő konformáció kialakításához és ezáltal a Rac1-GDP-hez való kapcsolódáshoz.

4.16 A ROS-OGG1-Rac1 hármas szerepe sejtes válaszokban

Az irodalomban közölt eredmények alapján kiderült, hogy a ROS meg tudja változtatni az OGG1 javító aktivitását, sejten belüli lokalizációját a sejt DNS javítási szükségletei szerint. Kimutatták, hogy az OGG1 molekulák eloszlása megváltozik a sejtmagban a

lokálisan generált oxidatív stressz hatására. Szintén kimutatták, hogy a NOX4-ből származó ROS képes 8-oxoG-t generálni a DNS-ben és ezáltal bizonyos gének (gyulladásos válasz) expresszióját megváltoztatni. Az OGG1-et egy klasszikus DNS javító fehérjének tekintik, azonban megfigyeléseink szerint 8-oxoG-al komplexben képes mind Ras-, mind Rac1-GEF-ként funkcionálni. Azt feltételezzük, hogy a komplex nem csak kis GTPáz-függő útvonalakat aktiválja, hanem az jelátviteli utakhoz kapcsolódó gének transzkripcióját is inicializálja. Egy friss tanulmányban az OGG1-BER szerepét vizsgálták a gyulladáskeltő citokinek/kemokinek aktivációjában, ugyanakkor egy másik tanulmány az OGG1-BER szerepét mutatták ki a K-Ras-t és NF- κ B-t magába foglaló természetes immunválaszban. Habár mi csak azt mutattuk ki, hogy az aktivált Rac1 növeli a ROS szintet a NOX4 keresztül, ezen kívül más szabályozó folyamatokban is lehet szerepe. Ezt a hipotézisünket megerősítvén egy másik tanulmány azt közölte, hogy sejt kultúrákban, szövetekben az OGG1 8-oxoG jelenlétében, aktiválja a Rho-GTPáz-t, ami szabályozza az α -simaizom aktin (α -SMA) polimerizációját stressz rostokká. Ezáltal az OGG1-nek szerepe lehet a különböző krónikus betegségekben megfigyelt citoskeletális átrendeződésekben.

5. Új tudományos eredmények

A disszertáció az alábbi új tudományos eredményeket mutatja be:

- a 8-oxoG megkötése az OGG1 térszerkezeti változását eredményezi, ami lehetővé teszi a komplex kis GTP-ázokhoz való kötődését.
- mind a hozzáadott, mind a sejten belül keletkezett 8-oxoG képes aktiválni a Ras fehérjét.
- 8-oxoG kezelés után a tüdőben megnövekszik az aktivált Ras és a Rac1 fehérjék szintje.
- az OGG1/8-oxoG komplex képződése MEK/ERK aktivációhoz vezethet a Ras proteinen keresztül, valamint,
- reaktív oxigén gyökök képződéséhez a Rac1/NOX4 aktiválásán keresztül.

6. Összefoglalás

A DNS gyakori célpontja mind a külső, mind a belső eredetű oxidatív ágenseknek. Az egyik legtöbbször tanulmányozott oxidált DNS bázis a 8-oxoGuanin (8-oxoG), aminek mért mennyisége a szervezetet ért oxidatív stressz indikátoraként használható. A 8-oxoG kivágásáért a 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 (OGG1) felelős, ami a bázis-eltávolító javítás során kivágja az oxidált guanint mind a nukleáris, mind a mitokondriális genomból. Annak ellenére, hogy a 8-oxoG akkumulálódása a DNS-ben összeköthető az öregedéssel vagy olyan rendellenességekkel, mint a tumorok kialakulása és az Alzheimer-kór, az OGG1 knock-out egerek élettartama nem csökken, a tumor képződés valószínűsége csak kevéssé emelkedik bennük, valamint mind a krónikus oxidatív stresszel, mind a gyulladásos folyamatokkal szembeni állóképességük megnövekszik. Munkánk során az OGG1 egy olyan új működését írjuk le, amit a kivágott 8-oxoG megkötésével képes kifejteni. Bemutatjuk, hogy az OGG1 rendelkezik a katalitikustól független 8-oxoG kötőhellyel is és a kivágott termékével komplexben nemcsak sokkal hatékonyabban távolítja el az oxidált guanint, hanem olyan térszerkezeti változáson megy át, ami lehetővé teszi Ras és Rac1 szabályzó GTP-ázokhoz való kötődését. Ez a kapcsolódás elősegíti a GDP lecserélődését GTP-re, ami a GTP-ázok aktiválásához vezet. Kimutattuk, hogy 8-oxoG intranazális beadása után a tüdőben megnövekszik a Ras és a Rac1 fehérjék szintje. Az eredményeink szerint mind a hozzáadott, mind a sejten belül keletkezett 8-oxoG bázis képes az OGG1-gyel komplexet képezni és aktiválni a Ras fehérjét. Kimutattuk, hogy az OGG1/8-oxoG komplex képződése MEK/ERK aktivációhoz vezethet a Ras protein-, míg reaktív oxigén gyökök (ROS) képződéséhez a Rac1/NOX4 aktiválásán keresztül. Habár eredményeink biológiai jelentősége még nem teljesen ismert, úgy tűnik, hogy a Rac1 aktivációja és a lokalizált ROS termelés fiziológiás részét képezi az OGG1-által elindított, a DNS károsodásra adott sejtválaszoknak. Mivel az OGG1/8-oxoG komplex nemcsak a Rac1-gyet, hanem a Ras család klasszikus GTP-ázait is aktiválja, lehetséges, hogy a Rac1/NOX4/ROS és Ras általi jelátvitel a sejt homeosztázisának fenntartásában is szerepet játszik. Az OGG1 szabályozás feletti kontroll elvesztése a 8-oxoG molekulák fokozott eltávolításához, és ez által a Rac1 és Ras GTP-ázok túlzott aktiválásához vezethet, ami hozzájárulhat kóros sejtválaszok, valamint betegségek és az öregedési folyamatok kialakulásához.

7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/07/2015/PL
Típus: PhD Publikációs Lista

Jelző: Hajas György
Neptun kód: M056ZY
Doktori képzés: Molekuláris Biológiai és Immunológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapján szolgáltató közlemények

1. Hajas, G., Bácsai, A., Aguilera-Aguirre, L., Hegde, M.L., Tapas, K.H., Sur, S., Radák, Z., Ba, X., Boldogh, I.: 8-Oxoguanine DNA glycoylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1.
Proc Natl Acad Sci U S A 110:384-394, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1213041110>
IF: 9.71
2. Germán, P., Szarvaski, P., Hajas, G., Radák, Z., Bácsai, A., Hazra, T.K., Hegde, M.L., Ba, X., Boldogh, I.: Activation of cellular signaling by 8-oxoguanine DNA glycoylase-1-initiated DNA base excision repair.
DNA Repair 12 (10): 856-863, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.06.006>
IF: 3.362
3. Boldogh, I., Hajas, G., Aguilera-Aguirre, L., Hegde, M.L., Radák, Z., Bácsai, A., Sur, S., Hazra, T.K., Mitra, S.: Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycoylase bound to its excision product, 8-oxoguanine.
J Biol Chem 287 (25): 20769-20773, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C112.364620>
IF: 4.851
4. Hajas, G., Zsivcs, E., László, T., Hajdu, P., Benzevi, S., Rémek, B., Baglák, P., Ludányi, K., Panyi, G., Rajnavölgyi, E.: New phenotypic, functional and electrophysiological characteristics of NG-1 cells.
J Neurosci Lett 392 (1-2): 87-90, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2003.11.021>
IF: 2.136





További Közlemények

5. Sárga, L., Hart, N., Koch, L.G., Britton, S.L., **Hajjas, G.**, Boldogh, I., Su, X., Radák, Z.: Aerobic endurance capacity affects spatial memory and SIRT1 is a potent modulator of 5-cyclooxime repair.
Neuroscience 252: 329-336, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.020>
P:3.327
6. **Hajjas, G.**, Sécsei, A., Aguilera-Aguirre, L., Germán, P., Radák, Z., Buc, S., Hazra, T.K., Boldogh, I.: Biochemical identification of a hydroperoxide derivative of the free 8-oxo-7,8-dihydroguanine base.
Free Radic. Biol. Med. 52 (4): 749-756, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.018>
P:5.271
7. Szornócz, P., Germán, P., **Hajjas, G.**, Seenz, D.N., Woodberry, M.W., Kruszal, M.L., Boldogh, I.: Effects of Colistin on gene expression-transcriptome network analysis.
Int. J. Neuropharmacol. 9 (2): 181-183, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijnp.2008.10.022>
P:2.214
8. Szornócz, P., Germán, P., **Hajjas, G.**, Seenz, D.N., Kruszal, M., Boldogh, I.: New insights into clinical trial for Colistin in Alzheimer's disease.
J. Nutr. Health Aging. 13 (3): 235-241, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12293-009-0085-2>
P:1.712
9. Márkóczy, I., **Hajjas, G.**, Kiss, A., Lontay, B., Rajnavölgyi, É., Erdős, F.: GM-CSF Granulocyte colony stimulating factor increases drug resistance of leukemia blast cells to flutamide.
Pathol. Oncol. Res. 14: 285-292, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12293-008-8067-5>
P:1.26





10. Gogolak, P., Rethi, B., Hajos, G., Rajnavölgyi, E.: Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses
J. Mol. Recognit. 16 (5): 299-317, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.850>
IF: 2.013

A kiadó folyóiratok összesített impact faktora: 31,858

A kiadó folyóiratok összesített impact faktora (az értékelés alapján szolgáló közleményekre):
15,858

A CCENK a JCR08 által az IDEa Tudástárba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományterületi ellenőrzését a tudománycsaládok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.03.24.



8. Tárgyszavak

8-Oxoguanin, 8-Oxoguanin DNS glikoziláz-1 (OGG1), Bázis-kivágó javítás (BER), Jelátvitel, NADPH oxidáz 4, Oxidatív stressz, Rac1 GTPáz, Ras GTPáz.

9. Köszönetnyilvánítás

Habár ezen disszertáció címlapja csak egyetlen szerzőt nevez meg, számos egyén járult hozzá az elkészüléséhez, akiknek ezúton köszönöm támogatását és segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bácsi Attilának minden segítségéért, amit a cikkeinkhez, az adminisztratív teendőkhöz, valamint a disszertáció végleges formájának elnyeréséhez nyújtott.

Szeretném kifejezni külön köszönetemet volt témavezetőmnek, Dr. Boldogh István professzornak, aki kutatói munkámat támogatta a Texasi egyetemen. Széleskörű elméleti és tapasztalati tudása, valamint lényeglátása kulcsfontosságú volt a projektem előrehaladásában. Emléztetett rá, hogy a kutatás osztatlan figyelmet igényel az akadályokon való továbbjutáshoz és a kihívások teljesítéséhez. Jó mentorhoz híven nem csak tudományos szemléletéből, hanem gazdag élettapasztalatából is sokat adott át.

Segítségükért és kutatói munkámban való közreműködésükért köszönet illeti minden kollégámat és kollaboránsomat, akikkel együtt dolgoztam a UTMB-n töltött 6 évem során.

Szintén szeretném megköszönni Dr. Rajnavölgyi Éva professzor asszonynak PhD hallgatói időszakom alatt az Immunológia Intézetben nyújtott támogatását.

Szeretnék köszönetet mondani barátaimnak, akik motiváltak és emlékeztettek az értékeimre, amikor szükségem volt rá.

Külön köszönetet mondok szüleimnek és fiamnak, akik támogatnak és hisznek bennem függetlenül attól, hogy hol járok az életutamon.