

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Antal Dóra

**A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimek szerepének
karakterizálása pikkelysömörben**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimek szerepének karakterizálása pikkelysömörben

Antal Dóra

Témavezető: Dr. Szántó Magdolna



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés.....	9
1.1. A PARP enzimek és a gyulladás kapcsolata	9
1.2. A pikkelysömör.....	9
II. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1. A PARP enzimes család és az ADP-ribosiláció	11
2.1.1. A PARP enzimes család jellemzése	11
2.1.2. Az ADP- ribosiláció folyamata	14
2.2. A PARP1	16
2.2.1. A PARP1 szerkezete.....	16
2.2.2. A PARP1 biológiai funkciói.....	17
2.2.3. A PARP1 szerepe a gyulladás szabályozásában.....	18
2.3. A PARP2	19
2.3.1. A PARP2 szerkezete.....	19
2.3.2. A PARP2 biológiai funkciói.....	20
2.3.3. Metabolikus szabályozás.....	21
2.3.4. PARP2 szerepe a gyulladásos folyamatok szabályozásában	22
2.4. PARP inhibitorok.....	23
2.4.1. A PARP inhibitorok hatásmechanizmusa	23
2.4.2. Szintetikus letalitás a HRR-hiány és a PARP-gátlás között	23
2.4.3 A PARP inhibitorok egyéb alkalmazási lehetőségei	24
2.5. Psoriasis	25
2.5.1. A bőr szerkezete.....	25
2.5.2. A psoriasis epidemiológiája és életminőségre gyakorolt hatásai	26
2.5.3. Genetikai tényezők a pikkelysömör kialakulásában.....	27
2.5.4. Klinikai megjelenés	28
2.5.5. Szöveti patológia.....	29
2.5.6. A psoriasis immun-patogenezise	31
2.5.7. A keratinociták szerepe psoriasisban	31
2.5.8. Az IL17 citokin család szerepe psoriasis-ban	32

2.5.9. Az NF- κ B jelátviteli út szerepe psoriasis-ban	33
2.5.10. A pikkelysömör terápiás lehetőségei	34
2.5.11. Az imikimod által indukált psoriasis modell	35
III. Célkitűzések.....	37
IV. Anyagok és módszerek.....	38
4.1. Anyagok.....	38
4.2. Sejttenyésztés.....	39
4.3. Géncsendesítés.....	39
4.4. HPV-Ker sejtek differenciáltatása	40
4.5. HPV-Ker sejtek összefehérje mennyiségének vizsgálata	40
4.6. Keratinociták sejtciklus analízise	40
4.7. NF- κ B aktivitás vizsgálata.....	41
4.8. A sejtek citokin és ösztadiol koncentrációjának meghatározása	41
4.9. Immuncitokémia	42
4.10. RNS-izolálás és RT-qPCR	43
4.11. RNS-szekvenálás (RNA-Seq).....	43
4.12. Fehérje extrakció	44
4.13. Sejtfractionálás	45
4.14. Western blot	45
4.15. Állatkísérletek.....	46
4.15.1. Kísérleti egerek	46
4.15.2. A psoriasis egér modellje - az IMQ által kiváltott dermatitisz	47
4.15.3. Citokin profil meghatározása az egerek bőrén.....	47
4.15.4. További citokin meghatározás ELISA módszerrel az egerek bőrén	48
4.16. Immunhisztokémia	49
4.17. Humán mintákon végzett kísérlet	50
4.17.1. Kromogén in situ hibridizáció (CISH)	50
4.18. In silico analízis	51
4.19. Statisztikai analízis	51
V. Eredmények	52
5.1. A PARP1 expressziója csökken psoriasis-ban	52
5.2. PARP inhibitorok alkalmazása imikimoddal kombinációban fokozza a keratinocita proliferációt és citokin termelést	53

5.3. A PARP1 hatása a keratinocita proliferációra függ a TRPV1 aktivitástól.....	55
5.4. A PARP2 expressziója megnövekszik pikkelysömörös betegek bőrében	56
5.5. A PARP2 deléciója csökkenti az IMQ által kiváltott pikkelysömör-szerű bőrgyulladás súlyosságát egerekben	57
5.6. A PARP2-depletált humán keratinociták terminális differenciálódása megtartott marad a pikkelysömörre jellemző citokinekkal való kezelés után	59
5.6.1. <i>A pro-inflammatorikus citokinek által közvetített NF-κB aktiváció gátolt PARP2 csendesített keratinocitákban.....</i>	61
5.6.2. <i>A fokozott ösztradiol termelés gátolja az NF-κB-t a PARP2-depletált keratinocitákban</i>	63
5.7. Az aromataz funkció szükséges a PARP2 által közvetített gyulladáscsökkentő hatáshoz egerek bőrében.....	67
5.8. Az aromataz expressziója csökken a humán pikkelysömörös léziókban.....	70
VI. Megbeszélés.....	71
6.1. A PARP1 gátlása felerősíti az imikimod által indukált folyamatokat keratinocita sejtekben	72
6.2. A PARP2 részt vesz a gyulladás kialakulásában psoriasis-ban a keratinociták ösztradiol bioszintézisének modulálása révén.....	73
VII. Összefoglalás.....	77
VIII. Summary	78
IX. Irodalomjegyzék.....	79
X. Tárgyszavak.....	96
Köszönetnyilvánítás.....	97
Publikációs lista	98
Függelék.....	100

Rövidítések jegyzéke

A magyarra nehezen fordítható kifejezéseket angolul tüntetem fel a rövidítések jegyzékében és a dolgozatban.

ADP	adenozin-difoszfát
ADPr	ADP-ribóz
aNHEJ	alternatív nem-homológ végek összekapcsolása
ANOVA	variancia-analízis
AP-1	aktivátor fehérje 1
ARH	ADP-ribozil hidroláz
ARTD	ADP-ribozil transzferáz
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BCIP	5-bromo-4-klór-indolil-foszfát
BER	báziskivágó hibajavítás
BPE	szarvasmarha hipofízis kivonat
BRCA1/2	emlőrákra érzékenyítő fehérje 1/2
BRCT	BRCA1 C terminális domén
BrdU	bróm-deoxiuridin
BSA	szarvasmarha szérum albumin
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CARD14	kaszpáz toborzási domént tartalmazó fehérje 14
CCCH	cisztein-cisztein-cisztein-hisztamin
CCL* CC	kemokin (C-C motívum) ligandum
CD*	differentiálódási klaszter
cDNS	komplementer DNS
CISH	kromogén in situ hibridizáció
cNHEJ	klasszikus nem-homológ végek összekapcsolása
CXCL*	kemokin (C-X-C motívum) ligandum
CYP19A1	citokróm P450, 19-es család, A-alcsalád, 1-es típus
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DC	dendritikus sejt

DEMÁB	Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága
DEVD	kaszpáz hasító hely
DHT	dihidrotesztoszteron
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNA-PK	DNS-függő fehérje kináz
DNS	deoxiribonukleinsav
DSB	kettősszálú DNS-törés
DTT	ditiotritol
EAE	kísérletes autoimmun encephalomyelitisz
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	egtazic sav
ELISA	enzimhez kötött immunoszorbens próba
ER α	ösztrogén receptor alfa
FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság
FFPE	formalin-fixált paraffinba-ágyazott
FoxP3	forkhead box P3 transzkripció faktor
GAPDH	gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
GO	génontológia
GP130	G-proteinhez kapcsolt ösztrogén receptor 1
H&E	hematoxin-eozin
hBD-2	humán béta-defenzin-2
HDL	nagy sűrűségű lipoprotein
hEGF	humán rekombináns epidermális növekedési faktor
HEPES	N-(2-hidroxiethyl) piperazin- N'-(2-etánszulfonsav)
HLA	humán leukocita antigén
HPF	nagy felbontású mező
HPV	humán papilloma vírus
HPV-Ker	humán immortalizált keratinocita sejtvonal
HR	homológ rekombináció
HRP	tormaperoxidáz
HRR	homológ rekombinációs javítás
HSD17B3/11	17 β -hidroxisteroid-dehidrogenáz-3/11
HYE	hisztidin-tirozin-glutamát
IFN-*	interferon

IHC	immunhisztokémia
IkB	inhibítor kappa B
IL-*	interleukin
IMQ	imikimod
iNOS	indukálható nitrogén-oxid szintáz
K*	keratin
kDa	kilodalton
KO	knock-out
LDL	kis sűrűségű lipoprotein
LNA	lezárt/kötött nukleinsav
LPR	<i>long patch repair</i>
LPS	lipopoliszacharid
MAR	mono(ADP ribóz)
MARiláció	mono(ADP-ribozil)áció
mDC	mieloid dendritikus sejt
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MMEJ	mikrohomológiával közvetített végek csatolása
MMR	nem összeillő bázispárok javítása
mRNS	messenger ribonukleinsav
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NBT	nitroblue tetrazolium
NCBI GEO	National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus
NER	nukleotidkivágó hibajavítás
NF-AT	T-sejtek nukleáris faktora
NFKBIA	nukleáris faktor-kappa-B inhibitor alfa
NFKBIZ	nukleáris faktor-kappa-B inhibitor zéta
NF-κB	nukleáris faktor-kappa B
NHEJ	nem-homológ DNS-végeket összekapcsoló javítás
NHEK	normál humán epidermális keratinocita
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NMPA	The National Medical Products Administration
PAR	poli(ADP ribóz)
PARG	poli(ADP-ribóz) glikohidroláz

PARiláció	poli(ADP-ribozil)áció
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PASI	psoriasis területi és súlyossági index
PBS	foszfát puffer
pCMV	uborka mozaikvírus vektor
pDC	plazmacitoid dendritikus sejt
PKC	protein kináz C
pLKO	replikáció-inkompetens lentivirális vektor
PMA	forbol-mirisztát-acetát
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PPAR	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor
PPAR γ	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma
PSORS	psoriasisra való fogékonysági lókus
PTM	poszttranszlációs módosítás
PUVA	pszoraleen+UV-A
REL	protoonkogén
RIN	ribonukleinsav integritási szám
RNA-seq	RNS-szekvenálás
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigéngyökök
RT-qPCR	reverz transzkripciót követő kvantitatív polimeráz láncreakció
RXR	retinoid X-receptor
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	átlag szórás
SFM	keratinocita szérumentes médium
shRNS	rövid hajtú-szerkezetű RNS
Sp1	specificity protein 1
SPF	specifikus patogén mentes
SPR	<i>short patch repair</i>
SRB	szulforodamin B
SRD5A1/2	szteroid 5 α -reduktáz 1/2
SREBP1	szterol regulált elemet kötő fehérje 1
SSA	egyszálú DNS szálpárosítás
SSB	egyszálú DNS törés

SSBR	egyszálú DNS törés javítás
StARD5	StAR-related lipid transfer protein 5
Tc*	citotoxikus T-sejt
TCA	triklór-ecetsav
Th*	helper/segítő T-sejt
TLR	toll-szerű receptor
TNF α	tumor nekrosis faktor alfa
TNKS1/2	tankiráz1/2
TRAF6	tumor nekrosis faktor receptorhoz kapcsolódó faktor 6
Treg	regulatórikus T-sejt
Tris	tris(hidroximetil)-aminometán
TRPA1	transzens receptor potenciál ankirin 1
TRPV1	transzens receptor potenciál vanilloid 1
UV*	ultraibolya sugárzás
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
WGR	triptofán-glicin-arginin domén
WHO	Egészségügyi Világszervezet
WT	vad típusú
WWE	triptofán-triptofán-glutamin domén
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing protein 1</i>
YY1	<i>Yin Yang 1</i>
ZF*	cink-ujj

I. Bevezetés

1.1. A PARP enzimek és a gyulladás kapcsolata

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimes család tagjai által katalizált poszttranszlációs fehérje módosítást, az ADP-ribozilációt elsőként a dezoxiribonukleinsav (DNS) törések hibajavítása során detektálták. Az utóbbi évtizedek kutatásai azonban számos olyan fiziológiai folyamatra is rávilágítottak, amelyben a PARP-oknak jelentős szerepe van. Ezek közé tartozik többek között a transzkripció, transzláció, sejt differenciáció, sejthalál, valamint a sejtmétabolizmus szabályozása [1].

A sejtekben mérhető PARP aktivitást szinte teljesen lefedi a PARP1 (85-90%) és a PARP2 (5-15%) aktivitása. A két enzim szerkezeti és funkcióbeli hasonlóságuk ellenére eltérő biológiai szereppel bírnak [2, 3]. PARP aktiválódást, illetve ADP-ribozilációt számos gyulladásos folyamatban is leírtak. A PARP1 deléciója egerekben csökkent mértékű gyulladást eredményezett T helper 2 (Th2) típusú gyulladásos modellekben, mint amilyen az asztma [4], az allergiás légúti gyulladás [5, 6], az akut pankreatitisz [7], a kolitisz [8], valamint bőrben a kontakt hiperszenzitivitás [9-11] egér modelljei. A PARP2 gyulladásban betöltött szerepéről még kevés információ áll rendelkezésre, viszont eddigi ismereteink alapján úgy tűnik, hogy Th2 típusú gyulladásokban a PARP2-nek nincs, vagy nem ismert a szerepe. Általános tapasztalat viszont, hogy a PARP aktivitás gátlása ún. pan-PARP inhibitorokkal, amelyek a PARP1 mellett a PARP2-t, sőt a PARP3-at is gátolják, gyulladásgátlást eredményez nemcsak állat modellekben, hanem emberben is [12].

1.2. A pikkelysömör

A psoriasis (pikkelysömör) egy krónikus, immun-mediált, gyulladásos bőrbetegség, amelyet a keratinociták fokozott proliferációja és elégtelen differenciációja jellemez. A psoriasis patogenezise bonyolult folyamat, amelyben feltehetően az aktivált T-sejtek az elsődleges modulátorok, ezen belül is a Th1 és a Th17 típusú sejtek a legfontosabbak a gyulladás inicializálásában és fenntartásában is [13, 14]. A pikkelysömör azonban nem magyarázható kizárólag a T-sejt aktiváció alapján, és valószínű, hogy más, nem-klasszikus immunsejtek, például az epidermális keratinociták igen fontos szerepet játszanak a betegség kifejeződésében [15]. A psoriasis kialakulásának konkrét oka még mindig nem tisztázott, így a betegségnek nincs végleges gyógymódja. Jelenleg a leghatékonyabb eljárás a psoriasis terápiájában a T sejtek által termelt citokineket célzó biológiai ágensekkel történik, amely

jelentős áttörést jelentett a betegség gyógyításában. Azonban a biológiai terápiának számos mellékhatása van, így folyamatos az igény újfajta megoldásokra a psoriasis kezelésében [16]. A psoriasis egér modelljeinek megjelenései hozzájárultak ahhoz, hogy bővüljenek ismereteink a betegség patomechanizmusáról és általa hatékonyabb terápiákat lehessen létrehozni [17, 18].

A poli(ADP-ribóz)-t (PAR) kimutatták normál bőrben keratinocitákban, szőrtüsző sejtekben, ér endotél sejtekben, faggyúmirigy sejtekben, szubkután zsírsejtekben, ami azt jelzi, hogy a PAR szabályozhatja az élettani funkciókat ezekben a sejttypusokban [19]. A PARP1 aktivációját már leírták a bőr több patofiziológiai állapotában, mint a napégés, melanoma [19], kontakt hiperszenzitivitás [10]. A PARP2 lehetséges szerepéről azonban a bőrben keveset tudunk, viszont a PARP1-gyel ellentétben a PARP2 nem vesz részt a kontakt hiperszenzitivitási reakcióban [10], tehát a PARP2 eltérő szerepet tölthet be a bőr patofiziológiájában. Mivel Th1 és Th17 típusú gyulladásos folyamatokban a PARP-ok szerepe kevésbé ismert, ezért PhD munkám során azt a célt tűztük ki, hogy karakterizáljuk mind a PARP1, mind a PARP2 szerepét psoriasis-ban.

II. Irodalmi áttekintés

2.1. A PARP enzimes család és az ADP-riboziláció

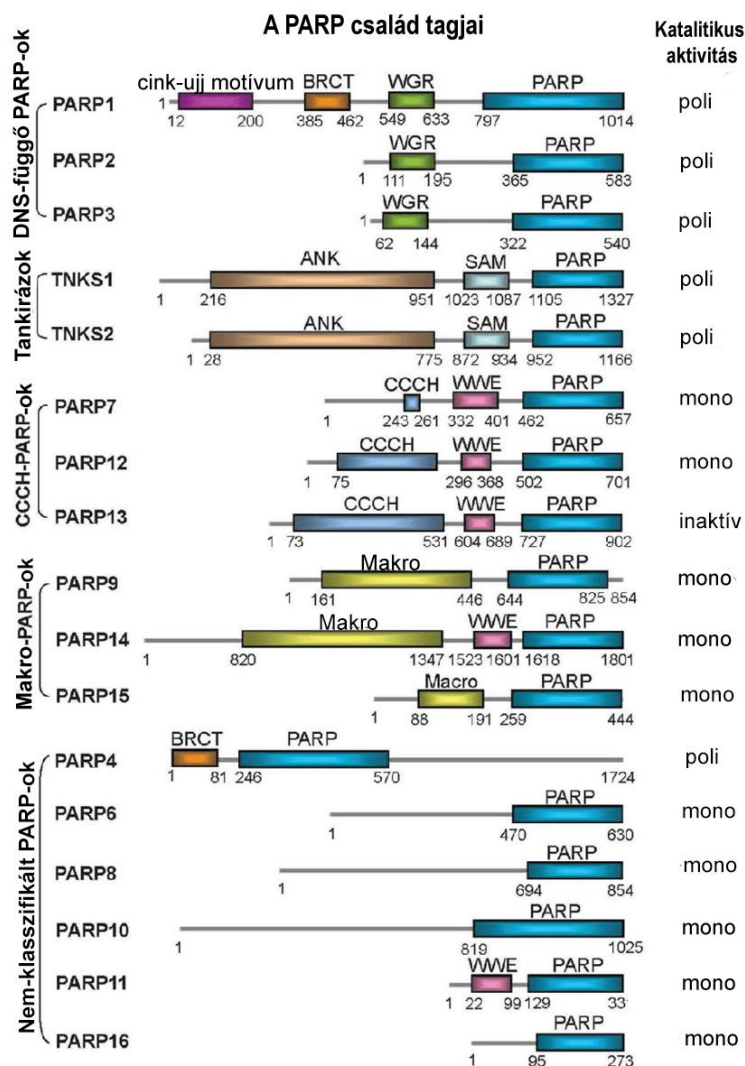
2.1.1. A PARP enzimes család jellemzése

A poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) enzimes család tagjai az ADP-ribozilációnak nevezett poszttranszlációs módosítást (PTM) katalizálják, mely során a PARP enzimek nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) hasítása révén felszabaduló ADP-ribóz (ADPr) egységeket csatolnak célfehérjék aminosav oldalláncaihoz. Ez egy filogenetikailag nagymértékben konzervált PTM, mely mind prokariótákban, mind eukariótákban jelen van, az élesztőgomba kivételével [20]. A DNS károsodás hatására aktiválódó ADP-ribozilációt Pierre Chambon és munkatársai fedezték fel 1963-ban, majd 1967-ben azonosították az első ADP-ribozilációt végző enzimet, a PARP1-et [21, 22] Mintegy 30 évvel később, PARP1 knock-out ($\text{PARP1}^{-/-}$) egerekben reziduális, DNS-függő PARP aktivitást mutattak ki, és ez a felismerés vezetett a PARP2 azonosításához [23].

Ma már a PARP enzimek családjának 17, szerkezetileg és funkcionálisan is változatos tagját ismerjük emberben, melyek mindegyikében megtalálható a konzervált, ún. „PARP szekvencia”, amely az enzimek aktív centrumában helyezkedik el [24]. Történelmileg a PARP enzimek összes tagját a PARP1 polimeráz aktivitása alapján nevezték el, annak ellenére, hogy a család nem minden tagja végez polimerizációt. Éppen ezért, Hottiger és munkatársai 2010-ben egy új nevezéktant javasoltak, amely a PARP-okat bakteriális diftéria toxin-szerű ADP-ribozil transzferázok (ARTD) néven említi. Ez az elnevezés a fehérjék alapvető transzferáz-aktivitásán alapul, valamint azon, hogy a PARP-ok katalitikus magja, a „PARP domén”, nagy szerkezeti hasonlóságot mutat a diftéria toxinnal [25, 26]. Ez a nevezéktan azonban nem gyökeresedett meg eléggé az enzimes családdal foglalkozó kutatók körében, így továbbra is PARP-okként hivatkozunk rájuk. Az PARP doménen belül három aminosav, a hisztidin-tirozin-glutamát (HYE) katalitikus triád található, amelyből az első két aminosav fontos a NAD^+ kötődése szempontjából, míg a glutamát a katalízisben játszik szerepet [27]. A HYE motívumon belüli szubsztitúciók miatt a PARP enzimek közül csak a PARP1, PARP2, a tankiráz-1 (TNKS1 vagy PARP5a) és tankiráz-2 (TNKS2 vagy PARP5b), amelyek tényleges polimeráz aktivitást végeznek [28]. Egyes PARP-ok, mint a PARP3, PARP4, PARP6, PARP10, PARP14, PARP15 és PARP16, csak mono(ADP-ribozil)ációt (MARiláció) katalizálnak, melynek során egyetlen ADPr egységet csatolnak a célfehérjéhez [29, 30]. A PARP9-ről sokáig feltételezték, hogy

katalitikusan inaktív, de mára bebizonyosodott, hogy szintén PAR-aktivitással rendelkezik [31]. A PARP13 esetében viszont még nem írtak le enzimátikus aktivitást [32]. A katalitikus aktivitásért felelős közös PARP domén mellett a PARP család tagjai további, kevésbé konzervált doménekkel is rendelkeznek, amelyek a fehérje-fehérje vagy fehérje-nukleinsav kölcsönhatásokhoz és a PARP-ok aktiválásához/szabályozásához szükségesek [33]. Domén architektúrájuk alapján a PARP-ok öt alcsaládba sorolhatók:

1. *DNS-függő enzimek*: DNS törések hatására aktiválódnak. DNS-kötő doménjükkel kötődnek a DNS-hez, ahol részt vesznek a törések hibajavításában azáltal, hogy a károsodás helyén egyes célfehérjéket ADP-ribozilálnak, amely jelként szolgál más hibajavító fehérjéknek. E csoport tagjai a PARP1, PARP2 és a PARP3 [34].
2. *Tankirázok*: ún. ankirin domént tartalmaznak, amely a fehérje-fehérje kölcsönhatásokért felelős. Rendelkezik továbbá egy jellegzetes, ún. steril alfa modul (SAM) doménnal, amely a homo- vagy heterodimerizációhoz szükséges. Befolyásolják a telomer extenziót és a testvér kromatidák kohézióját a replikáció, illetve rekombináció során [35].
3. *CCCH-domént tartalmazó PARP-ok*: cisztein-cisztein-cisztein-hisztamin (CCCH) cink-ujj domént, és triptofán-triptofán-glutamin (WWE) PAR-kötő domént tartalmaznak, funkcióik kevésbé ismertek. Ebbe a csoportba tartozik a PARP7, PARP12 és PARP13 [36].
4. *Makro-PARP-ok*: két vagy három makrodomént tartalmaznak, ezek a PARP9, PARP14 és PARP15. A makrodomének kötődni tudnak az ADP-ribóz egységekhez és valószínűleg befolyásolják a PAR metabolizmusát [37].
5. *A nem klasszifikált PARP-ok*: a PARP4, PARP6, PARP8, PARP10, PARP11 és PARP16 nem rendelkeznek közös domén tartományokkal és nem illeszkednek az előző csoportok egyikébe sem (**1.ábra**) [38, 39].



1. ábra. Poli(ADP-ribóz) polimerázok domén struktúrája (szerkesztve Li, 2014 nyomán)

A PARP család tagjainak szerkezetét a különböző színekkel jelölt domének építik fel. A kék szín a jellegzetes „PARP domént” jelöli, amely a család minden tagjában közös. A reprezentatív domének, mint például a makrodomének, WWE-domének vagy PAR-kötő cinkujjak szelektíven felismerik az ADP-ribóz különböző formáit, a PAR-t és a MAR-t [40].

Rövidítések: WWE (triptofán-triptofán-glutamin domén), PAR (poli(ADP-ribóz)), MAR (mono (ADP-ribóz)), CCCH (cisztein-cisztein-cisztein-hisztamin domén), ANK (ankirin), SAM (steril alfa modul domén), BRCT (BRCA1 C terminális domén) WGR (triptofán-glicin-arginin domén)

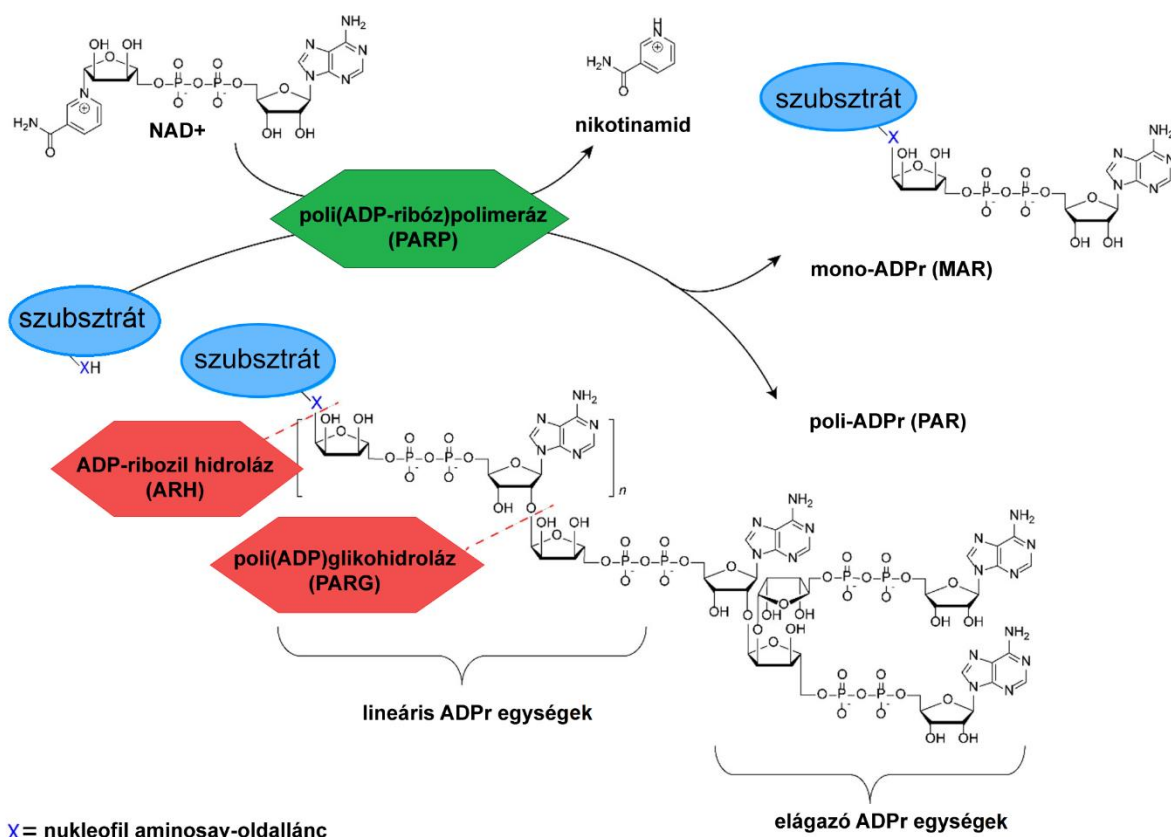
A PARP-fehérjék mérete és intracelluláris lokalizációja is különböző, ami a PARP funkciók változatosságát jelzi. A PARP-ok mérete 36,38 kDa (PARP16) és 202,8 kDa (PARP14) között mozog [41], és elsősorban a sejtmagban lokalizálódnak, de leírtak már PARP aktivitást a citoplazmában, Golgiban és a mitokondriumban is. Emellett, a PARP4 része az ún. vault részecskének, amelyek citoplazmatikus ribonukleoprotein komplexek. A tankirázokat eredetileg egy telomerikus komplex részeként azonosították, de a citoplazmában is

megtalálhatóak, mint a Golgi-komplexben lokalizált perifériás membránfehérjék. A PARP16 a magburokban található. Egyes PARP-ok pl. a PARP10 elhelyezkedését befolyásolja a sejtciklus, így bizonyos, kizárólag citoplazmatikusnak gondolt PARP-ok eltérő körülmények között a sejtmagban is elhelyezkedhetnek, viszont egyes PARP enzimek szubcelluláris lokalizációja ismeretlen [42, 43]

2.1.2. Az ADP- riboziláció folyamata

Az ADP-riboziláció során tehát a PARP-ok NAD^+ molekulákat hasítanak, és az így keletkező ADPr egységeket csatolják a célfehérjéhez, miközben nikotinamid (NAM) szabadul fel. Az ADP-riboziláció nukleofil oxigén-, nitrogén- vagy kéntartalmú aminosav-oldalláncokon történik, ilyenek az aszpartát, glutamát, lizin, cisztein, szerin és arginin oldalláncok [44], amelynek révén N-, O- vagy S-glikozidos kötés jön létre az aminosavak és a ribóz molekula között. PARiláció során az aktivált PARP enzimek az ADP-ribóz egységek polimerizációját katalizálják $\alpha(1 \rightarrow 2)$ O-glikozidos kötésekkel keresztül, amely során lineáris vagy elágazó láncokat építenek fel néhány, vagy akár 200 ADP-ribóz egységből [45]. A PARiláció történhet magukon a PARP-okon (autoPARiláció), és más akceptor fehérjéken (transzPARiláció) [46].

Mivel a PAR polimerek nagy sűrűségű negatív töltést hordoznak, a PARiláció drámaian megváltoztathatja a célfehérje biofizikai tulajdonságait, és a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat [47]. A PARP ismert szubsztrátjai közé tartozik a topoizomeráz I, a ribonukleinsav (RNS)-polimeráz II, a DNS-polimerázok, egyes transzkripciós faktorok, hisztonok, nagy mobilitású fehérjék, p53 és DNS-függő kinázok. A PARiláció az összes előbb említett szubsztrát aktivitását modulálja, befolyásolva a DNS-replikáció és a transzkripció folyamatait is [48]. A PARiláció a foszforilációhoz és az ubikvitinációhoz hasonlóan reverzibilis PTM, így ideális közvetítője a dinamikus sejtfolyamatoknak. A PAR és a MAR degradációjáért felelős legfontosabb enzimek a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) és az ADP-ribozil hidrolázok (ARH). A PARG egy makrodomén enzim, amely a PAR alegységeket összekötő ribóz-ribóz glikozidos kötésekkel hasítja. A PAR-t a PARG gyorsan lebontja, ami a polimer féléletidejét körülbelül 1 percre korlátozza. A PARG azonban nem tudja felhasítani azt a kötetést, amely az első ADPr egységet a célfehérjéhez köti. Az ARH1 viszont éppen a MAR eltávolításáért felel, és emellett aminosav specificitást mutat az argininre, míg az ARH3 képes exoglikolitikusan is hidrolizálni a PAR-t, különösen a szerin-modifikált célpontokról [49, 50] **(2. ábra)**.



2. ábra. Az ADP-ribóziláció folyamatában részt vevő enzimatis tevékenységek sematikus ábrázolása

Az ADP-ribóziláció egy dinamikus folyamat, amelyben a polimer láncok PAR alegységeinek glikozidos kötéseit a PARG bontja, a mono-ADPr-t pedig az ARH hasítja [51].

Rövidítés: NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid)

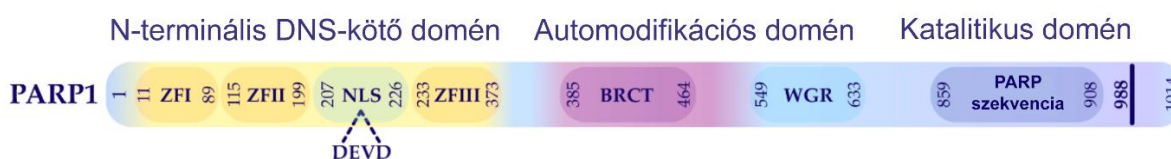
A sejtekben detektálható PARiláció 85-90%-ért a PARP1 felelős, míg a maradék 10-15% a PARP2-höz köthető, így az össz-PARP aktivitás szempontjából a PARP enzimes család más tagjainak szerepe marginális [2, 3]. Bár a PARP aktivitás leginkább a DNS hibajavítási folyamatokban betöltött szerepéről ismert, mára világossá vált, hogy számos más biológiai folyamat szabályozásában is részt vesz [52]. A PARiláció döntő szerepet játszik a genom integritásának fenntartásában, replikáció és sejtciklus szabályozásában, a transzkripcióban és az RNS-anyagcserében, a gyulladásban és az immunitásban, sejthalál és sejtanyagcsere szabályozásában. Ennek megfelelően a PARP-ok számos patofiziológiai folyamat résztvevői is lehetnek, amelyek közül a legjelentősebbek a karcinogenezis, a gyulladásos és neurodegeneratív betegségek, valamint a metabolikus betegségek [53]. Meg kell említeni, hogy sok esetben a PARP-ok által szabályozott folyamatokban a PARP-ok enzimatis aktivitása nem vesz részt, hanem magának a fehérjének a jelenléte közvetíti a hatást, de ez valószínűleg attól is függ, hogy milyen rendszerben vizsgálták az adott folyamatot. Például, azt több esetben

kimutatták, hogy a PARP1 a nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) kofaktora [54-56], de arról máig nincs konszenzus, hogy PARiláció történik-e az NF- κ B által szabályozott transzkripciós folyamatokban [57].

2.2. A PARP1

2.2.1. A PARP1 szerkezete

A PARP1 sejtmagi fehérje, amely 1014 aminosav hosszú, teljes molekulatömege körülbelül 113 kDa és a fehérjét kódoló gén emberben az 1-es kromoszómán található. A PARP1 a PARP enzimes család legnagyobb mennyiségben expresszálandó és legjobban vizsgált tagja. Szerkezetileg 3 funkcionális doménből áll, egy N-terminális DNS-kötő doménből, egy automodifikációs doménből és egy C-terminális katalitikus doménből (CAT) [58] (**3. ábra**).



3. ábra. A PARP1 szerkezetének és funkcionális doménjeinek sémája

A PARP1 3 fő doménje: az N-terminális DNS-kötő domén, automodifikációs domén, és C-terminális katalitikus domén, valamint ezen belül a konzervált „PARP szekvencia” látható [58].

Rövidítések: WGR (triptofán-glicin-arginin domén), BRCT (BRCA1 C terminális domén), NLS (nukleáris lokalizációs szignál), DEVD (kaspáz hasító hely), ZF (cink-ujj)

Az N-terminális DNS-kötő doménben három cink-ujj található, nevezetesen a ZFI, ZFII és ZFIII. A ZFI és a ZFII a DNS károsodási helyek felismeréséhez és kötődéséhez szükséges, míg a ZFIII fontos szerepet játszik az enzim DNS kötés utáni aktiválásában [58]. Szintén az N-terminális régióban található egy nukleáris lokalizációs szekvencia (NLS), ami a PARP1-et a sejtmagba irányítja. Itt található a kaspáz hasítási hely (DEVD), ahol a kaspázok apoptózis során hasítják a PARP1-et. A PARP1 kötődése a károsodott DNS molekulához a PARP1 enzimatis aktivitását akár 500-szorosára is növelheti [59, 60]. A központi automodifikációs domén glutamát és lizin aminosavakban gazdag, amelyeken a PARP1 önmagát képes PARilálni. Ebben a régióban található a BRCT (BRCA1 C terminális domén) motívum és a triptofán-glicin- és arginin-gazdag WGR domén [61]. A BRCT motívum, mely számos DNS hibajavító fehérjében is megtalálható, befolyásolja a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat, a WGR domén

pedig a katalitikus domén DNS-függő aktivitását szabályozza. A CAT domén a konzervált "PARP szekvenciát" tartalmazza, amely a NAD^+ akceptorhelyből és a PAR szintézis iniciációjához és elongációjához szükséges aminosav oldalláncokból áll [62].

2.2.2. A PARP1 biológiai funkciói

A PARP1 a DNS-törések egyik legfontosabb szenzora a sejtekben, mely kulcsszerepet játszik a DNS hibajavításának térbeli és időbeli szervezésében és a genom integritásának fenntartásában [63]. A PARP részt vesz az egyszálú DNS törésekre (SSB) válaszul végzett báziskivágásos javításban (BER), és a BER-komplex egyik összetevője, amely a DNS ligáz III-ból, a DNS polimeráz béta és az XRCC1 fehérjéből áll [64]. Sejtmentes rendszerekben kimutatták, hogy a nem módosított PARP enzim szorosan kötődik a DNS szálszakadásokhoz, majd az autoPARilációt követően felszabadul, és lehetővé teszi a javító enzim hozzáférését a sérült DNS-hez [65, 66]. A PARP1 számos más hibajavítási mechanizmusban is részt vesz, ilyen a nukleotid kivágásos hibajavítás (NER), a klasszikus nem-homológ végek összekapcsolása (cNHEJ), az alternatív nem-homológ végek összekapcsolása (aNHEJ), a mikrohomológiával közvetített végek csatolása (MMEJ), a homológ rekombináció (HR), valamint a nem összeillő bázispárok javítása (MMR) és a replikációs villa stabilitásának fenntartása [67]. Alacsony fokú DNS-károsodás esetén a PARP1 túlélési faktorként működik, amely elősegíti a DNS-károsodás javítását. Ezzel szemben nagyfokú DNS-károsodás esetén a PARP1 hiperaktivációja a sejtek NAD^+ és ATP szintjének kimerüléséhez, és ezzel együtt mitokondriális diszfunkcióhoz és az energiaháztartás zavarához vezet, mely folyamat végül a sejt elhalásával végződhet [44]. Ilyen módon a PARP1 hiperaktivációja számos betegség, többek között a stroke [68], neurodegeneratív betegségek [69], a cukorbetegség [70] és számos más gyulladásos betegség [71] patogenezisében is szerepet játszhat. Ezen felül, több tanulmány támasztja alá, hogy a PARP1 aktivációja fontos patomechanikai tényező akut miokardiális infarktus esetén fellépő iszkémia, és az azt követő reperfúzió szövetkárosító hatásában. Iszkémia/reperfúzió esetén ugyanis hirtelen megnő a keringésben az oxigén- és nitrogéntartalmú reaktív gyökök mennyisége, amely DNS károsodáshoz és PARP aktivációhoz vezet a keringő leukocitákban [72].

2.2.3. A PARP1 szerepe a gyulladás szabályozásában

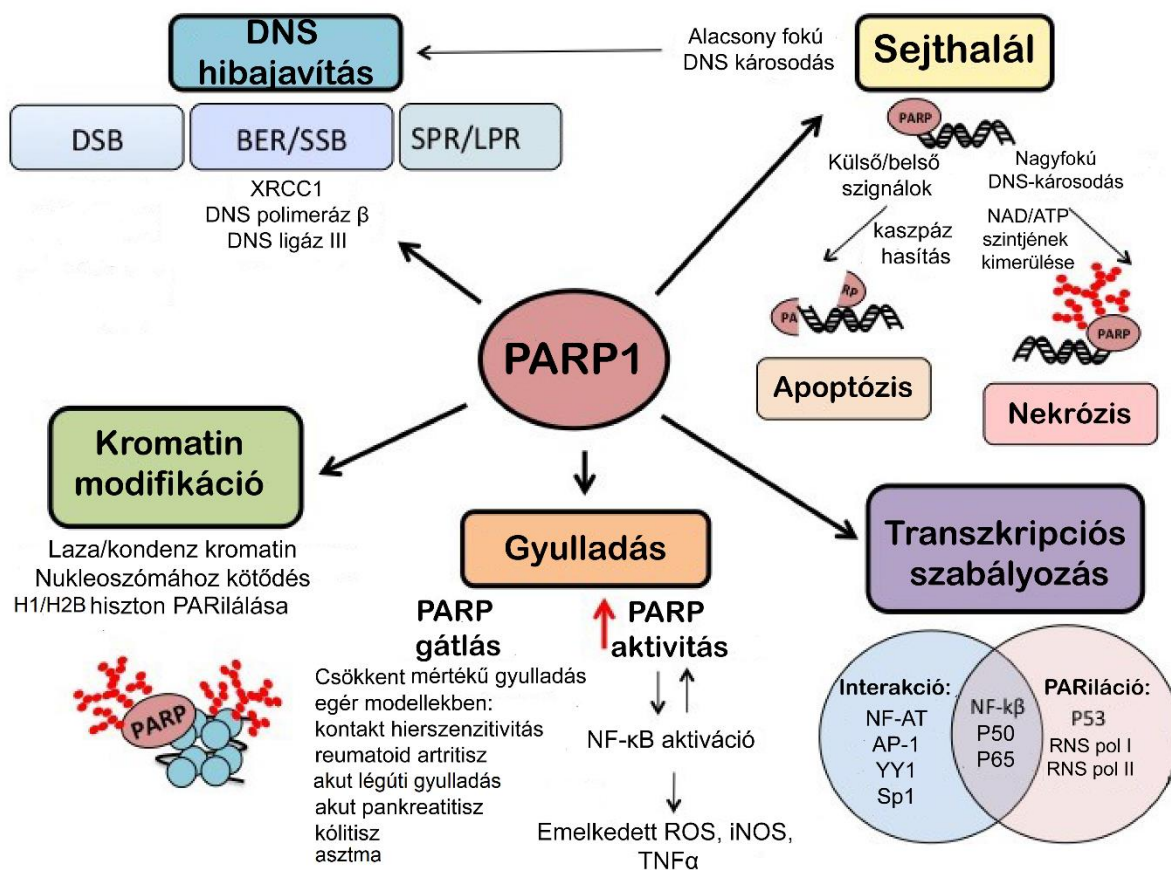
Számos adat utal arra, hogy a PARP1 szerepet játszik a gyulladás kialakulásában, ugyanis PARP1^{-/-} vagy PARP inhibitorokkal kezelt egerekben lényegesen enyhébb fokú gyulladás alakult ki például az asztma [4], kólitisz [8], reumatoid artritisz [73], akut pankreatitisz [7], akut légúti gyulladás [5, 6] vagy a kontakt hiperszenzitivitás [9-11] modelljeiben. Ezek hátterében különböző, PARP1 által mediált immunszabályozási folyamatok állnak.

A PARP1 több pro-inflammatórikus transzkripciós faktorral is kölcsönhat. Ezek közül a legfontosabb az NF- κ B, valamint az aktivált T-sejtek nukleáris faktora (NF-AT), az aktivátor protein 1 (AP-1), a Yin Yang 1 (YY1), és az Sp1 [74] (**4. ábra**). Az NF- κ B alapvető fontosságú a gyulladásos citokinek transzkripciójának szabályozásában. A PARP1 az NF- κ B-vel komplexet képezve segíti az NF- κ B target gének promótereinek aktivációját [75]. Ezt mutatja például, hogy lipopoliszachariddal (LPS) kezelt PARP1^{-/-} egerekben csökkent az NF- κ B aktivációja és az indukálható nitrogén-oxid szintáz (iNOS), interleukin (IL) 6 és tumor nekrosis faktor alfa (TNF α) expressziója a peritoneális makrofágokban [76].

A PARP1 elsősorban a Th2 típusú gyulladás kialakulásában játszik szerepet, ugyanis PARP1 hiányában a naiv CD4⁺ sejteknek csökken a képessége a Th2 irányú differenciálódásra, amit jól mutat az IL4⁺ sejtek alacsony száma Th2 polarizációs körülmények között a PARP1^{-/-} egerekben [77]. A PARP1 modulálja a CD4⁺ sejtek regulatórikus T-sejt (Treg) irányú differenciálódását is [78, 79], mivel PARP1^{-/-} egerek lépében és a nyirokcsomókban megnő a CD4⁺CD25⁺/Foxp3⁺ Treg sejtek száma, bár maguknak a Treg sejteknek a funkcióiban nem tapasztaltak változást [79]. Eddigi adatok alapján úgy tűnik, hogy a PARP1 viszont nem befolyásolja sem a Th1 [77], sem a Th17 irányú differenciációt [79].

Ezekeken felül, a PARP1 szabályozza a dendritikus sejtek (DCk) érési folyamatát a DCk-ben az IL10 és IL12 termelésének, illetve az NF- κ B transzaktivációnak a szabályozásával [80].

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a PARP1 az immunválasz fontos szabályozója, amelynek terápiás relevanciája lehet.



4. ábra. A PARP1 biológiai szerepének sokrétűségét bemutató vázlat (szerkesztve Swindall, 2013 nyomán)

A PARP1 részt vesz többek között a DNS-javítás, kromatin módosítás, gyulladás, sejthalál és transzkripció szabályozásában [81].

Rövidítések: XRCC1 (X-ray repair cross complementing protein 1), YY1 (Yin Yang 1), NF-AT (T-sejtek nukleáris faktora), Sp1 (specificity protein 1), AP1 (aktivátor fehérje 1), NF-κB (nukleáris faktor-kappa B), ROS (reaktív oxigéngyökök), iNOS (indukálható nitrogén-oxid szintáz), TNFα (tumor nekrosis faktor alfa), NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid), ATP (adenozin-5'-trifoszfát), SSB (egyszálú DNS törés), BER (báziskivágó hibajavítás), DSB (kettősszálú DNS-törés), SPR (short patch repair), LPR (long patch repair)

2.3. A PARP2

2.3.1. A PARP2 szerkezete

A humán PARP2 egy 62 kDa-os magi fehérje, amely 570 aminosavból áll. Az enzimet kódoló gén emberben a 14. kromoszóma hosszú karján a 14q11.2 régióban található. Érdekes módon a PARP2 fehérje két izoformáját azonosították, melynek kialakulása alternatív splicingra vezethető vissza, azonban ennek funkcionális jelentősége nem ismert. A PARP2 szerkezetét tekintve az N-terminális DNS-kötő doménből, a központi WGR doménből és a C-

terminális katalitikus doménből áll [82]. A PARP2 N-terminális doménje nem tartalmaz cink-ujj motívumokat, hanem egy erősen bázikus DNS-kötő domént (DBD), valamint nukleáris és nukleoláris lokalizációs szignálokat. A PARP2 DBD-je tehát szerkezetileg különbözik a PARP1-étől, ami valószínűleg az egyes enzimek által felismert DNS-struktúrák közötti különbségeket tükrözi. Ennek megfelelően a PARP1-gyel ellentétben a PARP2 kevésbé hatékonyan kötődik az egyszálú DNS-törésekhez, ehelyett inkább réseket, ún. „gap” struktúrákat ismer fel. A PARP2 WGR doménje szerkezetében homológ a PARP1-ével, de homodimerizációt, DNS-károsodástól függő autoPARilációt és fehérje-fehérje interakciókat közvetít, olyan funkciókat, amelyeket a PARP1 BRCT motívumot hordozó doménjének tulajdonítanak [83]. A kaszpáz-3 hasadási hely határozza meg a határvonalat a DBD és a WGR domén között, amely homológ a PARP1 WGR doménjével. A PARP2 C-terminális katalitikus doménje megközelítőleg 69%-os homológiát mutat a PARP1 katalitikus doménjével [2] (5. ábra).



5. ábra A humán PARP2 fehérje doménszerkezetének sematikus ábrázolása

A PARP2 az N-terminális DNS-kötő doménből, amely a PARP1-től eltérően nem tartalmaz cink-ujj motívumokat, a központi WGR doménből és a C-terminális katalitikus doménből áll [58].

Rövidítések: WGR (triptofán-glicin-arginin domén), NLS (nukleáris lokalizációs szignál)

2.3.2. A PARP2 biológiai funkciói

A PARP1 és a PARP2 funkcióiban számos átfedés van a DNS-károsodásra adott sejtválaszban. Például mindkét fehérje heterodimerizálódik és több közös nukleáris kötőpartnerük is van [83]. Mindkét enzim egyaránt részt vesz az SSBR folyamatában, azonban a PARP1 a duplaszálú DNS törések (DBS) hibajavításában is részt vesz, vagy a DNS-függő fehérje kinázzal (DNA-PK) való kölcsönhatáson keresztül, vagy a NHEJ útvonalon keresztül [84]. A PARP1-nek és a PARP2-nek közös partnereik vannak az SSBR és BER útvonalakon, bár a PARP2-nek egyedi partnerei is vannak, például a TRF-2 telomerikus fehérje [85, 86]. A PARP1 és PARP2 kettős knock-out (KO) egerek nem életképesek, az embrió már a gasztruláció kezdetén elhal, ami alátámasztja a PARP1 és PARP2 szerepét az embrionális fejlődésben [24].

Mindkét PARP modulálja a kromatin szerkezetet a hiszton fehérjék PARilálása révén, de míg a PARP2 a H2B hisztont, addig a PARP1 leginkább a H1 hisztont célozza meg [87].

A két enzim nagyfokú szerkezeti és funkcióbeli hasonlóságuk ellenére különböző biológiai szereppel bírnak [88]. A PARP2 számos sejttípus differenciációjának szabályozásában is részt vesz, beleértve a timocitákat [89], eritrocitákat [90], adipocitákat [91] és a spermatocitákat [92]. Érdekes módon, ezeket a sejt differenciációs folyamatokat a PARP2 különböző mechanizmusok révén szabályozza. A timociták és az eritrociták esetében a PARP2 DNS hibajavító funkciója közvetíti a hatást. Adipogenezis során a PARP2 a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor γ (PPAR γ) transzkripció faktor kofaktoraként funkcionál, spermatogenezis során pedig a PARP1-gyel közösen a kromatin remodelinget szabályozza [93]. Újabb kutatások a PARP1 és a PARP2 koordinált szerepét mutatják a T-sejtek számának és működésének fenntartásában [94], valamint a B-sejtek fejlődésének és funkcióinak elősegítésében [95]. Olyan egerekben, amelyekben T-sejt specifikus kondicionális deléciónal a PARP1-et és PARP2-t is kiütötték, a T-sejtérés defektje, és a perifériás vérben a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek csökkent száma volt megfigyelhető [94]. Olyan egerekben pedig, ahol B-sejt specifikusan történt a PARP1 és PARP2 deléciónal, a B-sejtek csontvelői fejlődése károsodott, ami a csontvelő átmeneti és follikuláris zónájában a B-sejtek számának csökkenéséhez vezetett [95].

2.3.3. Metabolikus szabályozás

A PARP2 transzkripció regulátorként is működik, és ezáltal részt vesz a metabolikus homeosztázis szabályozásában. A PARP2 a PPAR γ pozitív regulátoraként szabályozza az preadipociták differenciációját érett zsírsejteké [91]. A PARP2 a sejtek energiaháztartását is szabályozza azáltal, hogy a SIRT1, az oxidatív metabolizmus egyik legfontosabb regulátora promóterének represszoraként funkcionál. A PARP2 deléciónal hatására egerekben növekszik a vázizomban és májban is a SIRT1 aktivitása, ami elősegíti a mitokondriális biogenezist és ezáltal a sejtanyagcsere fokozódik. Ezzel összefüggésben a PARP2^{-/-} egerek védettek a magas zsírtartalmú diéta által indukált elhízással szemben [96].

Ezekon felül, PARP2^{-/-} egerek májában és vázizmaiban is átalakul a koleszterol metabolizmus a szterol regulált elemet kötő fehérje (SREBP)1, a lipid metabolizmus fő transzkripció faktora aktivitásának növekedésének következtében. Ennek hatására májban és az izomban is megnövekedett a felhalmozott koleszterol mennyisége, valamint májban megnőtt

az LDL/HDL lipoproteinek aránya [97], a vázizomban pedig az androgén szteroidok fokozott szintézisét írták le a PARP2 deléció hatására [98].

A PARP1 és a PARP2 számos transzkripciós faktor, köztük olyan nukleáris receptorok, mint PPAR és az ösztrogén receptor (ER) α kofaktoraként működik. A PPAR-ok heterodimerizálódnak a retinoid X-receptorral (RXR), és így kötődnek a DNS-hez [99]. A PPAR-ok az energia-, lipid- és glükóz homeosztázis szabályozásában részt vevő gének nagyszámú csoportjának expresszióját szabályozzák [2]. Különböző hormonok, mint az inzulin [100], ösztrogének [101-103], androgének [104], progeszteron [105], mesterséges szteroidok és D-vitamin [98] módosíthatják a PARP1 és PARP2 expresszióját és aktivitását. Ezek az adatok pedig a hormonhatások PARP-függő visszacsatolós szabályozására utalnak [106].

2.3.4. PARP2 szerepe a gyulladásos folyamatok szabályozásában

A PARP2 gyulladásban betöltött szerepéről jóval kevesebb adat áll rendelkezésre, mint a PARP1 esetében. Az eddigi ismereteink alapján úgy tűnik, hogy a Th2 típusú gyulladásos folyamatokban a PARP1-gyel ellentétben a PARP2-nek nincs szerepe. Viszont a szklerózis multiplex modelljében, a Th17 sejtek által mediált experimentális autoimmun encefalitiszben, PARP2^{-/-} egerekben csökkent az idegrendszeri gyulladás mértéke, mérsékelt neuronális gyulladást és limfocita infiltrációt mutattak és az egerek védettek voltak a fokális agyi iszkémia ellen [107]. Valamint a PARP2 expressziójának specifikus antiszensz oligonukleotidokkal történő gátlása csökkentette a gyulladást a krónikus vastagbélgyulladás IL-10-hiányos egér modelljében [108, 109].

A PARP1 és a PARP2 hozzájárulása a gyulladásához eltérő; a PARP1 deléciója szinte teljesen megszünteti a gyulladást, míg a PARP2 csak részleges védelmet nyújt a gyulladásos kórképek egy korlátozott csoportjában a PARP1-hez képest [3]. A gyulladásos mediátorok egy közös csoportját beleértve az iNOS-t, IL-1 β -t, TNF α -t, a PARP1 és a PARP2 egyaránt szabályozza, ami arra utal, hogy ez a két enzim részben átfedő mechanizmusokon keresztül modulálja a gyulladást [2]. A PARP1/2 által közvetített pro-inflammatorikus válaszok nem korlátozódnak a veleszületett immunrendszer sejtjeire, hanem más sejttypusokban, például az endotélsejtekben és a fibroblasztokban is releváns szerepet játszanak [110].

2.4. PARP inhibitorok

2.4.1. A PARP inhibitorok hatásmechanizmusa

A PARP enzimek, különösen a PARP1 és a PARP2 nélkülözhetetlenek az egyszálú DNS-törések javításában. Ezen enzimek gátlása tartós egyszálú törésekhez vezet, ami a DNS replikáció során kettősszálú törések felhalmozódását okozza, és végül a sejtciklus leállításához vagy sejthalálhoz vezet [111]. Közel két évtizeddel ezelőtt kis molekulájú nikotinamid-analógokról kimutatták, hogy gátolják a PARilációt és fokozzák a DNS-károsító dimetil-szulfát citotoxicitását [112, 113]. Az ezt követő gyógyszerkutatási erőfeszítések a klinikai PARP inhibitorok (PARPi), köztük a veliparib (Abbvie), a rucaparib (Pfizer/Clovis), az olaparib (KuDOS/AstraZeneca) és a niraparib (Merck/Tesaro) kifejlesztéséhez vezettek. Újabban egy második generációs, hatékonyabb PARPi-t, a talazoparibot (Lead/Biomarin/Medivation/Pfizer) is forgalomba hozták [114].

A farmakológiai PARPi-k szerkezetileg a nikotinamidot utánozzák, és két általános hatásuk van: (i) a PARP-ok katalitikus gátlása, azaz a PARiláció megakadályozása és (ii) a PARP-ok rögzítése vagy "csapdába ejtése" a károsodott DNS-en. Bár a PARP-ok csapdába ejtését magyarázó pontos mechanizmusok még mindig nem tisztázottak, két lehetőség látszik: (i) a PARPi vagy az autoPARiláció gátlásával megakadályozza a PARP-ok felszabadulását a DNS-ről, vagy (ii) a PARPi katalitikus helyhez való kötődése alloszterikus változásokat okoz a PARP-ok szerkezetében, ami növeli a DNS-aviditást. Akárhogy is, a csapdába esett PARP-ok megakasztják a replikációs villák előrehaladását [115].

2.4.2. Szintetikus letalitás a HRR-hiány és a PARP-gátlás között

A PARPi-okat a klinikumban széles körben alkalmazzák a rák különböző formáinak kezelésére, mivel elősegítik mind a citosztatikus szerek, mint a ciszplatin és a besugárzás hatékonyságát [116, 117]. A PARPi-ok a szintetikus letalitás koncepciója alapján működnek. Egy évtizeddel ezelőtt felismerték, hogy a HRR hiányos sejtek, melyek klasszikusan a BRCA1 és BRCA2 mutációkhoz kapcsolódnak, rendkívül érzékenyek a PARP-gátlás citotoxikus hatásaira [118, 119]. A szintetikus letalitás esetében a PARPi-ok és a HRR hibák közötti feltételezett mechanizmus, hogy az endogén módon keletkezett SSB-k javításának gátlása PARP inhibitor jelenlétében összeomlott replikációs villákhoz és replikációhoz kapcsolódó DSB-khez vezet, amelyek javításához HRR-re van szükség. HRR hiányában ezek a sérülések letálisnak bizonyulnak, vagy azért, mert fennmaradnak, vagy csak alternatív, hibára hajlamos

útvonalakkal, köztük a nem-homológ végek összekapcsolása (NHEJ) és az egyszálú DNS szálpárosítással (SSA) javíthatók, ami súlyos genomiális instabilitáshoz és sejthalálhoz vezet [120]. A szintetikus letalitás indukciója a szelektív tumorcélzás lehetőségét kínálja, mely számos gyógyszergyártó cég érdeklődését élesztette fel a monoterápiában alkalmazható PARPi-ok iránt, végül több tucat klinikai vizsgálat után az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatóság (FDA) négy PARPi-t (olaparib, niraparib, talazoparib és rucaparib) engedélyezett a BRCA-mutációval rendelkező előrehaladott petefészek- és emlődaganatos betegek kezelésére [121]. Valamint Kínában két, helyben fejlesztett PARPi-t, a fuzuloparibot (korábban fluzoparib) és a pamiparibot is engedélyezték a petefészekrák terápiájában [122, 123]. Meg kell azonban jegyezni, hogy a jelenleg klinikumban alkalmazott PARPi-ok mind a PARP1-et, a PARP2-t és a PARP3-t is gátolják, tehát ún. pan-inhibitorok. A PARPi-ok hatásmechanizmusa a rákos sejtekben kifejtett hatásuk tekintetében viszont úgy tűnik, hogy nagyrészt a PARP1 működésén alapul [121].

2.4.3 A PARP inhibitorok egyéb alkalmazási lehetőségei

Bár a jelenleg forgalomban lévő PARPi-ok klinikai fejlesztése az onkológiára összpontosít, érdemes lehetne egyéb betegségekben is megvizsgálni alkalmazásukat, különösen azon betegségek esetében, ahol a DNS-károsodás a patofiziológiai válasz részét képezi [124].

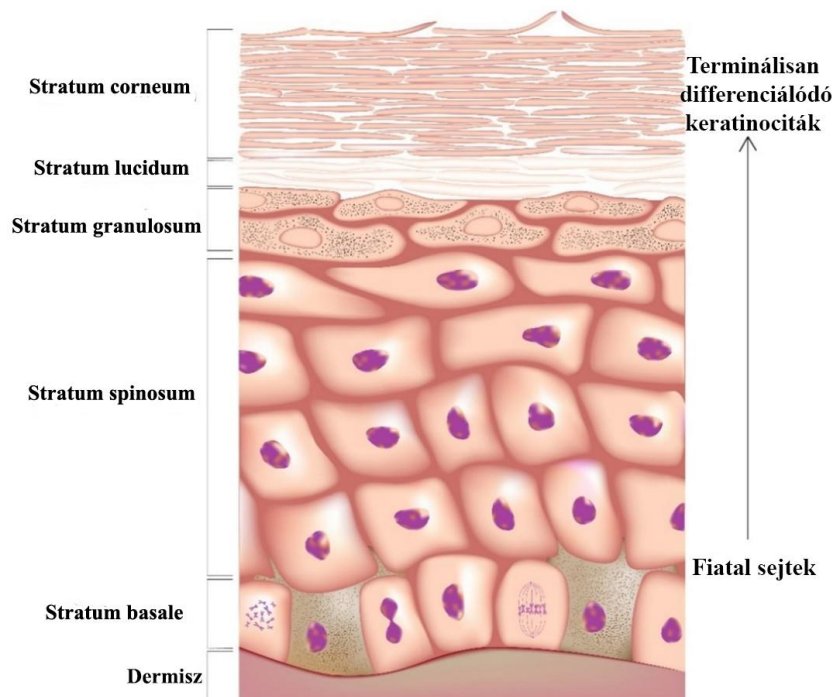
A 90-es évek közepén a stroke [125, 126] és miokardiális infarktus [127] patomechanizmusát vizsgáló tanulmányok hatására megfogalmazódott a kutatókban az a koncepció, hogy a PARPi-ok citoprotektív és/vagy gyulladáscsökkentő szerként is alkalmazhatók lehetnek. Azon kórállapotok listája, ahol a preklinikai vizsgálatok a PARP-gátlás kedvező hatását mutatják igen hosszú, és magában foglalja a neurológiai betegségeket (pl. stroke, neurotrauma, neurodegeneráció), a kritikus betegségek különböző formáit (pl. septicus sokk, akut tüdőelégtlenség, akut májelégtlenség), a reperfúzióval összefüggő szöveti károsodásokat (pl. szívinfarktust követően), a gyulladásos betegségeket (arthritisz, kólitisz, asztma) és az érrendszeri betegségeket (diabéteszes szövődmények, atheroszklerózis). Mindezen betegségek esetében a PARP aktiváció valószínűleg DNS törések következménye, amely, legalábbis részben, a betegség patofiziológiájának részeként keletkező reaktív intermedierek (oxidánsok és szabad gyökök) képződése miatt alakul ki [128]. Ugyanakkor a PARP aktiválódásának más, nem DNS-károsodás-függő mechanizmusai is ismertek [129]; és az is elképzelhető, hogy a bazális PARP-aktivitásnak is lehet patofiziológiai szerepe [124].

2.5. Psoriasis

2.5.1. A bőr szerkezete

A bőr testünk legnagyobb szerve és egyben elsődleges védelmi vonala a környezeti ártalmakkal szemben. A bőrnek három rétege van: epidermisz (hám), dermisz (írha) és hipodermis (bőralja). Mindegyik réteg több sejttípusból tevődik össze, amelyek egyedi és egymást kiegészítő funkciókkal támogatják a bőr homeosztázisát [130]. Az epidermisz a bőr külső rétege, amely legnagyobb részt keratinocitákat, ezen felül melanocitákat, valamint az antigén-prezentáló Langerhans-sejteket és a mechanoreceptorként funkcionáló Merkel-sejteket tartalmazza [131]. Magának az epidermisznek öt rétegét különböztetjük meg, melyek a dermisz felől indulva a stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum és a stratum corneum [132]. Az epidermisz 90%-át a keratinociták teszik ki, amelyek folyamatos megújuláson mennek keresztül. A stratum basale intenzíven proliferáló keratinocitái a bőrfelszín felé vezető út során differenciálódnak, és kialakítják a stratum corneum jellegzetes lapos sejtjeit, melyek a bőr felszínén lassan elhalnak és lehámlanak. Ezeket a már terminálisan differenciálódott keratinocitákat folyamatosan pótolják a bőr belső rétegeiből vándorló differenciálódó keratinociták, mialatt keratin filamentumokat és lipideket választanak ki, és ezáltal hatékony gátat képeznek az idegen anyagok és fertőző ágensek szervezetbe jutása ellen, és minimalizálják a bőr nedvességvesztését [133, 134] **(6. ábra)**.

Az epidermisz felépítése



6. ábra. Az epidermisz felépítése

Az epidermiszt 5 különböző réteg alkotja, ahol a keratinociták a bazális rétegből indulva folyamatos megújuláson mennek keresztül.

2.5.2. A psoriasis epidemiológiája és életminőségre gyakorolt hatásai

A pikkelysömör az egyik leggyakoribb krónikus, gyulladásos bőrbetegség, amely jelentős fizikai és lelki terhet is jelent a betegeknek. A jól látható bőrelváltozások negatív reakciót válthatnak ki másokban, ami a betegséggel együttjáró pszichés teher fő okozója. Más krónikus betegségekkel – többek között a daganatos betegségek, szívinfarktus és a pangásos szívelégtelenség – való összehasonlítás során csak a depresszió és a krónikus tüdőbetegség rontotta jobban a pszichológiai életminőséget, mint a pikkelysömör. A psoriasis életminőségre gyakorolt ilyen mértékű negatív hatása főként az olyan, betegek által rendszeresen említett, tünetekkel állhat összefüggésben, mint a fájdalom, viszketés, vérzés és az égő érzés [135, 136]. 2014-ben az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a WHA67.9. számú határozat értelmében a pikkelysömört súlyos, nem-fertőző betegségként ismerte el és megállapította, hogy növekvő epidemiológiai jellege miatt jelentős, globális közegészségügyi terhet jelent a világ népességére [137]. Európában és Észak-Amerikában a pikkelysömör előfordulási gyakorisága átlagosan 2%, mely kisgyermekkorban alacsonyabb, majd az életkor előrehaladtával növekszik [138]. A betegek körülbelül 70-80%-ának csak enyhék a tünetei, amely lokális terápiával kezelhető

[139]. Az éghajlat, a napkitettség és az etnikai hovatartozás feltételezhetően befolyásolja a pikkelysömör tüneteinek súlyosságát, télen általában súlyosbodik, nyáron pedig javul a betegség lefolyása [140]. A pikkelysömör sajnos nagyon gyakran együttjár más krónikus, és sok esetben súlyos megbetegedés kialakulásával is. Ezen társbetegségek közé tartozik az psoriasis-os arthritisz, a metabolikus szindróma vagy ennek egyes komponensei, a nem-alkoholos szteatohepatitisz, kardiovaszkuláris betegségek, a Crohn-betegség, a T-sejtes bőr limfóma, valamint mentális zavarok, leggyakrabban a depresszió és a szorongás [141-143].

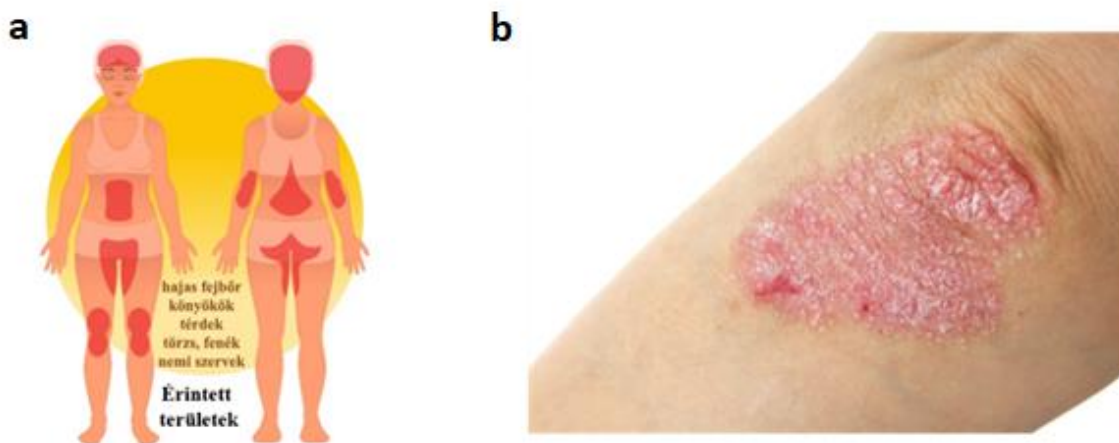
2.5.3. Genetikai tényezők a pikkelysömör kialakulásában

A psoriasis kialakulásában az örökletesség jelenti a legfőbb kockázati tényezőt [144]. Ezt bizonyítja, hogy egypetűjű ikrek esetében két-háromszor nagyobb esélye van a psoriasis megjelenésének, mint kétpetűjű ikrek esetében [145]. A psoriasis-ban szenvedő betegek (gyermekek és felnőttek) körülbelül 30%-ának van érintett elsőfokú rokona [146]. Asszociációs analízisek 9 olyan genomi lókuszt azonosítottak, amelyek a betegség kialakulásával összefüggésbe hozhatók, melyeket együttesen PSORS-nak (psoriasis susceptibility locus) neveztek el [147]. Közülük a legfontosabb a PSORS1, mely a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) régió belül helyezkedik el a genomban, és a psoriasis-ra való genetikai hajlam mintegy 35-50 %-áért tehető felelőssé [148]. A PSORS1 lókuszon belül azonosított a HLA-C*06:02 allél pedig a legdominánsabb kockázati gén a psoriasis kialakulására, amelyet a korai kezdetű (40 éves kor előtt megjelenő) psoriasis-ban szenvedő betegek akár 60%-a hordoz. Érdekeség azonban, hogy a késői kezdetű (40 éves kor után megjelenő) pikkelysömört és a betegség pustuláris megjelenésű formáit nem lehet összefüggésbe hozni a HLA-C*06:02 alléllal [149].

A genom szintű asszociációs vizsgálatok számos meta-analízisét követően, ma már több, mint 80 új PSORS-lókuszt azonosítottak különböző populációkon végzett vizsgálatok során [150]. Ezek között számos olyan gén található, amelyek az NF- κ B jelátviteli kaskád komponenseit kódolják, mint például a protoonkogén c-Rel (REL), az NF- κ B inhibitor zéta (NFKBIZ), az NF- κ B inhibitor alfa (NFKBIA), a tumor nekrosis faktor receptorhoz kapcsolódó faktor 6 (TRAF6) és a kaspáz toborzási domént tartalmazó fehérje 14 (CARD14) [151, 152]. Több olyan gént is azonosítottak, amely a veleszületett és adaptív immunrendszerben szerepet játszó fehérjéket kódol: TNF α , az I. típusú interferon (IFN-I), az IL12 és IL23. Ezen felül a Th17 limfociták és a citotoxikus T17 limfociták (Tc17) fejlődését és polarizációját befolyásoló fehérjéket kódoló géneket is találtak [153, 154].

2.5.4. Klinikai megjelenés

A pikkelysömör leggyakoribb formája a plakkos psoriasis (psoriasis vulgaris), amely az esetek nagy többségét, akár 90%-át teszi ki. Megjelenését tekintve a kisebb erythemás, pikkelyes papuláktól a nagy, élesen körülhatárolt, emelkedett, vörös vagy fehér pikkelyes plakkokig terjedhetnek, amelyek leggyakrabban szimmetrikusan oszlanak el a térd, a könyök, a fejbőr, a gluteális redő és a lumboszakrális régió területén [155, 156] (**7. ábra**). A körmök is érintettek lehetnek, különösen, ha krónikus ízületi gyulladás is jelen van, valamint alkalmanként a pikkelysömör a szájnyálkahártyán vagy a nyelven is jelentkezhet [157]. A krónikus plakkos psoriasis két különböző altípusát írták le: I-es típusú psoriasis, amely 40 éves kor előtt jelentkezik és a betegek 75%-át teszi ki. Ezek az egyének nagyobb valószínűséggel szenvednek a betegség súlyosabb lefolyásában, gyakran szisztémás kezelést igényelnek, pozitívak a HLA-Cw*06:02 allélra és családi halmozódást mutatnak. A II-es típusú pikkelysömör a betegek kb. 25%-át érinti és 40 éves kor után jelentkezik először [158]. A pikkelysömör egyéb altípusai a guttált pikkelysömör (psoriasis guttata), amelyet pikkelyes, könnyecsepp alakú foltok jellemeznek; az inverz psoriasis, más néven flexurális pikkelysömör, amely általában a bőrredőkben található; pustuláris pikkelysömör és az eritrodermikus pikkelysömör (psoriasis erythroderma), amely a pikkelysömör ritka, de nagyon súlyos változata [143, 159].



7. ábra. A psoriasis klinikai megjelenése

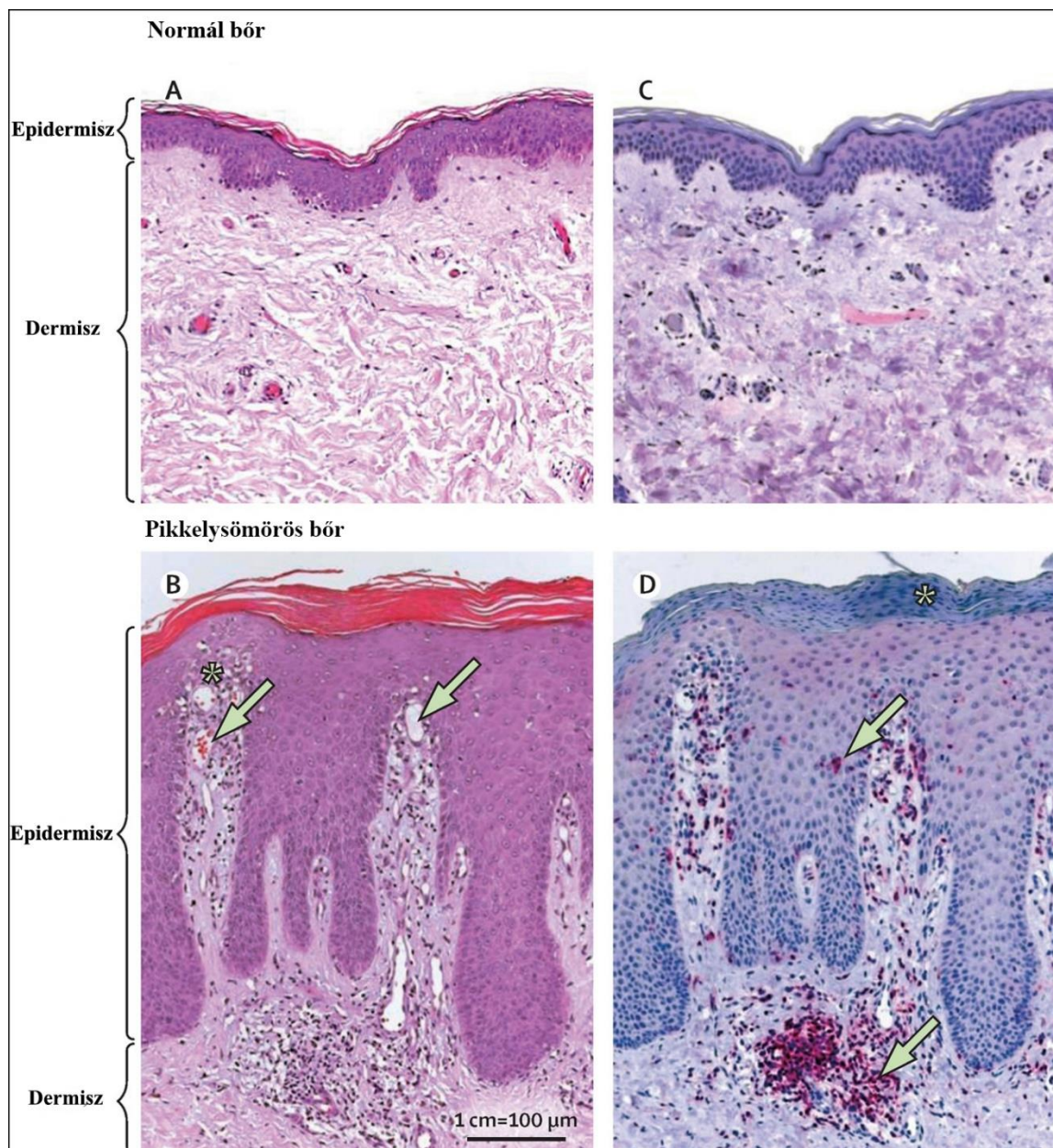
(a) A psoriasis leggyakoribb megjelenési formája a psoriasis vulgaris, vagy plakk típusú psoriasis, mely tipikusan a térd, a könyök, a fejbőr, a gluteális redő és a lumboszakrális régió területén alakul ki. (b) Jellemzői az élesen körülhatárolt, vöröses színű, néhol ezüstös, hámló plakkok az érintett bőrfelületen.

2.5.5. Szöveti patológia

A pikkelysömörös plakkok felszíni pikkelyesedést mutatnak, mivel a szaruréteg a kórosan differenciálódott keratinocitákból alakul ki, amelyek rendellenesen megtartják a sejtmagot (parakeratózis), valamint a fokozott keratinocita proliferáció és elégtelen differenciálódás következtében az epidermisz megvastagodik (akantózis) [160]. A megváltozott epidermális sejtciklus miatt a pikkelysömörös bőr keratinocitái már 6-8 nap alatt elérik a bőr felszínét a bazális rétegből indulva, míg a normál bőr esetében ez az idő körülbelül 40 nap [161]. Valamint, a bazális keratinocitákban a sejtciklus 311 órától 36 órára rövidül psoriasisban, ami a keratinocita proliferáció jelentős felgyorsulását jelzi [162].

A citoskeletonális fehérjeprofil változása, vagyis a keratinok expressziójának módosulása is jellemző a pikkelysömörös epidermiszben. A korai differenciálódás markereinek, mint amilyen a stratum spinosum-ra jellemző keratin 1/10 (K1/K10), expressziója csökken, míg a keratin 6/16 (K6/K16) expressziója növekszik, amely a keratinociták erősen aktivált és proliferatív stádiumára utal [163]. Ezen kívül, a transzglutamináz 1 expressziója növekszik, míg a késői differenciálódási markerek (filaggrin, lorikrin és kaspáz-14) expressziójának csökkenése figyelhető meg a pikkelysömörös léziókban [160, 164].

A léziós bőrben jellemzően lecsökken vagy hiányzik a stratum granulosum, amelyben normál esetben a keratinociták terminális differenciálódása megkezdődik. A pikkelysömör fontos szövettani jellemzője az epidermisz dermisz felé irányuló nyúlványainak elongációja (papillomatosis) is. Jól látható a léziók szövettani képén az immunsejtes infiltráció, mely a dermisz felső rétegében elsősorban dendritikus sejtekből (DC) és CD4⁺ Th sejtekből, az epidermiszben pedig főleg CD8⁺ T sejtekből tevődik össze [165, 166]. Időnként az epidermiszben megfigyelhetők neutrofil granulociták felhalmozódásai is a parakeratotikus pikkelyekben (Munro-féle mikroabscesszusok), vagy az esetlegesen a stratum spinosum-ban kialakuló pusztulákban (Kogoj-féle mikropusztulák) [167]. A dermális erek megnyúlnak, kanyargóssá válnak, ezen erek jelentős kitágulása okozza a pikkelysömörös léziók vörös színét. Ehhez járul hozzá a keratinociták által termelt vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), amely az endotélsejtek migrációjának, túlélésének és proliferációjának elősegítésével angienezist indukál [168-170] **(8. ábra)**.



8. ábra. A pikkelysömörös lézió szövettani jellemzői

A jellegzetes pikkelysömörös epidermiszben akantózis, hiperkeratózis és a hám nyúlványainak elongációja figyelhető meg. (A, normál bőr és B, pikkelysömörös bőr; hematoxin-eozin festés). A lézióban a kitágult erek a bőr papilláinak csúcsaiba nyúlnak (B, nyilak), illetve vegyes gyulladásos infiltrátum látható, amelyben neutrofilek halmozódnak fel az epidermiszben (B, csillag). A stratum corneum-ban megtartott sejtmagok szintén jellemzőek a psoriasis-os bőr elváltozására (D, csillag). A normál bőrrel ellentétben, CD3 immunhisztokémiai festés jelentős számú T sejtet mutat ki a pikkelysömörös dermiszben és az epidermiszben (D, nyilak) [139].

Rövidítés: CD3 (3. differenciálási klaszter)

2.5.6. A psoriasis immun-patogenezise

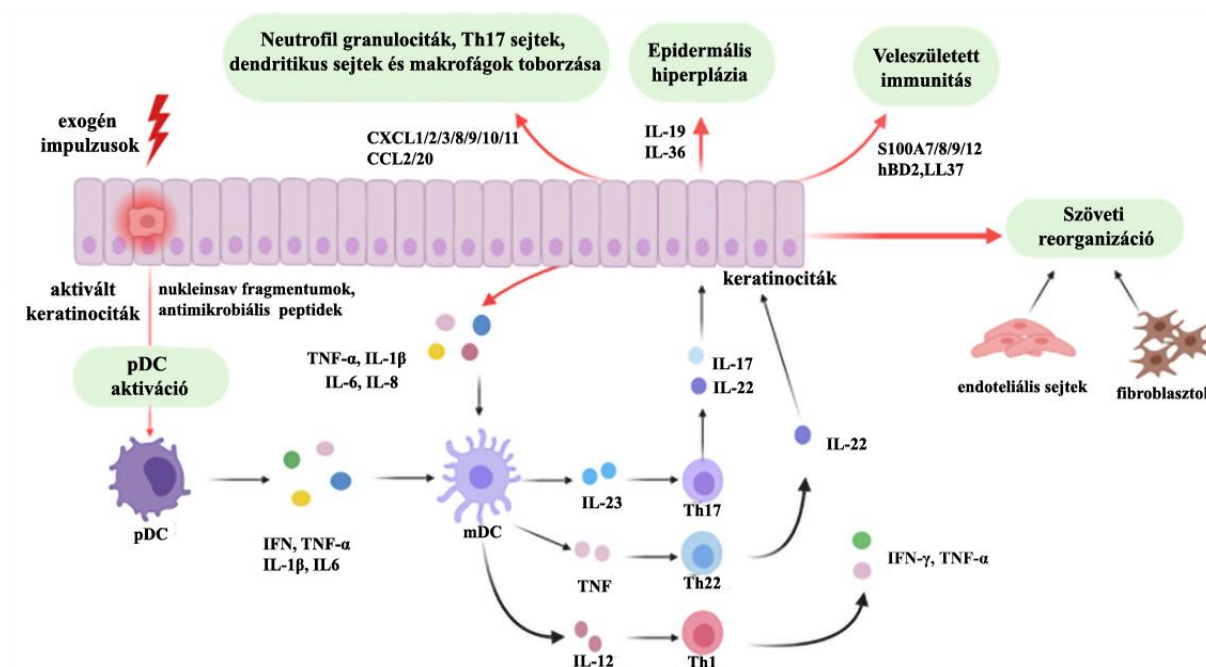
A psoriasis-t elsősorban egy immun-mediált betegségnek tekintjük [171], amit jól mutat, hogy a pikkelysömörös betegeken végzett genomszintű vizsgálatok túlnyomórészt immunrendszeri géneket azonosítottak a diszregulált gének között [172, 173]. Eddigi ismereteink szerint, a pikkelysömör patomechanizmusában mind a veleszületett, mind az adaptív immunitásnak a zavara is szerepet játszik [143].

A különböző genetikai és környezeti hatásokra aktiválódó plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC) pro-inflammatorikus citokineket, köztük IFN α -t, IFN γ -t, TNF α -t, IL1 β -t és IL6-ot termelnek, amelyek ezt követően a mieloid dendritikus sejtek (mDC) aktivációjában vesznek részt. Az aktivált mDC-k IL12-t, TNF α -t és IL23-at termelnek, amelyek ezt követően aktiválják a Th1 és Th17 sejteket, amire ezek a sejtek elsősorban TNF α , IL17, IL21 és IL22 fokozott szekréciójával reagálnak. Ezek a citokinek (különösen az IL17A) a keratinocitákat ugyancsak aktivált állapotúvá alakítják, amelyek így antimikrobiális peptideket és különféle citokineket, kemokineket köztük IL6-ot, a kemokin ligand 8-at (CXCL8/IL8), TNF α -t termelnek, amelyek fenntartják a mDC-k folyamatos aktivált állapotát, ezzel kialakítva a psoriasis-ra jellemző krónikus, amplifikációs gyulladásos ciklust [174, 175].

2.5.7. A keratinociták szerepe psoriasisban

Hosszú időn keresztül a keratinocitákat csupán végrehajtónak tekintették a psoriasis patomechanizmusában, melyek az immunsejtek funkcióinak ellátásához asszisztálnak [15, 176]. Ma már azonban tudjuk, hogy a keratinociták a bőr korai immunvédekezési mechanizmusainak kulcsfontosságú szereplői [177], amelyek alapvető szerepet játszanak a pikkelysömör kezdeti és fenntartó fázisában egyaránt. A keratinociták számos stimulus, például DC és T sejt eredetű pro-inflammatorikus citokinek, hatására képesek aktivált állapotba kerülni. [178]. Az aktivált keratinociták hiperproliferatívak, és jelentős mennyiségű kemokint választanak ki (pl. CXCL1/2/3, CXCL8, CXCL9/10/11, CCL2 és CCL20), ami az iniciáció helyére vonzza a leukocitákat (pl. neutrofilek, Th17 sejtek) DCk-et és makrofágokat; valamint antimikrobiális peptideket (pl. S100A7/8/9/12, hBD2 és LL37) is termelnek, amelyek egyrészt kemotaktikus faktorként működnek, másrészt formálják az immunsejtek, DCk és makrofágok funkcióit. Ezen kívül, a keratinociták a fibroblasztokkal és az endotélsejtekkel együtt, az endotélsejtek proliferációjának aktiválásán, valamint az extracelluláris mátrix depozícióján keresztül szöveti reorganizációhoz vezetnek [179-181] (**9. ábra**). A keratinociták és az immunsejtek, különösen a Th17 sejtek, közötti interakció tehát a pikkelysömör iniciációját és

fenntartását is segíti, amelynek részét képezi a keratinociták hiperproliferációja és aberráns differenciációja, a tágult és hiperplasztikus vérerek megjelenése, valamint a gyulladásos sejtek, például neutrofilek infiltrációja [178, 182, 183].



9. ábra. A keratinociták szerepe a pikkelysömör patogenezisében

Ez az ábra a pikkelysömör kóros folyamatát főként a keratinociták szemszögéből mutatja be. A keratinocitákat számos környezeti tényező stimulálhatja, majd az így aktivált keratinociták nukleinsav fragmentumokat és antimikrobiális peptideket szabadítanak fel, amelyek aktiválják a pDC-eket és később a mDC-eket is, amelyek részt vesznek a pikkelysömör kezdeti fázisában. A citokinek stimulációját követően, az aktivált keratinociták befolyásolják a pikkelysömör patológiáját a gyulladásos infiltráció, az epidermális hiperplázia, a veleszületett immunitás, a szöveti reorganizáció stb. szempontjából [176].

Rövidítések: mDC (mieloid dendritikus sejt), pDC (plazmacitoid dendritikus sejt), IL (interleukin), TNF (tumor nekrosis faktor), Th (helper/segítő T-sejt), IFN (interferon), hBD2-LL37 (antimikrobiális peptidek), CXCL (kemokin (C-X-C motívum) ligandum), CCL (kemokin (C-C motívum) ligandum)

2.5.8. Az IL17 citokin család szerepe psoriasis-ban

Az IL23A/IL17 citokin tengelyt a pikkelysömör egyik fő mozgatórugójának tekintik. Az IL23A kulcsfontosságú szerepet játszik az IL17-termelő Th17 sejtek aktivációjában, illetve aktivált állapotuk fenntartásában [181]. Eredetileg csak az immunsejt-eredetű IL23A-t tartották a psoriasis patomechanizmusa szempontjából fontosnak, de az utóbbi évek tanulmányai bebizonyították, hogy a keratinociták által termelt IL23A már önmagában is elég pikkelysömör jellegű dermatitisz iniciációjához egerekben [184].

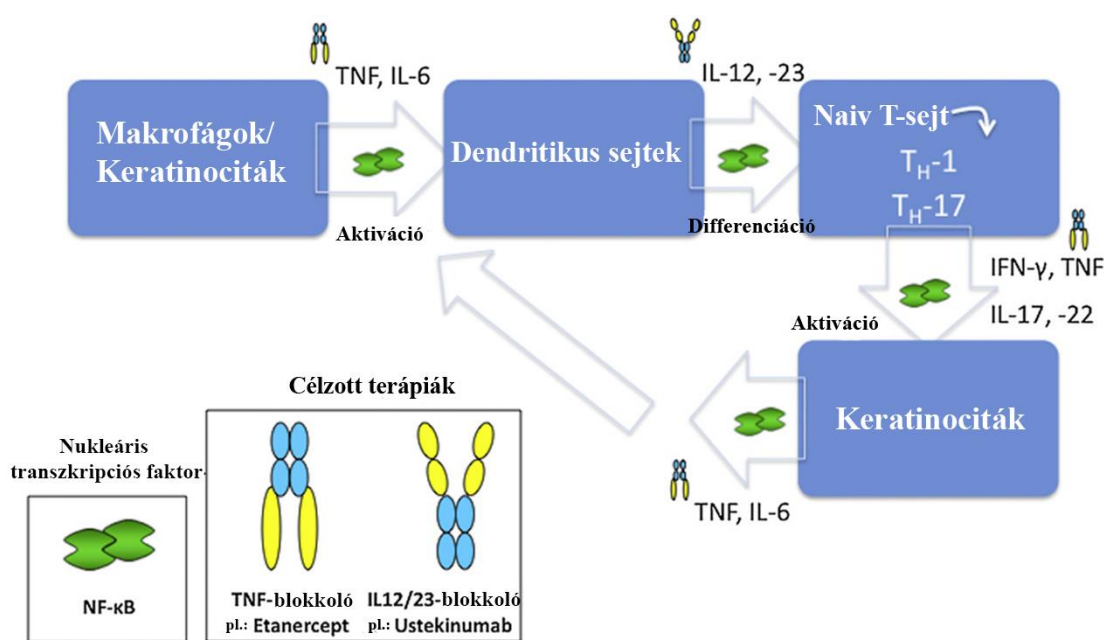
Az IL17 citokin család hat tagból áll: IL17A (közismert nevén IL17), IL17B, IL17C, IL17D, IL17E (IL25) és az IL17F. Az IL17A a pikkelysömör patogenezise szempontjából a legrelevánsabb tag. Az IL17A a keratinocitákon lévő receptoraihoz kötődve stimulálja a keratinociták antimikrobiális peptid, citokin és kemokin termelését [185]. Másrészt, az IL17A közvetve is epidermális hiperpláziát idézhet elő azáltal, hogy a keratinocitákban indukálja az IL19 és IL36 expressziót [182, 185]. Kevesebb figyelem irányult az IL17 család többi tagjára annak ellenére, hogy valamennyien expresszálódnak pikkelysömörös elváltozásokban. Az IL23-hoz hasonlóan az IL17E (IL25) is immunsejtekből és keratinocitákból származik, amely kimutatható a pikkelysömörös léziók epidermális rétegében [186]. Az IL17C egy túlnyomórészt keratinociták által termelt citokin [186], melynek expressziója nemcsak pikkelysömörben, de atópiás dermatitiszben is megemelkedik [187]. Az IL17C keratinocita specifikus túltermelése egerekben spontán pikkelysömör-szerű elváltozások kialakulását eredményezi [188].

Az IL17 receptorok alegységei az IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD és IL17RE, melyek általában heterodimerként funkcionálnak. Az IL17A, -F, -C, és -E valamennyien olyan heterodimer receptoron keresztül hatnak, amelynek egyik alegysége az IL17RA. Nemrégiben Moos és munkatársai olyan egereken vizsgálták a pikkelysömör-szerű gyulladás kialakulását, amelyek különböző sejttypusaiban, mint a keratinocitákban, T-sejtekben, neutrofilekben vagy makrofágokban, kondicionális delécióval specifikusan kiütötték az IL17RA-t. Azt találták, hogy csak a keratinocita-specifikus IL17RA deléció volt hatékony a bőrgyulladás súlyosságának csökkentésében [189]. Ez alapján arra következtettek, hogy a keratinociták az elsődleges IL17-reszponzív sejtek a psoriasis-ra jellemző gyulladás kialakulása során. Ezen felül, a keratinociták az IL22, TNF α , IL19 és IL20 receptorainak többségét is expresszálják [185].

2.5.9. Az NF- κ B jelátviteli út szerepe psoriasis-ban

Az immunsejtek és a keratinociták közötti kommunikáció egyik legfontosabb közvetítője a psoriasis patogenezisében az NF- κ B jelátviteli út [190], mivel az NF- κ B-t aktiválják a legfontosabb, pikkelysömörre jellemző citokinek, mint például a TNF α vagy az IL17A [191, 192]. Az NF- κ B a legtöbb sejt citoplazmájában inaktív formában, az inhibitor kappa B-hez (I κ B) kötődve található. Intracelluláris vagy extracelluláris ingerek hatására az I κ B lebomlik, és az így leváló NF- κ B p65 alegysége foszforilálódik, belép a sejtmagba, ahol beindítja a célgénjei transzkripcióját [193, 194]. A foszforilált p65 nincs jelen a normál bőr

epidermiszében, ellentétben a pikkelysömörös plakkok epidermiszével, ahol magas a foszforilált p65 szintje, ami szorosan korrelál az epidermális hiperplázia fokával [195]. Az útvonal jelentőségét az is mutatja, hogy a TNF α -t célzó etanercept jelentősen gátolja a p65 foszforilációját az epidermiszben, aminek hatására mérséklődik az epidermális hiperplázia, a keratinocita differenciáció markerei normalizálódnak és általában javul a pikkelysömör klinikai megjelenése [196] (**10. ábra**). Emellett számos genom szintű asszociációs vizsgálat azonosította az NF- κ B jelátviteli kaszkád tagjainak diszregulációját pikkelysömörben. Ezek az adatok egyértelműen arra utalnak, hogy az epidermális NF- κ B aktivációnak kritikus szerepe van a betegség patofiziológiájában [197].



10. ábra. Az NF- κ B aktiváció központi szerepet játszik a pikkelysömör patomechanizmusában

Több sejttípus, köztük a keratinociták és a makrofágok is pro-inflammatorikus mediátorok felszabadításával aktiválják a dendritikus sejteket. Az IL12 és IL23 termelés a naiv T-sejtek Th1 és Th17 irányú differenciálódását eredményezi. Különböző interleukinok, az IFN és a TNF Th sejtek általi kiválasztása a keratinociták aktiválódását és a pro-inflammatorikus mediátorok további felszabadulását eredményezi. Az NF- κ B központi szerepet játszik ezeknek a folyamatoknak a közvetítésében. A psoriasis terápiájában jelenleg rendelkezésre álló biológiai ágensek közé tartoznak a TNF-blokkolók, mint például az etanercept, és az IL12/23-blokkolók, mint például az ustekinumab [198].

Rövidítések: IL (interleukin), TNF (tumor nekrosis faktor), IFN (interferon), Th (T helper/segítő sejt), NF- κ B (nukleáris faktor-kappa B)

2.5.10. A pikkelysömör terápiás lehetőségei

Mivel a pikkelysömör krónikus betegség, általában hosszú távú kezelésre van szükség a betegek terápiája során. A pikkelysömörnek különböző súlyosságú formái vannak, ennek értékelésére szolgál az ún. PASI skála, ami a psoriasis területi és súlyossági index. Ez négy

anatómiai hely értékelését foglalja magában: fej, karok, törzs és lábak, és mindegyiknél a jellemző elváltozásokat értékeli, mint a hámlás, a bőr vastagságának és pirosságának, az erythema-nak a mértéke. A maximálisan elérhető pontszám 72, ami a betegség legsúlyosabb, teljesen kifejlődött formáját jelenti [199, 200]. A betegek 80%-a azonban enyhe vagy közepesen súlyos pikkelysömörben szenved. Sok esetben összetett kezelésre van szükség, amely gyakran a mellékhatások magas kockázatával jár [201]. A pikkelysömör hagyományos kezelési lehetőségei közé tartoznak a helyi terápiák: kortikoszteroid-tartalmú krémek, D-vitamin-analógok és a fényterápia, amelynek során ultraibolya B (UVB) és ultraibolya A (UVA) sugárzást együttesen alkalmaznak, vagy az UVA sugárzást fényérzékenyítő gyógyszerrel (pszoralén) kombinációban is szokták használni (PUVA). Abban az esetben, ha a betegség súlyosabbá válik, szisztémás gyógyszeres terápiát (metotrexát, retinoidok és ciklosporin) szükséges alkalmazni. Ezek azonban toxikus tüneteket okozhatnak, emiatt korlátozzák hosszú távú alkalmazásukat [202, 203].

A biológiai gyógyszerek bevezetése forradalmasította a pikkelysömör mérsékelt és súlyos formáinak kezelését [204]. A TNF α , az IL23 és az IL17 elleni biológiai készítmények óriási eredményeket mutattak a pikkelysömör terápiájában. Ezek közé a biológiai terápiák közé tartoznak a monoklonális antitestek vagy inhibitorok, amelyek a TNF α -t (infiximab, adalimumab; certolizumab pegol, etanercept), az IL23/IL12p40-t (ustekinumab), az IL23-at (guselkumab, tildrakizumab, risankizumab) vagy az IL17-et (secukinumab, ixekizumab, brodalumab) célozzák [16, 205]. Azonban ezeknek a biológiai szerekeknek az alkalmazása sokszor kockázatot jelent a betegre nézve. Számos mellékhatásuk van, valamint egy idő után csökken a hatékonyságuk és fenyeget a kiújulás veszélye a szerek abbahagyása után, így ezek a tényezők mind folyamatosan arra ösztönzik a tudósokat, hogy új terápiás lehetőségek után kutassanak [176].

2.5.11. Az imikimod által indukált psoriasis modell

A megfelelő preklinikai állatmodellek hiánya sokáig akadályozta a pikkelysömör patogenezisének kísérleti *in vivo* kutatását, tekintettel arra, hogy ez a betegség kizárólag az embereket érinti, bár egyes majom fajoknál pikkelysömörös plakkok spontán kialakulását már leírták [206, 207]. Ahogy genetikai és molekuláris biológiai ismereteink szaporodtak a psoriasis patofiziológiáját illetően, úgy szaporodott a psoriasis egér modelleinek száma is [208]. 1963-ban írták le a betegség első állatmodelljét [209, 210], és azóta mintegy 1600 olyan

publikáció jelent meg, amelyben a pikkelysömör valamelyik állatmodelljét tanulmányozták [211].

Az imikimod (IMQ) egy toll-like receptor (TLR) 7/8 agonista, amely erős immunogenitással bír. Az 5%-os IMQ-tartalmú Aldara krémet a humán papillomavírus okozta bőrelváltozások, aktinikus keratózisos és bazálsejtes karcinómák kezelésére használják, azonban érdekes módon, mellékhatásként pikkelysömör-szerű kitöréseket figyeltek meg az arra hajlamos egyéneknél az Aldara alkalmazása során [212, 213]. Azóta, hogy 2009-ben van der Fits és munkatársai először publikálták, hogy az IMQ folyamatos epikután alkalmazása egerekben a pikkelysömörhöz hasonló bőrgyulladást okoz, az IMQ által kiváltott akut dermatitisz a psoriasis legszélesebb körben használt állatmodellje lett [214]. Az IMQ által okozott elváltozásokat erythema, az epidermisz megvastagodása, hámlás, akantózis, parakeratózis és angiogenezis jellemzi. A lézióban a gyulladásos infiltrátum CD4⁺ T-sejtekből, CD11c⁺ DCk-ből és pDCk-ből áll. Kimutatták, hogy az egerekben az IL23p19 és az IL17RA hiánya szinte teljesen kivédi a dermatitisz kialakulását, ami bizonyítja, hogy a humán betegséghez hasonlóan az IMQ által indukált bőrbetegség kialakulása is az IL23/IL17 tengely függvénye [214].

Az IMQ modell előnye a gyulladásos reakció akut jellege, és hogy viszonylag olcsó és csak helyi alkalmazást igényel [215]. Hátránya azonban, hogy szisztémás, gyulladásos immunválaszt idézhet elő, amelynek következtében splenomegália és limfadenopátia alakulhat ki, valamint az alkalmazás helyének vakaródzása kisebbedést és az epidermisz túlzott megvastagodását eredményezheti [216].

A psoriasis kialakulását befolyásoló tényezők rendkívüli sokfélesége kizárja egyetlen fő ok kijelölését. Mindegyik egér modellnek megvannak a maga erősségei és korlátai, amelyek elsősorban az emberi és az egérbőr közötti jelentős morfológiai különbségekből adódnak, ezért a laboratóriumi állatok nem tekinthetők a betegséget teljesen pontosan tükröző modelleknek. Mindazonáltal, az egér *in vivo* modellek segítségével jelentősen bővültek a pikkelysömör okairól, patogenezisééről és kezelési lehetőségeiről rendelkezésre álló ismereteink [17, 18].

III. Célkitűzések

Munkánk során a PARP1 és a PARP2 lehetséges szerepét kívántuk feltárni a psoriasis-ra jellemző gyulladás szabályozásában, és arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon a PARP1 és/vagy a PARP2 diszregulációja részt vehet-e a pikkelysömör patomechanizmusában.

Számos irodalmi adat mutatja, hogy a PARP1 elsősorban a Th2 típusú gyulladás kialakulásában játszhat szerepet, mivel a PARP1 deléciója a gyulladás mértékének csökkenését eredményezte számos Th2 típusú gyulladásos folyamat egér modelljében. Ezzel szemben a PARP2 gyulladásban betöltött szerepéről jóval kevesebb adattal rendelkezünk, azonban eddigi ismereteink alapján azt feltételeztük, hogy a PARP1 és a PARP2 szerepe eltérő lehet a gyulladás szabályozásában, mivel a PARP2-nek a Th2 típusú gyulladásos folyamatokban nem ismert a szerepe.

Munkánk első részében társszerzőink PARP1^{-/-} egereken vizsgálták az imikimod által indukált psoriasis modellt, ahol az irodalmi adatokkal ellentétben a PARP1-et gyulladásgátló faktorként azonosították, és a tünetek súlyosbodását tapasztalták. Ezek alapján további vizsgálatainkhoz a következő célokat tűztük ki:

1. Psoriasis-os betegek bőr biopsziáiban a PARP1 expressziójának vizsgálata.
2. *In vitro* sejt kultúrák kísérletekben keratinociták imikimod kezelésre és PARP gátlásra adott reakciójának tanulmányozása.

A PARP1 esetében a psoriasis modell vizsgálata során tapasztaltak hatására szeretnénk volna megvizsgálni, vajon a PARP2-nek is lehet-e szerepe a pikkelysömör kialakulásában. Ennek feltárása érdekében munkánk második részében a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Psoriasis-os betegek bőr biopsziáiban a PARP2 expressziójának vizsgálata.
2. A psoriasis egér modelljének, az imikimod által indukált bőrgyulladásnak a tanulmányozása PARP2^{-/-} egereken.
3. *In vitro* sejt kultúrák kísérletekben a PARP2^{-/-} egerekben kialakuló fenotípus mögött rejlő molekuláris mechanizmusok vizsgálata PARP2 csendesített keratinocita sejtekben.

IV. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok

Munkánk során a **1. táblázatban** feltüntetett anyagokat használtuk, a megjelölt koncentrációban és inkubációs idővel. Az IL17A és TNF α kezelést együttesen alkalmaztuk a sejtek kezelése során, 6 órán keresztül a megjelölt koncentrációkban. Ezekkel az anyagokkal 72 órás kezelést csak a sejtek differenciálása során végeztünk. A Western blot, a reverz transzkripciót követő kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) és az enzimhez kötött immunoszorbens (ELISA) próbák során alkalmazott sejtvonalak és kezelések az ábrafeliratokban vannak jelölve.

Anyag	Koncentráció	Kezelés időtartam	Gyártó és cikkszám
IL17A	200 ng/ml	6 óra/72 óra	R&D Systems/Bio-Techne; 7955-IL
TNF α	10 ng/ml	6 óra/72 óra	Millipore- Sigma-Aldrich; GF023
Talazoparib (TAL)	10 μ M/ 50 μ M	48 óra	Selleck Chemicals Gmbh.; S7048
Olaparib (OLA)	1 μ M	3 óra	Selleck Chemicals Gmbh.; S1060
Rucaparib (RUCA)	1 μ M	3 óra	Merck/Sigma-Aldrich; PZ0036
UPF1069 (UPF)	10 μ M/20 μ M	48 óra	Merck/Sigma-Aldrich; U6010
PJ34	3 μ M	3 óra	Merck; P4365
IMQ	100 μ M	3 óra	Millipore- Sigma-Aldrich; 401020
AMG9810	100 nM	3 óra	Tocris/Bio-Techne; 2316
Gö 6976	2 μ M	3 óra	Merck; 365250
Exemesztán (EXE)	5 μ M	24 óra	Merck/Sigma-Aldrich; PZ0006
Ösztradiol (E2)	1 nM	48 óra	Merck/Sigma-Aldrich; E1024

1. táblázat. A kísérleteink során alkalmazott anyagok, valamint alkalmazott koncentrációjuk és a kezelési idők listája

4.2. Sejttenyésztés

A sejtes vizsgálatokat humán immortalizált keratinocita sejtvonalon (HPV-Ker) végeztük, amelyet a szegedi Creative Laboratory munkatársai hoztak létre. Ehhez rutin plasztikai műtét során egy egészséges személytől vett mintából normál humán epidermális keratinocitákat (NHEK) nyertek ki, ezt követően a sejteket transzfektálták a humán papillóma vírus (HPV) E6/16 onkogént tartalmazó uborka mozaikvírus vektor (pCMV) segítségével. 70 passzázsra át tartó folyamatos tenyésztéssel hozták létre a stabil sejtvonalat.

A HPV-Ker sejteket keratinocita szérummentes médiumban (SFM) tenyésztették, amelyet szarvasmarha hipofízis kivonattal (BPE) (50 µg/ml), humán rekombináns epidermális növekedési faktorral (rEGF) (5 ng/ml) (*Gibco, Thermo-Fisher Scientific, 17005042*), 1% penicillin/streptomocinnal (*Merck KGaA; P4333, Darmstadt, Németország*) és 1% L-glutamin oldattal (*Merck, 59202C*) egészítették ki.

A PARP2-csendesített HPV-Ker keratinocitákat (shPARP2) és a negatív kontroll keratinocitákat (scPARP2) az előbbieken leírt összetételű keratinocita-SFM tápfolyadékban tartottuk fenn, amelyet transzfektált sejtek szelekciójának fenntartása érdekében még 2,5 µg/ml puromicin-dihidrokloriddal (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, A1113803*) egészítették ki.

A sejteket standard laboratóriumi körülmények között, 37 °C-on, 5% (v/v) szén-dioxid atmoszférájú sejttenyésztő inkubátorban tartottuk.

4.3. Géncsendesítés

A PARP2 géncsendesített HPV-Ker keratinociták (shPARP2) létrehozásához egy előre megtervezett, a PARP2-t célzó rövid hajtú-szerkezetű RNS (shRNS) (célszekvencia: ACTATCTGATTCAGCTATTAG; klón azonosító: TRCN0000235599; ref. szekvencia: NM_005484) pLKO.1 vektorba klónozott és lentivírus hordozóba (*Merck KGaA, Darmstadt, Németország*) csomagolt partikulumokat használtunk. A negatív kontroll HPV-Ker sejteket (scPARP2) egy nem-célzott shRNS szekvenciát tartalmazó (*SHC016H; Merck KGaA, Darmstadt, Németország*) lentivirális partikulumokkal történő transzdukcióval hoztuk létre. A pLKO.1 vektor puromicin rezisztencia gént is közvetített, így a transzdukciót követően a puromicin-rezisztens sejteket 2,5 µg/ml puromicin-dihidrokloriddal szelektáltuk.

A csendesítés sikerességét és további kísérleteink során a csendesítés fennállását mind mRNS, mind pedig fehérjeszinten is rendszeres időközönként vizsgáltuk, ehhez Western blot és RT-qPCR módszert használtunk.

4.4. HPV-Ker sejtek differenciálata

A HPV-Ker scPARP2 és shPARP2 keratinociták differenciálásához a sejteket 6-lyukú tenyésztőedénybe szélesztettük (6×10^5 sejt/lyuk) vagy Petri-csészékbe ($22,1 \text{ cm}^2$, $1,4 \times 10^6$ sejt/csésze) helyeztük. Három nap után, illetve Petri-csészében négy nap eltelte után, egy nappal azután, hogy a sejtenyészlet elérte a teljes konfluenciát, a tápfolyadékot kicseréltük, és a sejtek differenciálását humán rEGF (5 ng/ml), BPE ($50 \text{ } \mu\text{g/ml}$), valamint $1,7 \text{ mM Ca}^{2+}$ -nal kiegészített keratinocita-SFM médiummal indítottuk el és 3 nap elteltével állítottuk le. Az IL17A és TNF α kezelést a differenciáló médiumban alkalmaztuk.

4.5. HPV-Ker sejtek összefehérje mennyiség változásának vizsgálata

HPV-Ker keratinociták proliferációjának meghatározására szulforodamin B (SRB) festést alkalmaztunk, amely az összefehérje-tartalom változását méri a sejtekben, ami korrelál proliferációjukkal. A sejteket 96-lyukú lemezbe szélesztettük (2×10^4 sejt/lyuk), majd imikimoddal ($100 \text{ } \mu\text{M}$) és PARP-inhibitorokkal (OLA-1 μM , PJ34-3 μM vagy RUCA-1 μM) vagy az inhibitorok nélkül csak IMQ-dal kezeltük, 3 órán keresztül. A kezelés végén a sejteket 50%-os triklór-ecetsavval (TCA) fixáltuk és $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ -on 1 óráig inkubáltuk. A sejtek mosását követően SRB oldattal ($0,4\% \text{ (m/V)}$ 1% -os ecetsavban) festettük meg. A nem kötött festéket 1% -os ecetsavval történő mosással távolítottuk el. A kötött festéket 10 mM Tris bázissal oldottuk fel.

Az abszorbanciát 540 nm -en olvastuk le spektrofotométer segítségével (*Thermo Labsystems Multiskan MS, Waltham, MA, USA*).

4.6. Keratinociták sejtciklus analízise

A HPV-Ker sc és shPARP2 sejteket Petri-csészékbe (TPP, $60,1 \text{ cm}^2$, 9×10^5 sejt/petri) szélesztettük, majd 24 óra elteltével a sejteket IL17A+TNF α -val kezeltük az 1. táblázatban megjelölt koncentrációban és ideig. A kezelés végeztével a sejteket PBS-el mostuk, tripszin alkalmazásával felemésztettük a Petri-csészék aljáról, majd újabb PBS-es mosást követően a sejteket centrifugáltuk $10000 \times g$ -n 5 percig. Ezután a sejteket 5 ml jéghideg 70% -os etanollal cseppenként, lassú vortexelés mellett fixáltuk, majd egy éjszakán át $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk, és másnap lecentrifugáltuk $10000 \times g$ -n 5 percig. A sejteket $1\% \text{ BSA-PBS}$ pufferben reszuszpendáltuk, mostuk, majd $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ propidium-jodid törzsoldatot (*Invitrogen*

Corporation; VI3242B Carlsbad, CA, US) adtunk a pufferhez (1 µl/minta), és 20 percig inkubáltuk sötétben.

A sejtciklus-elemzést NovoCyte áramlási citométerrel (ACEA Biosciences, Inc, Agilent, Santa Clara, CA, US.) végeztük.

4.7. NF-κB aktivitás vizsgálata

A HPV-Ker sc és shPARP2 sejteket 6-lyukú tenyésztőedényekbe (TPP, $1,5 \times 10^5$ sejt/lyuk) szélesztettük, majd a sejteken exemesztán előkezelés elvégzése után IL17A+TNFα együttes kezelést alkalmaztunk az 1. táblázatban feltüntetett koncentrációban és ideig. A sejtekből a fehérjéket a Complete Lysis Buffer AM2 (TransAM™ NFκB p65 Chemi Kits; 40097) segítségével extraháltuk, és a felülúszó fehérjetartalmát Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific; 23225) segítségével határoztuk meg. Az NF-κB p65 alegység aktivációját minden egyes mintából származó 4 µg teljes sejtfehérje kivonatban határoztuk meg a TransAM™ NFκB p65 Chemi Kits (Active Motif; 40097, Carlsbad, CA, USA) segítségével, a gyártó utasításai szerint. A készlethez mellékelt forbol-mirisztát-acetátot (PMA), és kalcium-ionofórral kezelt Jurkat magkivonatot használtuk pozitív kontrollként az NFκB p65 aktiválására.

A lumineszcenciát Spark 10M mikrolemez olvasóval (Tecan, Männedorf, Svájc) mértük.

4.8. A sejtek citokin és ösztadiol koncentrációjának meghatározása

A különböző kezeléseknek kitett HPV-Ker sc és shPARP2 sejtek felülúszóit összegyűjtöttük, és kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitek (2. táblázat) segítségével határoztuk meg a felülúszók IL6, IL23A, IL17C és ösztadiol koncentrációját. Az ELISA-hoz használt összes anyagot a kitek biztosították és minden lépést szigorúan a gyártó utasításai szerint követtünk. A különböző gyártók által leírt protokollok különbözősége miatt egy általános összefoglalót ismertetek az ELISA mérések folyamatáról.

A készletekben található ELISA mikrolemezeket előzetesen bevonták egy specifikus antitesttel. Az előre elkészített standardokat és a mintákat a megfelelő mélyedésekbe pipettáztuk és eltérő ideig inkubáltuk. Egyes kiteknél ezt a lépést elsődleges antitesttel való inkubáció előzte meg. Ezt követően a különböző citokin vagy ösztadiol konjugátummal való inkubáció következett, majd többszöri mosásokat végeztünk. Minden egyes mélyedésbe hidrogén-peroxid és egy kromogén, a tetrametilbenzidin egyenlő arányú keverékét adtuk,

amely színreakcióval járt. A színreakciót kénsav hozzáadásával leállítottuk, és az abszorbanciát azonnal leolvastuk a megadott hullámhosszon, spektrofotométer segítségével.

A citokinek és ösztadiol mennyiségét pg/ml-ben vagy ng/L-ben határoztuk meg a standard görbe segítségével. Az IL23A és IL17C nem volt kimutatható a felülúszóban, így ez nem kerül bemutatásra.

Humán citokin és ösztadiol ELISA kit	Gyártó és cikkszám
Human IL6 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems; D6050
Estradiol Parameter Assay Kit	R&D Systems; KGE014
Human IL23 ELISA Kit	Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.; EH3270
Human IL17C ELISA Kit	Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.; EH14723

2. táblázat. Kísérleteink során alkalmazott humán citokin és ösztadiol kimutatására alkalmas ELISA kiték

4.9. Immuncitokémia

A HPV-Ker sc és shPARP2 sejteket 24-lyukú tenyésztőedénybe helyezett kör alakú üveg fedőlemezek felületére (4×10^4 sejt/fedőlemez) növesztettük és 48 órás ösztadiol előkezelés után IL17A+TNF α -t adtunk hozzájuk. A kezelés lejártaát követően a sejteket PBS-sel óvatosan mostuk, majd jéghideg metanolban 10 percig -20 °C-on fixáltuk. A fixálás után a sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd 1% Triton X-100 - PBS oldattal permeabilizáltuk 10 percig. A sejteket PBS-ben oldott 1% BSA oldattal blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd primer antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Másnap a sejteket háromszor mostuk PBS-sel, és a mintákhoz fluorofórral jelölt másodlagos ellenanyagot adtunk 1 órán át (**3. táblázat**). A sejtmagokat DAPI-val (*NucBlue Fixed Cell ReadyProbes Reagent, 1:10, R37606, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, US*) tettük láthatóvá 10 perces festést követően. A fedőlemezeket Mowiol/Dabco oldatban (49:1) ragasztottuk tárgylemezekhez.

A képek elkészítéséhez Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópot használtunk és a felvételeket a LAS AFv3.1.3 szoftverrel (*Wetzlar, Németország*) készítettük.

Antitest	Hígítás	Gyártó és cikkszám
Anti-I κ B α L35A5 (amino-terminális antigén)	1:400	Cell Signaling Technology; 4814
Anti-egér IgG Alexa Fluor 488 konjugált	1:500	Invitrogen; A-11001

3. táblázat. Immuncitokémia kísérletek során alkalmazott elsődleges és másodlagos antitest

4.10. RNS-izolálás és RT-qPCR

A sejteket 6-lyukú edénybe (TPP, $2,5 \times 10^5$ sejt/lyuk) helyeztük, majd a sejtekből totál RNS-t izoláltunk TRIzol reagenssel (*TR 118; Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA*) a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS-szekvenáláshoz használt RNS-mintákat a Qiagen (*Hilden, Németország*) RNeasy Kitjével izoláltuk a gyártó utasítása szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (*Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA*) ellenőriztük és Ambion DNase I-el (*AM2222; Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA*) kezeltük, annak érdekében, hogy a nem kívánt DNS-t eltávolítsuk mintáinkból, majd 1 μ g RNS-mintát használtunk reverz transzkripcióra a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*4368813; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) segítségével.

Az RT-qPCR-reakciókat fluoreszcens jelölésű egyszálú oligonukleotidokkal, azaz TaqMan próbákkal és a TaqMan Gene Expression Master Mix protokoll (*Thermo Fisher Scientific, 4369016*) segítségével végeztük el Light-Cycler 480 Real-Time PCR készülékkel (*Roche Applied Science, Basel, Svájc*). Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) (*assay ID: Hs02786624_g1*) használtuk. Munkánk során felhasznált további próbákat a **4. táblázat** tartalmazza.

Gén neve	Assay próba
KRT10	Hs00166289_m1
IL23	Hs00372324_m1
PARP2	Hs00193931_m1
IL6	Hs00174131_m1
IL17A	Hs00174383_m1
IL1B	Hs01555410_m1
IL8	Hs00174103_m1

4. táblázat. Kísérleteink során vizsgált gének és az alkalmazott TaqMan próbák listája

4.11. RNS-szekvenálás (RNA-Seq)

A teljes körű transzkriptom adatok kinyerése érdekében nagy áteresztőképességű mRNS-szekvenálási elemzést végeztünk Illumina szekvenáló platformon. A totál RNS minták minőségét Agilent BioAnalyzer-rel ellenőriztük az Eukaryotic Total RNA Nano Kit használatával a gyártó protokolljának megfelelően. Azokat a mintákat fogadtuk el a

könyvtárkészítési folyamathoz, amelyek >7 RNS integritási szám (RIN) értékkel rendelkeztek. Az RNA-Seq könyvtárakat totál RNS-ből Ultra II RNA Sample Prep kit (*New England, BioLabs*) segítségével készítettük el a gyártó protokolljának megfelelően. Röviden, a poly-A RNS-eket oligo-dT konjugált mágneses gyöngyökkel rögzítettük, majd az mRNS-eket mostuk és 94 Celsius fokon fragmentáltuk. Az első szálú cDNS-t véletlenszerű priming reverz transzkripcióval hoztuk létre, majd a második szál szintézisét követően kettős szálú cDNS-t állítottunk elő. A végek javítását követően, a poly-A RNS-ek és az adapter-ligációs lépéseket követően az adapterrel ligált fragmentumokat dúsító PCR-ben amplifikáltuk, és végül szekvenáló könyvtárakat hoztunk létre. A szekvenálást Illumina NextSeq 500 műszeren végeztük, 75 ciklusos egyvégű szekvenálással. Az adatelemzéshez a nyers szekvenálási adatokat (fastq) a GRCh38 humán referencia genom verziójához igazítottuk a HISAT2 algoritmus segítségével, és BAM fájlokat hoztunk létre. A downstream elemzést a StrandNGS szoftverrel végeztük (www.strand-ngs.com). A BAM fájlokat a DESeq szoftverbe importáltuk, a normalizáláshoz a DESeq algoritmust használtuk. Moderált t-próbát használtunk Benjamini-Hochberg FDR-rel a különböző körülmények között expresszáldó gének meghatározására. A CytoScape v3.4 szoftvert a ClueGo v2.3.5. alkalmazással, a túlreprezentált génontológiai (GO) kifejezések azonosítására használtuk. A különbözően expresszáldó gének listáját és a GO biológiai folyamatok adatbázisát felhasználva kétoldalas hipergeometriai tesztet végeztünk Bonferroni korrekcióval. Az RNS szekvenálás adatai elérhetők a BioProject adatbázisban: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA889321>.

4.12. Fehérje extrakció

A HPV-Ker sejteket Petri-csészékbe (TPP, 22,1 cm², 2×10⁶ sejt/csésze) szélesztettük. A kezelések lejártaát követően a sejteket PBS-el mostuk, majd lízis pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% nátrium dezoxikolat, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM PMSF, proteáz inhibitor koktél) jégen tartva összegyűjtöttük. A sejt-lizátumokban lévő DNS-fehérje komplexeket szonifikáció (*Branson Sonifier*) segítségével bontottuk fel 15 sec. időközönként 3×20 impulzust adva. A fehérje izolátumokat 10 perces, 10000 x g-n, 4 °C-on végzett centrifugálással választottuk el a törmelékektől. A fehérjekoncentrációt a Pierce BCA protein assay kit (*Thermo Fisher Scientific; 23225*) segítségével határoztuk meg.

4.13. Sejtfractionálás

A citoszolikus és nukleáris fehérjefrakciók elválasztásához a sejteket jéghideg PBS-sel mostuk, összegyűjtöttük és 4 °C-on $3000 \times g$ -n 10 percig centrifugáltuk. A pelleteket 600 μ l A pufferben (10 mM HEPES - pH 7,9; 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, proteáz inhibitorok és 0,5 % Nonidet-P) homogenizáltuk, és 1 ml-es fecskendővel 26-G tűt használva lizáltuk. A lizátumokat vortexeltük, és tripánkék festéssel vizsgáltuk az ép sejtmagokat. Ezt követően a lizátumokat 4 °C-on $15\,000 \times g$ -n 1 percig centrifugáltuk, és ezt a felülúszót, mint citoszolikus frakciót használtuk. A pelletet 400 μ l A pufferrel mostuk, majd ismét tű segítségével tovább lizáltuk. Ezután 4 °C-on $15\,000 \times g$ -n 1 percig centrifugáltuk a pelletet 400 μ l B pufferben (20 mM HEPES - pH 7. 9; 420 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT és proteáz inhibitorok), majd jégen tartva szonifikáltuk (3X20 impulzus, 15 s időközönként), ezt követően 4 °C-on $12\,000 \times g$ -n 10 percig centrifugáltuk, így kaptuk meg a nukleáris frakciót. A fehérjekoncentrációt a Pierce BCA protein assay kit (*Thermo Fisher Scientific; 23225*) segítségével határoztuk meg.

4.14. Western blot

A fehérje lizátumokat 5x SDS mintapufferben (310 mM Tris-HCl, pH 6,8, 50% glicerin, 10% SDS, 100 mM DTT, 0,01% brómfenol-kék), 2-merkaptotetanollal kiegészítve 10 percig 100 °C-on forraltuk. A fehérje extraktumokat (25-35 μ g) 8-10%-os poliakrilamid gélen méret szerint elválasztottuk és nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 5% BSA-TBS_{Tween} vagy 5% zsírmentes tejpor-TBS_{Tween} oldattal 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk, majd 4 °C-on egy éjszakán át primer antitestekkel inkubáltuk. Másnap a membránokat az elsődleges antitestre specifikus peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten (**5. táblázat**).

A jeleket fokozott kemilumineszcens reakcióval vizualizáltuk és ChemiDocTM Touch (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) gép segítségével rögzítettük. A sávokat denzitometriával számszerűsítettük az Image lab 5.2.1 szoftver (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) segítségével.

Antitest	Hígítás	Gyártó és cikkszám
Anti-poli(ADP)ribóz	1:1000	Enzo Life Sciences; BML-SA216-0100
Anti-PARP2	1:1000	Enzo Life Sciences; ALX-210-899-R100
Anti-RelA/NFkB p65	1:1000	Novus Biologicals; NB100-82086
Anti-CYP19A1	1:1000	Novus Biologicals; NBP2-80415
Anti-rekombináns citokeratin 10	1:1000	Abcam; ab76318
Anti-IL23	1:1000	Abcam; ab45420
Anti- β -aktin-peroxidáz	1:20000	Merck; A3854
Anti-Hisztón H1	1:1000	Merck; 05-457
Anti-egér IgG HRP-konjugált	1:2000	Merck; A9044
Anti-nyúl IgG HRP-konjugált	1:2000	Cell Signaling Technology; 7074S

5.táblázat. Western blot során használt elsődleges és másodlagos antitestek és az alkalmazott hígításuk

4.15. Állatkísérletek

4.15.1. Kísérleti egerek

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) által regisztrált engedély alapján (nyilvántartási szám: 15/2016/DEMÁB), a vonatkozó törvény, kormányrendelet és Európai Unió előírásokat betartva végeztük.

Kísérleteinkhez heterozigóta keresztezésekből származó, C57BL/6J genetikai háttérű PARP2^{+/+} és PARP2^{-/-} egereket [217] alkalmaztunk. Az egerek tenyésztése és tartása a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Élettudományi Épület Kísérleti Állatházában (nyilvántartási száma: III/4-KÁT/2015) történt. Minden ketrecben legfeljebb hat egeret helyeztek el, amelyek standard blokk méretűek (365 × 207 × 140 mm, 530 cm² felület; 1284 L Eurostandard II. típus. L, Techniplastól beszerezve) voltak, valamint Lignocel Select Fine (*J. Rettenmaier und Söhne*) alommal bélelték ki. Az egerek papírhengereket kaptak a környezetük gazdagítására. A sötét-világos napszakok kontrollált, 12-12 órás ciklusban követték egymást, valamint a hőmérséklet egyenletesen 22 ± 1 °C volt. Az állatok szabadon hozzáférhettek a táplálékhoz és sterilizált csapvízhez. A ketrecek hetente egyszer, ugyanazon a napon cserélték és az állattartó létesítményt állatorvos felügyelte. Az állatok tenyésztése SPF (specifikus kórokozómentes) minősítésű részlegen történt. A kísérleteinkhez csak hím egereket

választottunk ki 8-16 hetes korukban, majd a kísérletek során az egereket elkülönítve helyeztük el.

4.15.2. A psoriasis egér modellje - az IMQ által kiváltott dermatitisz

Az IMQ modell létrehozásához az egereket először kezelési csoportokra osztottuk, ennek felosztását a **6. táblázat** tartalmazza.

Genotípus	Kezelési csoportok darabszáma		
	CTL	IMQ	EXE+IMQ
PARP2 ^{+/+}	6	8	8
PARP2 ^{-/-}	5	7	7

6. táblázat. Az eltérő genotípusú egerek száma különböző kezelési csoportokban

A hím egerek hátáról 2 × 2 cm-es területen szőrtelenítő krém segítségével eltávolítottuk a szőrt, a bőrfelület óvatos kezelése mellett, hogy sérülést ne okozzunk. Ezt követően az egereket naponta 62,5 mg 5%-os imikimod-tartalmú Aldara krémmel (*Meda AB*) vagy vehikulum krémmel kezeltük 4 napon át, hogy előidézzük a pikkelysömör-szerű elváltozásokat. Az aromataz gátlásához 500 µM dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldott exemesztán oldatot alkalmaztuk az egerek szőrtelen bőrén 30 perccel az Aldara kezelés előtt, naponta egyszer. Az elváltozások súlyosságát, beleértve a bőr megvastagodását, az erythema és a hámlás mértékét, két tapasztalt, független bőrgyógyász naponta pontozta egy 0-tól 4-ig terjedő skálán, ahol a 0 a tünetmentességet, a 4 pedig a legsúlyosabb tüneteket jelölte. Az 5. napon, feláldozás előtt 2 órával az egerek BrdU oldatot (100 mg/ttkg) kaptak intraperitoneálisan, majd a feláldozás után az érintett bőrterületeket kimetszettük további szövettani vizsgálatokhoz.

4.15.3. Citokin profil meghatározása az egerek bőrén

Az egér bőrmintákat a kimetszés után azonnal folyékony nitrogénbe tettük és vizsgálataink megkezdéséig -80 °C-on tároltuk. A fehérje extrakció előtt a szöveteket PBS-sel leöblítettük és tömegüket megmértük. A szöveteket 10X-es mennyiségű proteáz inhibitor koktélt (*S8830, Merck KGaA, Darmstadt, Németország*) tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk, 5 mm-es rozsdamentes acélgyöngyök felhasználásával, 30 hertz frekvencián 8 percig TissueLyser II készülék (*Qiagen, Hilden, Németország*) segítségével. Ezt követően Triton X-100-at adtunk a mintákhoz, hogy elérjük az 1%-os végső koncentrációt. Ezután a mintákat

10000 × g-n 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk a megmaradt bőrszövetek eltávolítása érdekében. A felülúszót eltettük és a fehérjetartalmat Pierce BCA protein assay kit segítségével mértük meg. A kezelési csoporton belüli egyes mintákat összevontuk, hogy összesen 300 µg fehérjét kapjunk csoportonként. Az egér citokin profil meghatározásához használt kit, az ún. citokin array (*Proteome Profiler Array, No. ARY006, R&D Systems/Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA*) gyártója által megadott protokoll szerint jártunk el. Az előre gyártott nitrocellulóz membránok pöttyökben felvitt ellenanyagokat tartalmaztak, így egyszerre többféle citokin, kemokin meghatározását tették lehetővé.

Az immunoblot képeket a ChemiDoc Touch Imaging System (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) segítségével rögzítettük és vizualizáltuk. A képek elemzését a CellProfiler 3.1.5 programmal végeztük [218]. Az előhívott membránok képein lévő pöttyöket a kitben biztosított sablonnal fedtük le, amely a pöttyök meghatározott elrendezését tartalmazta. A rögzített antitestek helyét jelképező köröket manuálisan korrigáltuk, hogy maximalizáljuk a pontokkal való átfedést. A membrán szabad, fehér területeit szegmentáltuk és a rögzített antitestek helyét szimbolizáló körök méretének megfelelő mérethattárral választottuk ki. A nyers foltok átfedéseit 3 pixellel kibővítettük, hogy eltávolítsuk a szélek szabálytalanságát, majd a központi pixelükre zsugorítottunk. Az így pontosított foltokat a központi pixel kibővítésével hoztuk létre, amíg azok az eredeti citokin membránon lévő foltokat lefedték. Az eredeti képeken lévő citokin jeleket a finomított pontok kör alakú területein belül mértük.

4.15.4. További citokin meghatározás ELISA módszerrel az egerek bőrén

Az egerek szöveti homogenizátumaiból nyert fehérje mintákból TNFα, IL17A és IL17C citokineket detektáltunk kereskedelmi forgalomban lévő ELISA kitek segítségével (**7. táblázat**). Az előre csomagolt ELISA mikrolemezek egér TNFα, IL17A vagy IL17C specifikus antitesttel voltak bevonva. A standard és minta hígításokat mintahígítási pufferben készítettük. Az egér IL17A és egér TNFα esetében a mintákat ½-szeresére hígítottuk, míg az egér IL17C esetében a mintákat háromszorosára hígítottuk, annak érdekében, hogy a mátrix komponensek ne befolyásolják az eredményt. A standardot és a mintákat a megfelelő mélyedésekbe adagoltuk, és 90 percig 37 °C-on inkubáltuk. A 90 perc elteltével a lemezeket 2X mostuk mosópufferrel, majd minden egyes mélyedésbe biotinnal jelölt antitestet tartalmazó oldatot adtunk, majd 1 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően a lemezeket 3 alkalommal mostuk. A mosás után minden egyes mélyedésbe peroxidázzal konjugált streptavidint pipettáztunk és 30 percig inkubáltuk 37 °C-on. A mélyedésekbe H₂O₂ és tetrametilbenzidin egyenlő arányú

keverékét adtuk, amely színreakcióval járt. A színreakciót kénsav hozzáadásával leállítottuk, és az abszorbanciát azonnal, 450 nm-en, spektrofotométer segítségével mértük le. A citokinek mennyiségét pg/ml-ben határoztuk meg a standard görbe alapján.

Egér citokin ELISA kit	Gyártó és cikkszám
Egér IL17C	ELK Biotechnology Co.; ELK6078
Egér TNF- α	Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.; EM0183
Egér IL-17A	Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.; EM1624

7. táblázat. Meghatározott egér citokinek kimutatásához használt ELISA kitek

4.16. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai elemzéseket formalinban fixált, paraffinba ágyazott egér vagy humán bőrmintákból vágott 4 μ m vastagságú metszeteken hajtottuk végre. A formalinban fixált mintákon hőindukált antigén-visszanyerést végeztünk. EDTA puffert (*Reanal, Magyarország*, 1 mM, pH 8,0) alkalmaztunk mikrohullámú sütőben 15 percig, hogy a célfehérjék epitópjait feltárjuk. Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os H₂O₂-dal (*Merck KGaA*) 10 percig blokkoltuk. A blokkolás után a szöveti metszeteket specifikus primer antitestekkel inkubáltuk. A felhasznált antitestek listáját a **8. táblázat** tartalmazza. A fehérjeexpressziót egér és nyúl specifikus HRP/DAB (ABC) detektáló IHC kit (*Abcam; ab64264*) segítségével mutattuk ki a gyártó protokollja szerint. A negatív kontroll minták esetében az elsődleges antitesteket kihagytuk a protokollból. A bróm-deoxiuridin kimutatására BrdU immunhisztokémiai kitet használtunk (*ab125306, Abcam*).

Antitest	Gyártó és cikkszám
RelA/NFkB p65 (p Ser276)	Novus Biologicals; NB100-82086
CYP19A1	Novus Biologicals; NBP2-80415
Citokeratin 10	Abcam; ab76318
Involucrin	Covance; PRB140C
IL6	Abcam; ab6672
PARP1	Abcam; ab227244

8. táblázat. Immunhisztokémiai vizsgálataink során alkalmazott specifikus antitestek

4.17. Humán mintákon végzett kísérlet

4.17.1. Kromogén in situ hibridizáció (CISH)

A bőrbioptziákat pikkelysömörös betegektől és egészséges, plasztikai műtéten átesett személyektől vették a Debreceni Egyetem Bőrgyógyászati Klinika orvosai a Helsinki Nyilatkozat elveinek megfelelően. A vizsgálatot a Debreceni Egyetem etikai bizottsága hagyta jóvá (regisztrációs szám: 50935/2012/EKU (776/PI/2012, módosítva a V/2072-2 /2020/EKU szám alatt). A mintát adó személyeket előzetesen megfelelő módon tájékoztatták, és ők beleegyezésüket adták a bőrmintáikról készült képek közzétételéhez.

A klinikai bőrmintákban a PARP2 mRNS-ének expresszióját vizsgáltuk. A minták 5 pikkelysömörös beteg tünetes fejbőréből és 4 egészséges egyén normál fejbőréből származtak. Annak érdekében, hogy a PARP2 mRNS-t kimutassuk a metszetekben *in situ* hibridizációt alkalmaztunk. A CISH-t formalin-fixált paraffinba-ágyazott (FFPE) minták 5 µm vastagságú metszetein végeztük. 100 nM dupla digoxigeninnel jelölt PARP2 specifikus (*Custom LNA Detection Probe, Cat. No: 3395005-3DIG, LCD0165598-BKG, Qiagen, Hilden, Németország*) vagy egy nem specifikus mRNS negatív kontroll (*Scramble-ISH Custom LNA Detection Probe lncRNS és mRNS, Cat. No: 3395085-3DIG LCD0000002-BDG, Qiagen*) ún. lezárt/kötött nukleinsavat (LNA) tartalmazó próbát használtunk a gyártó utasításai szerint. A metszeteket 2x proteináz K oldattal (*FFPE ISH Buffer Set, Kat. sz.:339450, Qiagen*) kezeltük 15 percig, majd 100 nM előzetesen linearizált (90° C-on 4 percig) próba keveréket 1xISH pufferben (*miRNA ISH Buffer Set, Qiagen*) hígítva alkalmaztuk. A hibridizációt 53°C-on végeztük a PARP2 specifikus és 57°C-on a negatív kontroll LNA próbával 60 percig, hibridizációs kamrában (*StatSpin ThermoBrite, Abbott Molecular, Chicago, IL, USA*). A vizualizációhoz alkalikus

foszfátazzal konjugált digoxigenin antitestet (*Roche, Basel, Svájc*) és nitroblue tetrazolium /5-bromo-4-klór-indolil-foszfát (NBT/BCIP, *Roche*) kromogén szubsztrátot alkalmaztunk 2 órán keresztül 30°C-on. A tárgylemezeket stabil folyékony nukleáris vörössel (*VWR, Radnor, PA, USA*) festettük és a ragasztó egyben konzerváló anyaggal, az Eukitt oldattal (*Sigma-Aldrich*) fedtük be, majd fedőlemezt raktunk rá.

A képeket Leica DM200LED (*Leica, Wetzlar, Németország*) mikroszkóppal készítettük.

4.18. *In silico* analízis

A PARP1 vizsgálata során a humán pikkelysömörös léziós bőrből végzett RNS-szekvenálási adatokat a National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (NCBI GEO) nyilvános adatbázisából nyertük ([GDS5260 / ILMN 1686871 \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS5260); [GDS4602 / 208644_at \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS4602)). A pikkelysömör egér modelljeinek összehasonlításához szintén az NCBI GEO publikus adatbázisát alkalmaztuk ([GDS3907 / 1435368_a_at \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3907)). A PARP2 vizsgálata során az egészséges bőrből és pikkelysömörös betegek léziós bőrből származó, más csoportok által már közzétett transzkriptomikai adatokat használtuk, szintén az NCBO GEO adatbázisából (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE63980>) [219], valamint az általunk elvégzett IL17A+TNF α -val kezelt sc és shPARP2 HPV-Ker sejtekből RNS-szekvenálással nyert adatokat használtuk a hőtérképek létrehozásához. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA889321>)

4.19. Statisztikai analízis

A statisztikai értékeléshez GraphPad Prism (*GraphPad software, San Diego, USA*) programot használtunk. Először az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszt segítségével elemeztük. Két csoport összehasonlítása esetében független mintás t-próbát alkalmaztunk, akkor, ha a Shapiro-Wilk-teszt normál eloszlást mutatott. Nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk. Ha kettőnél több csoportot hasonlítottunk össze, és normál volt az eloszlás, egyutas ANOVA tesztet alkalmaztunk, amelyet Tukey-féle post-hoc teszt követett. Amennyiben az adatok nem mutattak normál eloszlást, Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk, amelyet Dunn post-hoc teszt vagy Dunnett post-hoc teszt egészített ki. Az immunhisztokémiai reakciók intenzitását 0-3 skálán pontoztuk, majd a csoportok közötti statisztikai elemzéshez Khi-négyzet próbát (χ^2) alkalmaztunk. A szignifikancia értékeket (p érték) és a replikációk számát (n) az ábrafeliratokban tüntettem fel.

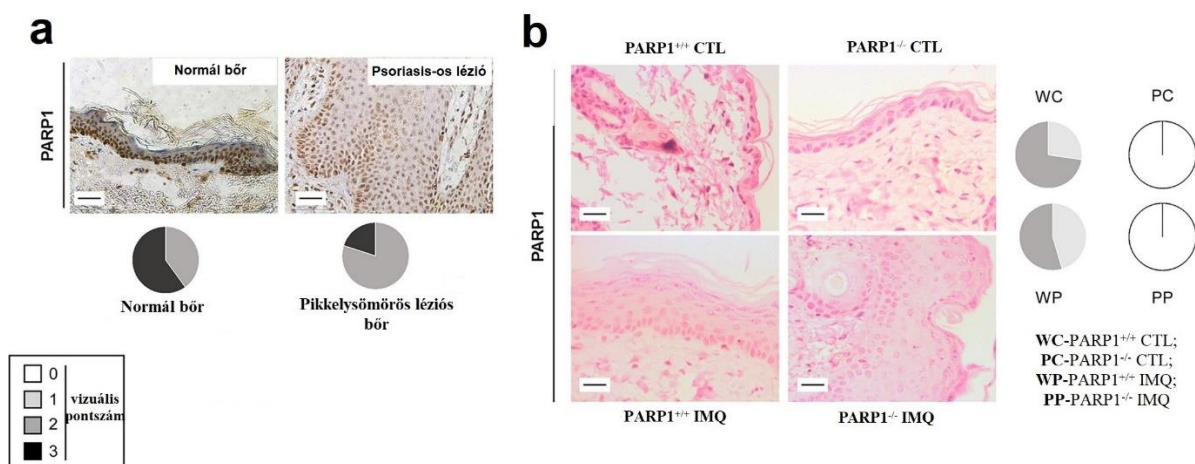
V. Eredmények

5.1. A PARP1 expressziója csökken psoriasis-ban

Munkánk első felében a PARP1 lehetséges szerepét szeretnénk volna felderíteni psoriasis-ban. Ennek első lépéseként, társszerzőink PARP1^{+/+} és PARP1^{-/-} hím egerek bőrén tanulmányozták az IMQ által indukált bőrgyulladást. Az eddigi irodalmi adatok a PARP1 delécióját vagy farmakológiai gátlását egyértelműen gyulladásgátló hatásúnak írták le számos modellben, így meglepő volt, hogy a kialakult dermatitisz súlyosabb volt a PARP1^{-/-}, mint a PARP1^{+/+} egerekben (**Kiss és mtsai, 2019: 1; 2A és 2B ábra**).

Ezután kíváncsiak voltunk, hogyan változik a PARP1 expressziója psoriasis-ban. Azt találtuk, hogy pikkelysömörös betegek léziós bőrében csökkent a PARP1 expressziója az egészséges egyének hasonló anatómiai régióiból származó normál bőrmintáiban detektált expresszióhoz képest. (**11a ábra**). Hasonló csökkenést találtunk a PARP1 expressziójában, amikor az NCBI GEO adatbázisban publikusan hozzáférhető, humán pikkelysömörös léziós bőrből végzett RNS-szekvenálási adatokat *in silico* analizáltunk. Immunhisztokémiai vizsgálatok az IMQ-dal kezelt PARP1^{+/+} egerek bőrén ugyancsak a PARP1 expresszió csökkenését mutatták, bár nem szignifikáns mértékben (**11b ábra**). Ugyanakkor, egy másik publikus adathalmazban, amely a pikkelysömör egér modelljeit hasonlította össze, azt találtuk, hogy a PARP1 expressziójának csökkenése általánosan megfigyelhető ezekben a modellekben.

Mindezek az adatok arra utalnak, hogy psoriasis-ban a PARP1 expresszió csökkenésének talán patomechanikai szerepe lehet, amely támogatja a psoriasis-ra jellemző gyulladásos folyamatokat, és ez ellentmond az egyéb gyulladásos folyamatokban tapasztaltaknak.

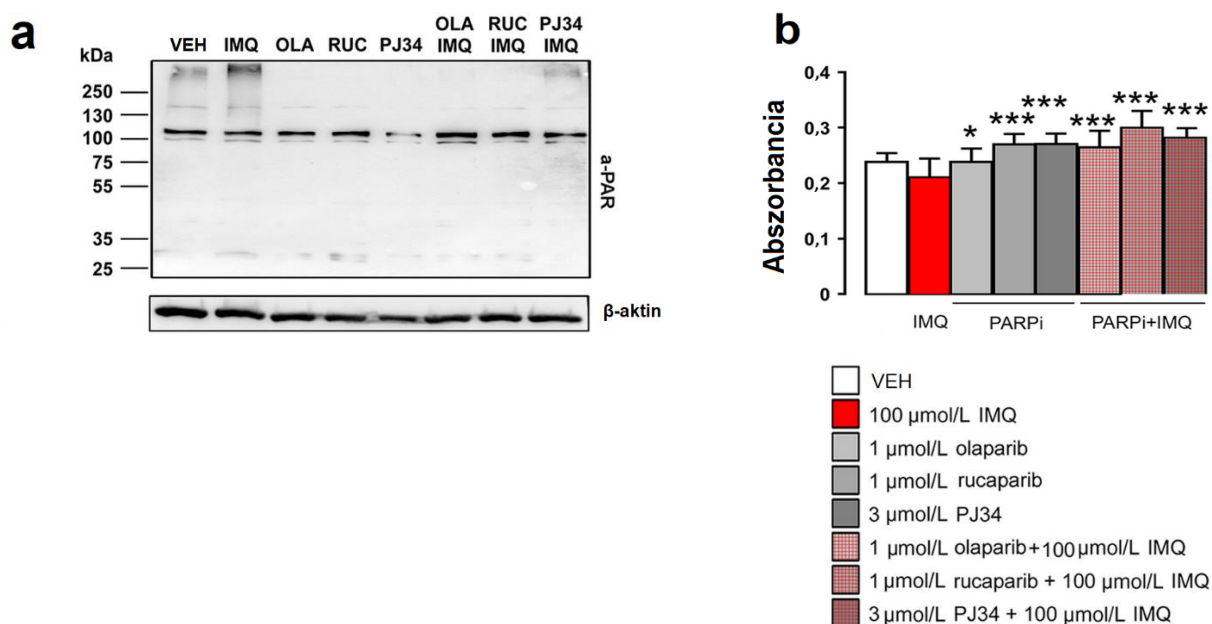


11. ábra. Csökkent PARP1 expresszió pikkelysömörös és IMQ-indukált lézióban

a PARP1 immunhisztokémia egészséges egyénektől származó normál bőrmintákon ($n=5$), valamint pikkelysömörös betegek léziós bőrmintáin ($n=5$), **b** illetve $PARP1^{+/+}$ és $PARP1^{-/-}$ ($PARP1^{+/+}$ CTL $n=10$, $PARP1^{-/-}$ CTL $n=10$, $PARP1^{+/+}$ IMQ $n=11$, $PARP1^{-/-}$ IMQ $n=9$) egerek bőrből készült metszeteken. Jelölések: WC- $PARP1^{+/+}$ CTL, PC- $PARP1^{-/-}$ CTL, WP- $PARP1^{+/+}$ IMQ, PP- $PARP1^{-/-}$ IMQ. Méretarány: 100 μ m. Minden panelben khi-négyzet tesztet használtunk a szignifikancia érték kiszámításához, amelyet Fisher-féle egzakt teszttel újra vizsgáltunk.

5.2. PARP inhibitorok alkalmazása imikimoddal kombinációban fokozza a keratinocita proliferációt és citokin termelést

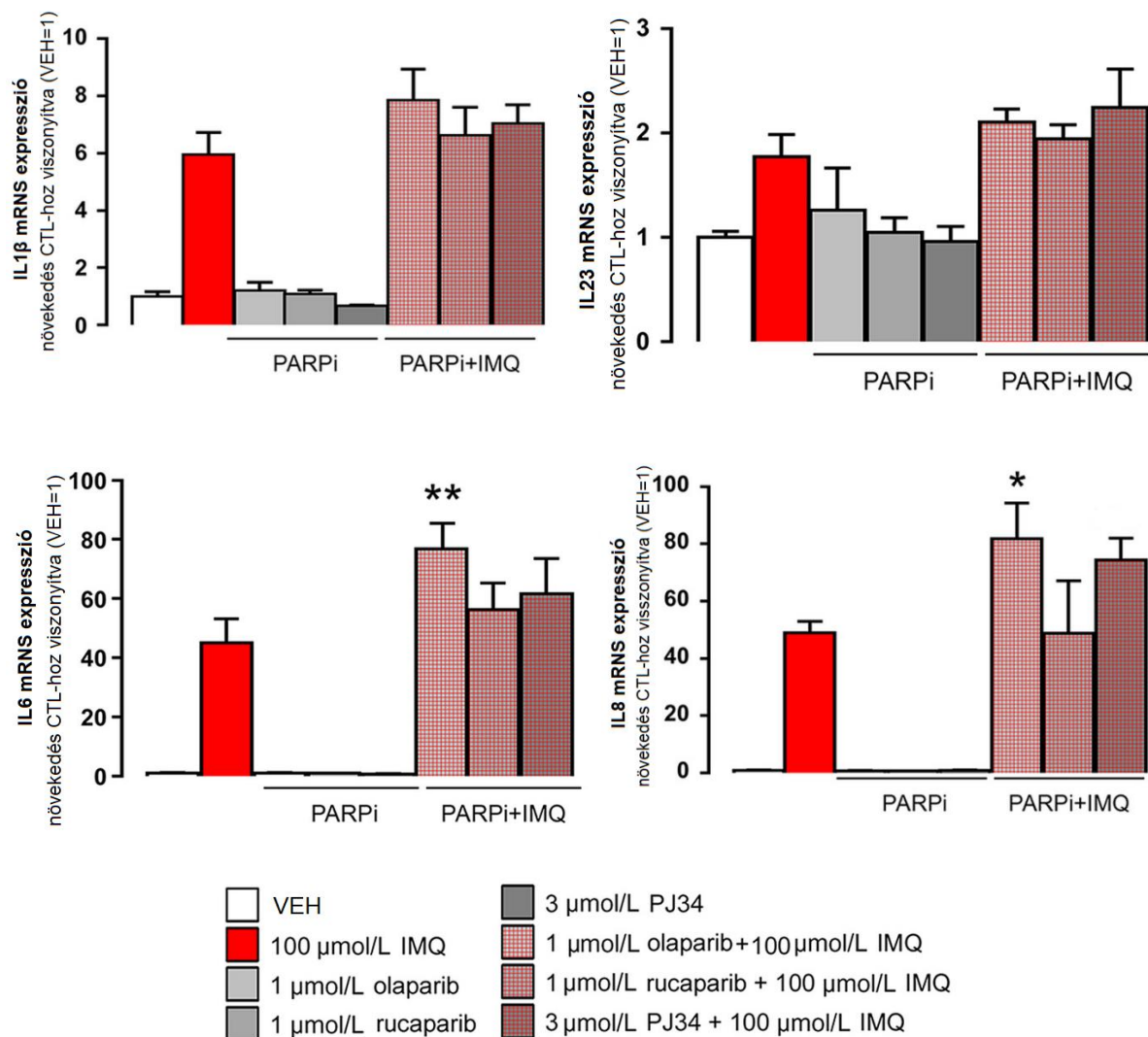
A psoriasis patogenezisében a keratinocitákban zajló kóros folyamatok központi szerepet játszanak. Mivel szövettani vizsgálataink az epidermális keratinocitákban magas PARP1 expressziót mutattak, humán keratinocita sejt kultúrákat, a HPV-Ker sejteket alkalmazva szerettük volna kideríteni a PARP1 expresszió jelentőségét pikkelysömör-szerű gyulladásos válaszban. Sejtípustól függően a PARP1 a sejtekben mérhető PARP-aktivitás akár 85-90%-át is lefedi [2, 3]; ezért sejt kultúrás kísérleteinkben PARP inhibitorokat (olaparib, rucaparib és PJ34) alkalmaztunk a PARP1 blokkolására. A sejtekben a PARP aktivitás ellenőrzésére az egyik legbiztosabb módszer az ADP-ribóz polimerek detektálása PAR elleni antitesttel. A reprezentatív Western blot képen látható egyrészt, hogy a HPV-Ker keratinocitákat IMQ-dal kezelve megnő a PARiláció mértéke a vehikulummal kezelt kontrol sejtekhez viszonyítva. Másrészt látható, mindhárom, általunk használt PARP inhibitor hatékonyan tudja csökkenteni a PARilációt a sejtekben (**12a ábra**). SRB festést alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy az általunk használt koncentrációban és időtartam alatt az IMQ önmagában nem befolyásolta a sejtek proliferációját. Viszont a PARP inhibitorok az IMQ-hoz képest szignifikánsan fokozták a keratinociták proliferációját, ami még kifejezettebb volt, amikor a PARP inhibitorokat az IMQ-dal kombinációban alkalmaztuk (**12b ábra**).



12. ábra. A PARP inhibitorok és az imikimod kombinációja indukálja a keratinociták proliferációját

HPV-Ker sejteket vehikulummal (VEH), vagy imikimoddal (IMQ, 100 μ M) és/vagy PARP inhibitorokkal (olaparib-OLA, PJ34 vagy rucaparib-RUCA) kezeltük az ábrán jelölt koncentrációkban, 3 órán keresztül. **a** A sejtekből totál fehérjét izoláltunk, és a PAR polimereket Western blot technika segítségével detektáltuk ($n=2$). **b** A sejtek proliferációjának mértékét SRB próbák segítségével határoztuk meg ($n=8$). *, ** és *** szignifikáns különbséget jelöl az IMQ-dal kezelt és a többi csoport között, $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$ értéken. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel, majd Dunnet post-hoc teszttel értékeltük, ahol az IMQ-dal kezelt csoportot használtuk referenciaként.

Ezen felül, megvizsgáltuk néhány, a pikkelysömör szempontjából releváns citokin expressziójának változását is a HPV-Ker sejtekben IMQ kezelés és PARP gátlás hatására. Az IMQ kezelés hatására jelentősen megnőtt a keratinocitákban az IL1 β , IL6, IL8 és az IL23A mRNS expressziója. Ráadásul, amikor az IMQ-dot a PARP inhibitorokkal kombinálva alkalmaztuk, a citokinek expressziója tovább fokozódott sejtekben, ami az IL6 és IL8 esetében szignifikáns különbséget jelentett (13. ábra). Ezek az adatok összhangban álltak *in vivo* megfigyeléseinkkel.



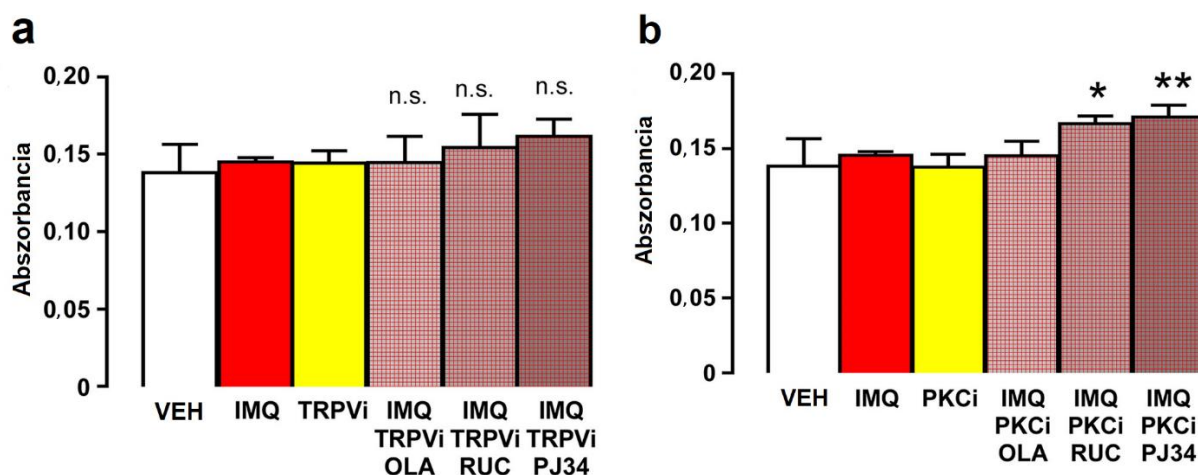
13. ábra. A farmakológiai PARP-gátlás az imikimoddal együtt indukálja a HPV-Ker keratinociták citokin termelését

HPV-Ker sejteket vehikulummal (VEH) vagy imikimoddal (IMQ, 100 μM) és/vagy PARP inhibitorokkal (olaparib-OLA, PJ34 vagy rucaparib-RUCA) kezeltük az ábrán megjelölt koncentrációkban, 3 órán keresztül, majd az ábrán jelzett citokinek expresszióját RT-qPCR reakció segítségével határoztuk meg (n=2). *, ** és *** szignifikáns különbséget jelöl az IMQ-dal kezelt és a többi csoport között $p < 0,05$, $p < 0,01$, illetve $p < 0,001$ értéken. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel, majd Dunnet post-hoc teszttel értékeltük, ahol az IMQ-dal kezelt csoportot használtuk referenciaként.

5.3. A PARP1 hatása a keratinocita proliferációra függ a TRPV1 aktivitástól

A tranziens receptor potenciál vanilloid (TRPV)1, egy nem-szelektív kation csatorna, több, a psoriasis patomechanizmusában érintett faktor pozitív mediátorának bizonyult [220-222], ezért megvizsgáltuk, hogy vajon a TRPV1 gátlásával felfüggeszthető-e a PARP gátlás káros hatásai IMQ kezelés mellett.

SRB tesztekben azt találtuk, hogy a HPV-Ker sejtek előkezelése a TRPV1 specifikus inhibitor AMG9810-zel megakadályozta azt a növekedést a sejtek összfehérje mennyiségében, illetve proliferációjában, amit az IMQ és PARP inhibitorok együttes alkalmazása során előzetesen tapasztaltunk (**14a ábra**). A TRPV1-et cAMP-függő protein kinázok, köztük a protein kináz C (PKC) foszforilálja és ezáltal szenzitizálja [223, 224]. A PKC a PARP1 aktivitását is szabályozza [225], ezért megvizsgáltuk, hogy a PKC inhibitor Gö6976 befolyásolja-e az IMQ és PARP gátlás hatását a keratinocita proliferációra, de ebben az esetben nem tapasztaltunk változást (**14b ábra**).



14. ábra. A TRPV1, de nem a PKC gátlása blokkolja a PARP-gátlás által indukált keratinocita proliferációt

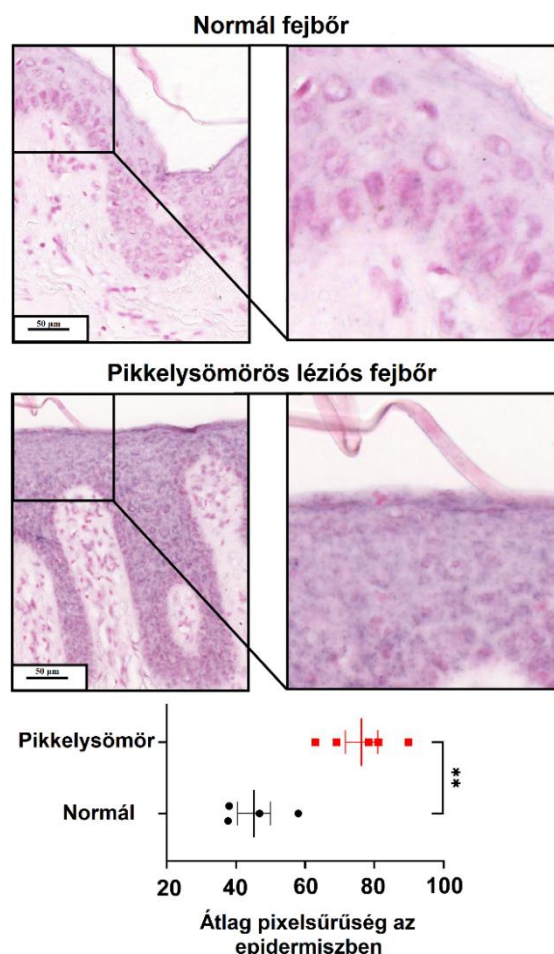
a HPV-Ker sejteket vehikulummal (VEH) vagy imikimoddal (IMQ, 100 μ M) vagy a TRPV1 inhibitor AMG9810-el, vagy az AMG9810-et IMQ-dal és PARP inhibitorokkal (olaparib-OLA, PJ34 vagy rucaparib-RUCA), együtt alkalmazva kezeltük 3 órán keresztül, majd a teljes fehérjetartalmat SRB próbákban mértük meg ($n=6-8$). **b** HPV-Ker sejteket vehikulummal (VEH) vagy imikimoddal (IMQ, 100 μ M) vagy a PKC inhibitor Gö6976-tal, vagy a Gö6976-et IMQ-dal és PARP inhibitorokkal (olaparib-OLA, PJ34 vagy rucaparib-RUCA), együtt alkalmazva kezeltük 3 órán keresztül, majd a teljes fehérjetartalmat SRB próbákban mértük meg ($n=6-8$). *, ** és *** szignifikáns különbséget jelöl az IMQ-dal kezelt és a többi csoport között $p<0,05$, $p<0,01$, illetve $p<0,001$ értéken. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel, majd Dunnett post-hoc teszttel értékeltük, ahol az IMQ-dal kezelt csoportot használtuk referenciaként. Az n.s.-nem szignifikáns értéket jelöl.

5.4. A PARP2 expressziója megnövekszik pikkelysömörös betegek bőrében

Az előzőekben bemutatott eredmények fényében kíváncsiak voltunk, hogy vajon a PARP1 „kistestvérének”, a PARP2-nek lehet-e szerepe psoriasis-ban.

Ennek első lépéseként megvizsgáltuk a PARP2 expresszióját pikkelysömörös betegek léziós bőrében és egészséges személyek hasonló régióiból származó normál bőrmintáiban kromogén *in situ* hibridizációs (CISH) módszert alkalmazva. Normál bőrben a PARP2 mRNS

alacsony mértékű expresszióját figyeltük meg, viszont a pikkelysömörös epidermiszben szignifikánsan megnövekedett a PARP2 mRNA expresszió (**15. ábra**)



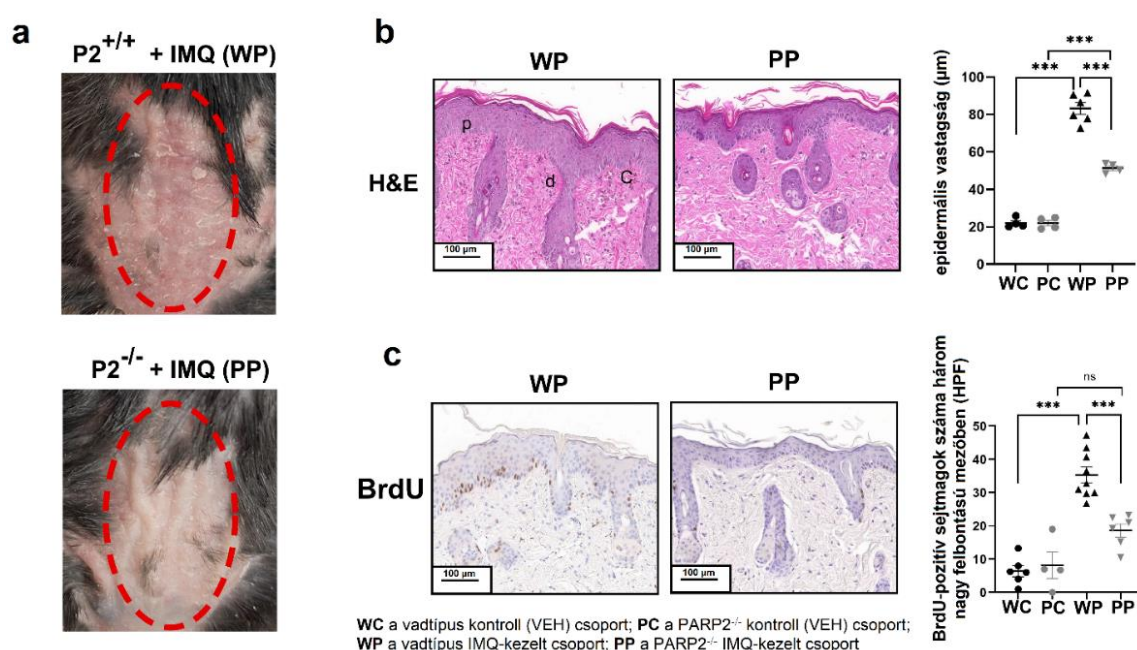
15. ábra. Pikkelysömörös betegek bőrében a PARP2 expressziója fokozódik

Pikkelysömörös léziós bőrben és egészséges kontroll egyének normál bőrén *in situ* hibridizációt végeztünk ($n=5/5$). Mind a léziós, mind az egészséges minták fejbőrből származtak. A jobb oldali képek a bal oldali képek egy-egy részleteinek nagyított metszetei, ahol a méretsáv 50 μm -nek felel meg. A lila pöttyök a PARP2 mRNA-t jelzik. A pixel sűrűségét kék színscatornában a Fiji ImageJ szoftverrel mértük. Mivel a Shapiro-Wilk teszt normál eloszlást mutatott az egyes értékekben, párosítatlan, kétmintás *t*-próbát használtunk a statisztikai szignifikancia meghatározására. $**p < 0,01$.

5.5. A PARP2 deléciója csökkenti az IMQ által kiváltott pikkelysömör-szerű bőrgyulladás súlyosságát egerekben

Annak érdekében, hogy karakterizáljuk a PARP2 expresszió jelentőségét pikkelysömörben, újra a pikkelysömör legismertebb egérmódeljét alkalmaztuk, az IMQ által kiváltott bőrgyulladást PARP2^{-/-} és PARP2^{+/+} hím egereken. A kísérlet ötödik napján jól látható volt, hogy a kialakult elváltozások kevésbé voltak súlyosak az IMQ-dal kezelt PARP2^{-/-} (PP) egerekben, mint az IMQ-dal kezelt vad típusú (WP) egerekben (**16a ábra**). A léziók szövettani

metszeteiben a hematoxin-eozin (H&E) festés az IMQ által kiváltott dermatitisz jellegzetességeit mutatta a WP egerek léziós bőrében, mint például fokozott keratinocita proliferációt a bazális rétegben, tágult kapillárisokat és dermális sejtes infiltrációt, viszont a PP egerek metszeteiben ezek az elváltozások jóval kisebb mértékben voltak megfigyelhetők (**16b ábra**). Az epidermisz megvastagodása kifejezettebb volt a WP egerek bőrében, mint a PP egerekéiben, a vehikulummal kezelt vad típusú (WC) és PARP2^{-/-} (PC) egerek bőrével összehasonlításban (**16b ábra**). A PP egerek epidermiszében a WP egerekéhez képest jelentősen kevesebb BrdU-pozitív sejtmag volt látható (**16c ábra**), ami a PARP2^{-/-} keratinociták kisebb proliferációs rátájára utal.

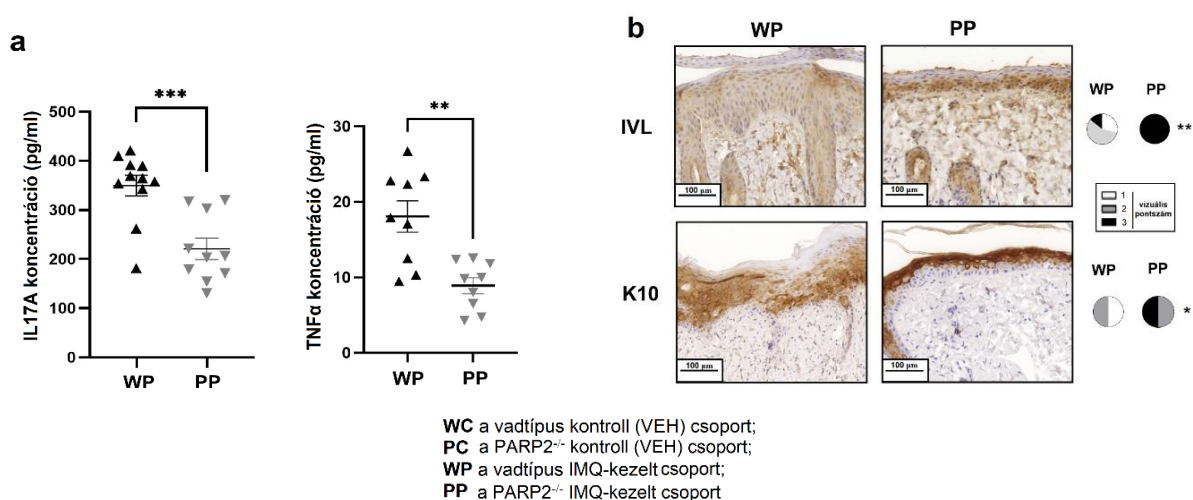


16. ábra. A PARP2 hiánya véd az IMQ által indukált pikkelysömörrel szemben

A pikkelysömör-szerű bőrgyulladást PARP2^{+/+} és PARP2^{-/-} egerekben az 5%-os IMQ-tartalmú Aldara krémmel indukáltuk az egerek szőrtelenített hátbőrén. **a** A képek az elváltozásokat mutatják az 5. napon. **b** H&E festést végeztünk az egerek léziós metszetein, és a képeken az IMQ által kiváltott dermatitisz jellemzőit a következő módon jelöltük: p = proliferáló bazális sejtek, c = tágult kapillárisok, d = dermális sejtes infiltrátum. A bőrlézióinak epidermális vastagságát a Fiji ImageJ szoftverrel mértük, és csoportonként n=4-10 átlag ± SEM értékként ábrázoltuk. **c** A BrdU beépülés detektálásával jellemeztük az epidermális keratinociták proliferációját. A BrdU-pozitív sejtmagok számát három nagy felbontású mezőben (HPF) számoltuk meg és átlagoltuk minden egyes vizsgált egér bőrmetszetében, és a csoportonkénti átlagot ± SEM értékként ábrázoljuk. Méretarány: 100 μm. A **b** és **c** paneleken, mivel a Shapiro-Wilk teszt normál eloszlást mutatott, egyutas ANOVA tesztet alkalmaztunk, majd Tukey-féle post-hoc tesztet végeztünk. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

A PP egerek bőrében kialakult mérsékelt gyulladást mutatja az IL17A és a TNF α alacsonyabb szintje a PP egerek léziós bőrlízátumaiban a WP egerekéhez képest (**17a ábra**). A léziós metszetek immunhisztokémiai (IHC) elemzése az involukrin (IVL) és a keratin 10 (K10) expresszióját mutatja. A PP egerekben megőrizte jellegzetes expresszióját a stratum spinosumban, míg a WP csoportban az involukrin expresszió az egész epidermiszre kiterjedt (**17b ábra**). Ezen kívül, a késői terminális differenciálódás markere, a keratin 10 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a PP egerek epidermiszében, mint a WP egerekben (**17b ábra**).

Összességében ezek az adatok a PARP2 szerepére utalnak a pikkelysömörös gyulladással járó keratinocita aktivációban.



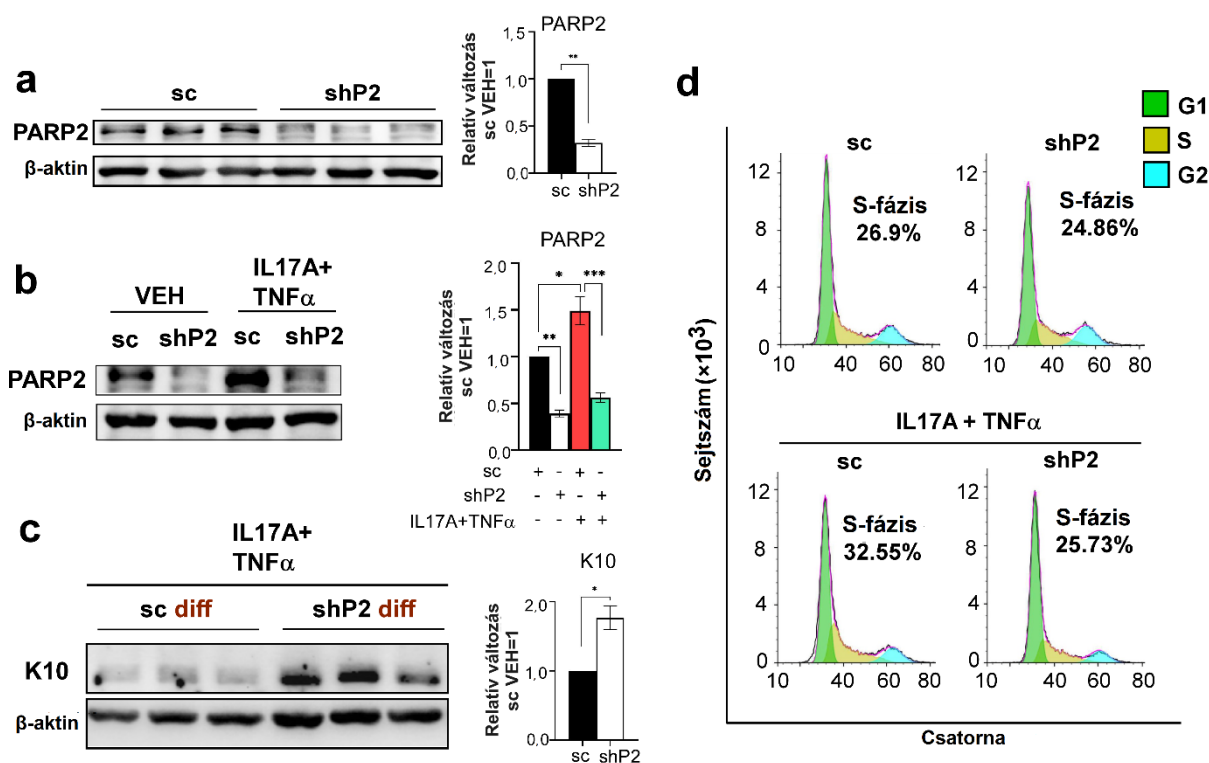
17. ábra. Kisebbszámú gyulladás és megtartott terminális differenciáció PARP2^{-/-} egerek bőrében IMQ kezelés során

A pikkelysömör-szerű bőrgyulladást PARP2^{+/+} és PARP2^{-/-} egerekben az 5%-os IMQ-tartalmú Aldara krémmel indukáltuk az egerek szőrtelenített hátbőrén. **a** Az IL17A és TNF α koncentrációkat az egerek teljes bőrlízátumaiban ELISA módszerrel mértük meg. **b** A képek az egerek léziós bőrből végzett involukrin (IVL) és keratin (K)10 IHC-t mutatják. A WC a vad típusú (PARP2^{+/+}), vehikullummal (kontrollal) kezelt egereket, a WP a vad típusú (PARP2^{+/+}), IMQ által kiváltott pikkelysömör-szerű bőrgyulladást mutató egereket, a PC a PARP2^{-/-}, vehikullummal (kontrollal) kezelt egereket, a PP a PARP2^{-/-}, IMQ által kiváltott pikkelysömör-szerű bőrgyulladást mutató egereket jelöli. Méretarány: 100 μ m. Az **a** paneleken párosítatlan, kétmintás t-próbát használtunk a statisztikai szignifikancia meghatározására. Az IHC reakciók intenzitását 0-3 skálán pontoztuk, majd a csoportok közötti statisztikai elemzéshez χ^2 próbát alkalmaztunk. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.6. A PARP2-depletált humán keratinociták terminális differenciálódása megtartott marad a pikkelysömörre jellemző citokinekkal való kezelés után

A PARP2 keratinocitákban betöltött szerepének jellemzésére a PARP2-t HPV-Ker humán keratinocitákban egy PARP2-specifikus shRNS-t tartalmazó lentivirális vektor alkalmazásával csendesítettünk, ami a PARP2 fehérje expressziójának körülbelül 70%-os

csökkenését eredményezte a shP2 HPV-Ker sejtekben a negatív kontroll szekvenciát hordozó sc sejtekhez képest (**18a ábra**). Az sc és shP2 HPV-Ker sejteket IL17A és TNF α kombinációjával stimuláltuk, mivel korábban leírták, hogy az IL17A és TNF α szinergista hatása a keratinocitákban olyan transzkriptomikai változásokat indukál, amely jelentős korrelációt mutat a pikkelysömörre jellemző genomikai változásokkal [226].



18. ábra. A PARP2 deplécio véd az IL17A és TNF α káros hatásaival szemben humán keratinocitákban

HPV-Ker humán keratinocitákat transzfektáltunk vagy PARP2-specifikus shRNS-t vagy negatív kontroll szekvenciát hordozó lentivirális vektorokkal, így létrehozva a PARP2-csendesített shP2 HPV-ker keratinocitákat és az sc kontroll keratinocitákat. **a** A csendesítés hatékonyságát Western blottal ellenőriztük. **b** Az sc és shP2 HPV-Ker sejteket 6 órán keresztül kezeltük vagy vehikulummal (VEH), vagy 200 ng/ml IL17A és 10 ng/ml TNF α kombinációjával, majd ezt követően a mintákban a PARP2 fehérjeszintű expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk. **c** A teljes konfluenciát elért sc és shP2 HPV-Ker sejteket IL17A és TNF α együttes jelenléte mellett differenciáltattuk, majd Western blottal meghatároztuk a K10 expresszióját. **d** Az sc és shP2 sejtek sejtciklus analízisét áramlási citométerrel végeztük, ahol a sejteken vagy vehikulummal vagy IL17A+TNF α -val történő kezelést alkalmaztunk. A hisztogramok és a blotok három független kísérlet reprezentatív ábrái. A blotok denzitometriás kiértékelését ImageLab szoftverrel végeztük. Az átlagos intenzitás értékeket a β -aktin arányában mutatjuk be, az sc sejtekhez viszonyítva, fold change $\pm$ SEM formában. A szignifikanciát * p <0,05, ** p <0,01 vagy *** p <0,001 értéknél állapítottuk meg.

Az IL17A és TNF α kezelés hatására a keratinociták PARP2 expressziója megnőtt (**18b ábra**). IL17A és TNF α jelenlétében differenciálódva az shP2 keratinociták CK10 expressziója jelentősen magasabb volt, mint az sc keratinocitáké (**18c ábra**). A sejtciklus elemzések során

az sc HPV-ker sejtekben az S-fázisú sejtek arányának növekedését észleltük IL17A + TNF α kezelés hatására, de az shP2 sejtekben ez nem volt jellemző (**18d ábra**).

Úgy tűnik, hogy a humán keratinocitákban tapasztaltak összevágtnak a pikkelysömörös betegek bőrében és a psoriasis IMQ-indukált egér modelljében tapasztaltakkal a PARP2 funkcióját illetően, ami arra ösztönzött minket, hogy tovább tanulmányozzuk a PARP2 gyulladásos szabályozásban betöltött szerepét.

5.6.1. A pro-inflammatorikus citokinek által közvetített NF- κ B aktiváció gátolt PARP2 csendesített keratinocitákban

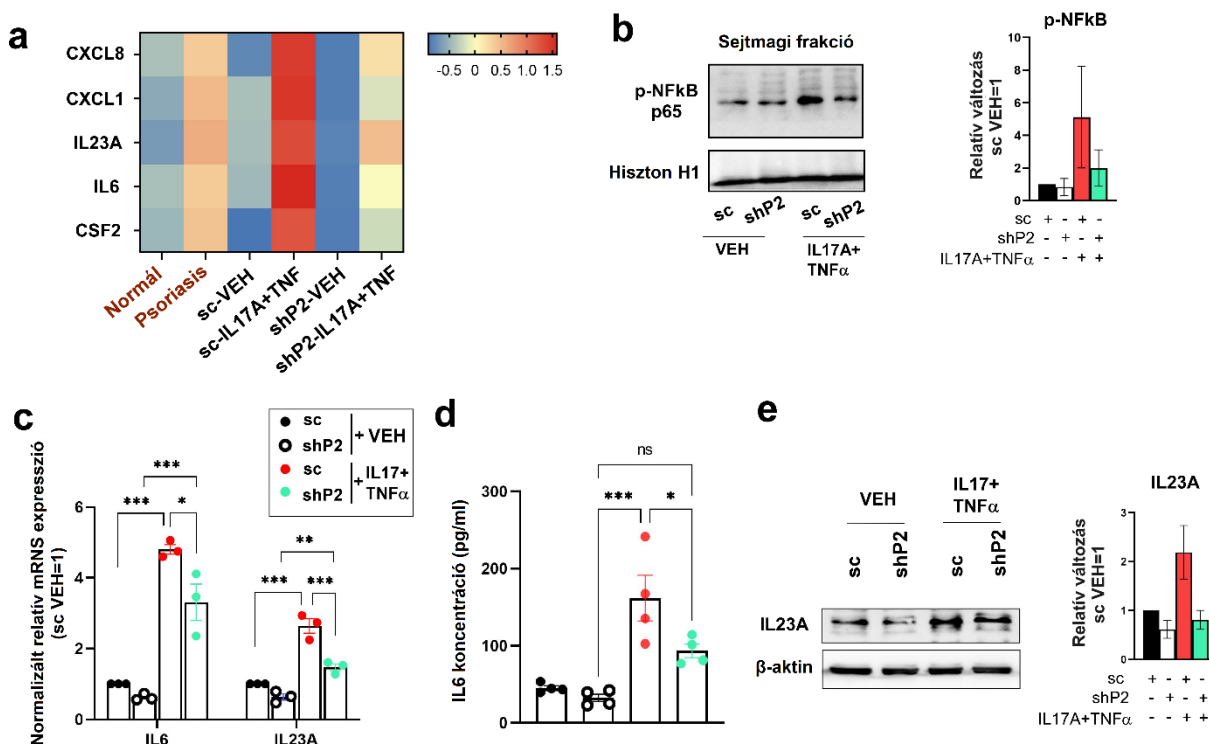
A keratinocitákban a PARP2 által szabályozott mechanizmusok megismerése érdekében teljes körű transzkriptom elemzéseket végeztünk RNS-szekvenálással az sc és shP2 HPV-Ker sejtekben, amelyeket vagy vehikulummal vagy IL17A+TNF α -val kezeltünk. Több mint 300 diszregulálódó gént azonosítottunk a vehikulummal kezelt sc és shP2 keratinociták között. A vehikulummal kezelt és az IL17A+TNF α -val kezelt sc HPV-Ker sejtek összehasonlításakor 64 gén esetében találtunk eltérő expressziót, szemben azzal a 20 génnel, amit a vehikulummal vagy IL17A+TNF α -val kezelt shP2 sejtek összehasonlítása során találtunk. Ez az IL17A és TNF α által indukált útvonalak szupressziójára utal a PARP2-csendesített keratinocitákban. A TNF α önmagában vagy az IL17A-val együttesen elsősorban az NF- κ B aktiválásán keresztül hat [227], amely kritikus pro-inflammatorikus útvonal a pikkelysömör kialakulásában. Valóban, 92 pikkelysömörös és 82 normál bőrmintából származó, már publikált RNS szekvenálási adatok *in silico* elemzése során [219] azt találtuk, hogy számos NF- κ B célgén, köztük a CXCL8 (IL8), a CXCL1, az IL23A, az IL6 és a kolónia stimuláló faktor (CSF)2 fokozottan expresszálódik a pikkelysömörös bőrben. RNS szekvenálási adatainkban az IL17A+TNF α kezelés hatására az sc HPV-Ker sejtekben még annál is nagyobb mértékű indukciót találtunk ezeknek a géneknek az expressziójában, viszont az shP2 sejtekben ez az indukció jóval kisebb mértékű volt (**19a ábra**).

Ezek után megvizsgáltuk a sejtek magi frakciójában az NF- κ B p65 alegységének foszforilációját, ami az NF- κ B aktiváció egyik indikátora, és IL17A és TNF α kezelés hatására valóban megnőtt a p65 foszforiláció az sc sejtekben, de nem az shP2 sejtekben (**19b ábra**).

Az NF- κ B célgének közül két markert választottunk a további vizsgálatainkhoz, az IL6-ot és az IL23A-t, mivel mindkettőt összefüggésbe hozták a psoriasis-ra jellemző gyulladással humán és egér modellekben is [10, 184, 228]. Először RT-qPCR mérésekben validáltuk az RNS szekvenálási adatokat, amelyek megerősítették, hogy az IL17A és a TNF α szignifikánsan

kisebbs mértékben emelte az IL6 és IL23A mRNS expresszióját az shP2 keratinocitákban, mint az sc keratinocitákban (19c ábra). Emellett az IL17A+TNF α által megnövelt IL6 szekréció (19d ábra) és IL23A fehérje expresszió (19e ábra) alacsonyabb volt a shP2 keratinocitákban, mint az sc sejtekben.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PARP2 befolyásolja az NF- κ B aktivitást és ezáltal az NF- κ B által közvetített gyulladásos útvonalakat is.



19. ábra A PARP2 csendesítése gátolja az NF- κ B aktiválódását keratinocitákban

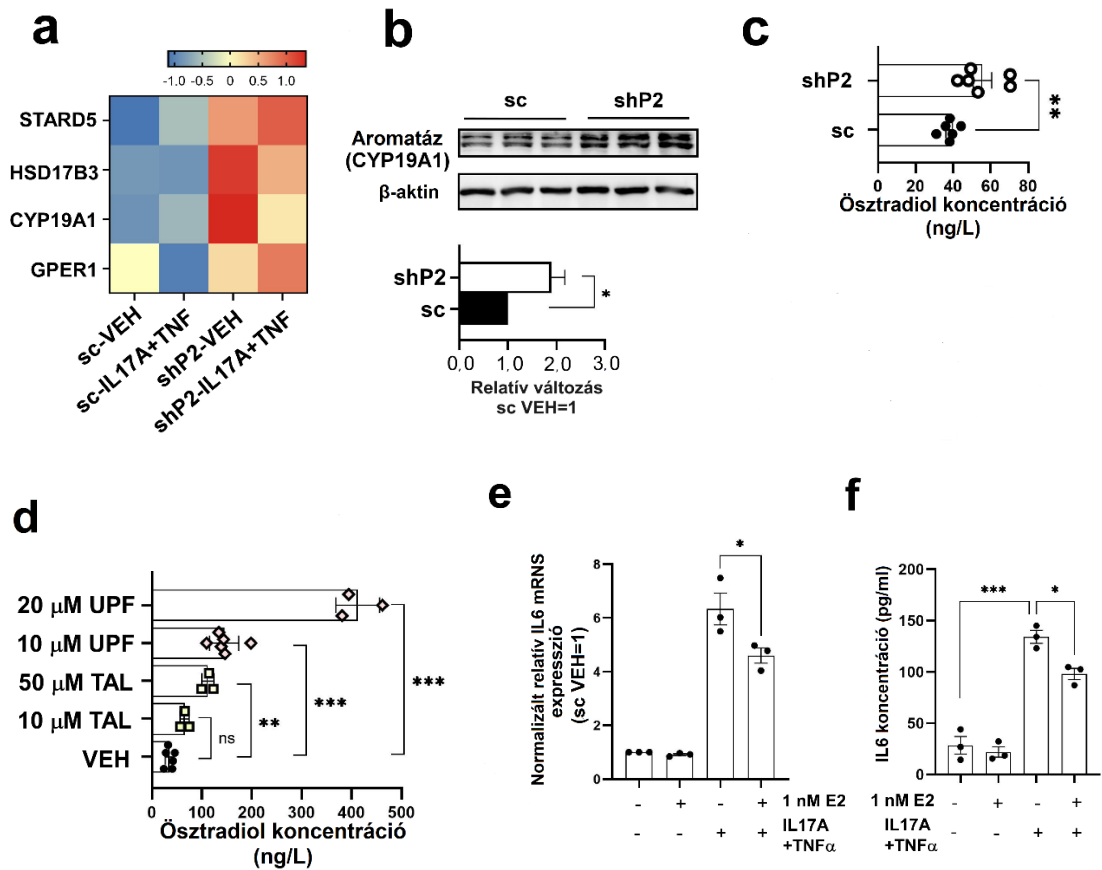
a A hőterképeket egészséges egyének és pikkelysömörös betegek léziós bőréből készült, publikusan elérhető RNS szekvenálási adataiból, valamint a vehikulummal (VEH) vagy IL17A+TNF α -val kezelt sc és shP2 HPV-Ker sejtek RNS szekvenálási adataiból készítettük, és egyes NF- κ B célgének expresszióját mutatják. **b** Az NF- κ B p65 alegységének foszforilációját Western blottal mutattuk ki a vehikulummal vagy IL17A+TNF α -val kezelt sc és shP2 HPV-Ker sejtek magi frakciójában. **c** Az IL6 és IL23A mRNS expresszióját RT-qPCR segítségével mértük (reprezentatív ábra, n=2). Az IL6 és IL23A expressziót a GAPDH expressziójára normalizáltuk, és az sc-VEH sejtekben mért expresszióhoz viszonyítva adtuk meg. Az adatokat három független mérés átlagaként $\pm$ SEM ábrázoljuk. **d** Az IL6 szekréció mérését a vehikulummal vagy IL17A+TNF α -val kezelt sc és shP2 keratinocitákból ELISA-val végeztük. Az adatok négy biológiai replikátum eredményeit ábrázolják átlag $\pm$ SEM formában. **e** Az IL23A fehérje expresszióját Western blot technikával mutattuk ki sc és shP2 HPV-Ker sejtekben VEH vagy IL17A+TNF α -val történő stimulációt követően (reprezentatív ábra, n=2). A blottok denzitometrálsát az ImageLab szoftverrel végeztük el. Az átlagos intenzitás értékeket az aktin arányában határoztuk meg, az sc-VEH sejtekhez viszonyítva, és az adatokat fold change $\pm$ SEM formában adtuk meg. A **c-d-e** panelek esetében a csoportok közötti összehasonlítást egyutas ANOVA teszttel végeztük, amelyet Tukey-féle post-hoc teszt követett. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5.6.2. A fokozott ösztadiol termelés gátolja az NF- κ B-t a PARP2-depletált keratinocitákban

Az RNS szekvenálásból származó adathalmaz vizsgálata során a szteroidogenezis olyan markereit (mint például a koleszterin transzporter StarD5) találtuk, amelyek az shP2 HPV-Ker sejtekben magas indukciót mutattak az sc sejtekhez képest (**20a ábra**), ami összhangban volt korábbi vizsgálatainkkal, amelyek a PARP2-t a koleszterin- és szteroid homeosztázis szabályozásával hozták összefüggésbe [97, 98]. Ezen felül, az shP2 sejtekben emelkedett a 17 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz-3-at kódoló HSD17B3 expressziója is, amely az androszténdion tesztoszteronná történő átalakítását katalizálja. Valamint a CYP19A1, amely a tesztoszteront ösztrogénné alakító aromatazt kódolja, és a G-proteinhez kapcsolt ösztrogén receptor 1 (GPER1) expressziója is indukálódott az shP2 sejtekben (**20a ábra**), ami pedig a PARP2-csendesített keratinociták fokozott ösztrogénválaszára utal. Ezek a génexpressziós változások felkeltették érdeklődésünket, mivel az ösztadiol (E2) [229, 230], a fő humán ösztrogén és a GPER1 [231] egyaránt képesek gátolni az NF- κ B aktiválódását számos szövetben. Így feltételezésünk az volt, hogy az NF- κ B aktiváció gátlása az ösztrogénhatás indukciójának következménye lehet az shP2 sejtekben.

Először is megerősítettük, hogy a PARP2-csendesített keratinocitákban valóban indukálódott az aromataz expressziója (**20b ábra**). Ezzel összhangban, az shP2 HPV-Ker sejtek felülúszójában szignifikánsan magasabb ösztadiol koncentrációt mutattunk ki, mint az sc HPV-Ker sejtek esetében (**20c ábra**). Ezután azt vizsgáltuk, hogy a PARP2 enzimatis aktivitása szerepet játszhat-e az ösztadiol termelés szabályozásában. Ebből a célból a PARP2-t egy specifikus inhibitorral, az UPF1069-el gátoltuk, ami a HPV-Ker sejtek ösztadiol szekréciójának erőteljes növekedését idézte elő (**20d ábra**). Valamint, a PARP inhibitor talazoparib, amely a PARP1-nek és PARP2-nek is potens inhibitora, magasabb koncentrációban alkalmazva, az UPF1069-hez képest kisebb, de mégis szignifikáns mértékű növekedést eredményezett a HPV-Ker sejtek ösztadiol termelésében (**20d ábra**). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a PARP2 enzimatis aktivitása, bár nem tisztázott módon, de részt vesz az aromataz aktivitásának, és így az ösztadiol szintézisének a szabályozásában keratinocitákban.

Amikor a HPV-Ker sejteket az IL17A és TNF α stimuláció előtt ösztadiol-t tartalmazó médiumban tartottuk, alacsonyabb IL6 mRNS expressziót (**20e ábra**) és szekréciót (**20f ábra**) mértünk a kezelést követően, mint ösztadiol nélkül, ami azt jelzi, hogy az ösztadiol valóban gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki az IL17A+TNF α által kiváltott válasz ellen keratinocitákban.

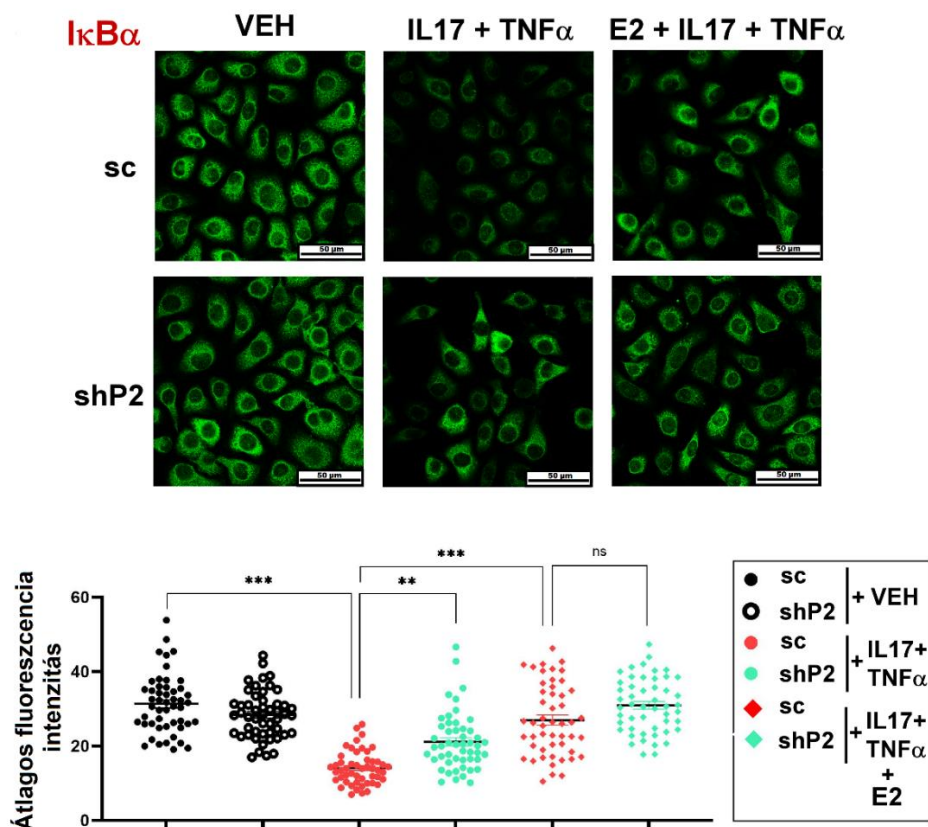


20. ábra. A PARP2-depletált keratinociták magasabb ösztradiol szekréciója gyulladásgátló hatású

a A hőterképek az ösztrogének szintézisében és működésében részt vevő gének expresszióját mutatják a vehikulummal (VEH) vagy IL17A+TNF α -val kezelt sc és shP2 HPV-Ker sejtekben. Három biológiai replikátumból mért expressziók átlagát ábrázoltuk. **b** Az aromatáz expresszióját sc és shP2 keratinocitákban Western blot segítségével határoztuk meg. **c** Az ösztradiol (E2) szekréció mérése sc és shP2 HPV-Ker sejtek felülúszójából ELISA módszerrel történt. **d** A VEH-mal vagy a feltüntetett koncentrációkban alkalmazott talazoparib-val (TAL) vagy UPF1069-el (UPF) 48 órán keresztül kezelt HPV-Ker sejtek felülúszójából az ösztradiol mérése szintén ELISA-val történt. Az eredményeket legalább három biológiai ismétlés átlaga $\pm$ SEM módon ábrázoljuk. **e-f** A HPV-Ker sejtek tápfolyadékát 1 nM ösztradiol-al egészítettük ki a VEH-al vagy IL17A + TNF α -val történő kezelés előtt. Ezt követően az IL6 mRNS expresszióját RT-qPCR segítségével vizsgáltuk a sejtek extraktumában, **e** a sejtek felülúszóját pedig az IL6 termelés méréseire használtuk ELISA tesztekben. **f** Az adatok három független mérés átlaga $\pm$ SEM-et jelentenek. A csoportok összehasonlítására a **b** és **c** panelekben párosítatlan, kétmintás *t*-próbát használtunk. A **d-e-f** panelekben egyutas ANOVA-t, majd Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk, mivel a Shapiro-Wilk teszt az adatok normális eloszlását mutatta. A szignifikanciát **p*<0,05, ***p*<0,01 vagy ****p*<0,001 értékeknél állapítottuk meg.

Következő lépésben immunfluoreszcens technikával annak az I κ B α -nak a jelenlétét vizsgáltuk a keratinociták citoplazmájában, amely az NF- κ B-t a citoplazmában lehorgonyozza, és ezáltal megakadályozza annak nukleáris transzlokációját és az NF- κ B célgének transzkripcióját. IL17A+TNF α kezelés hatására az I κ B α degradációját észleltük az sc HPV-Ker

sejtekben, ami az shP2 sejtekben lényegesen kevésbé volt kifejezett (**21 ábra**). Amikor azonban az sc HPV-Ker sejtek a citokin stimulus előtt ösztadiol előkezelést kaptak, az I κ B α degradációja kisebb mértékben ment végbe (**21 ábra**), ami megerősíti az I κ B α degradáció ösztadiol által közvetített gátlását mutató korábbi eredményeket [230].

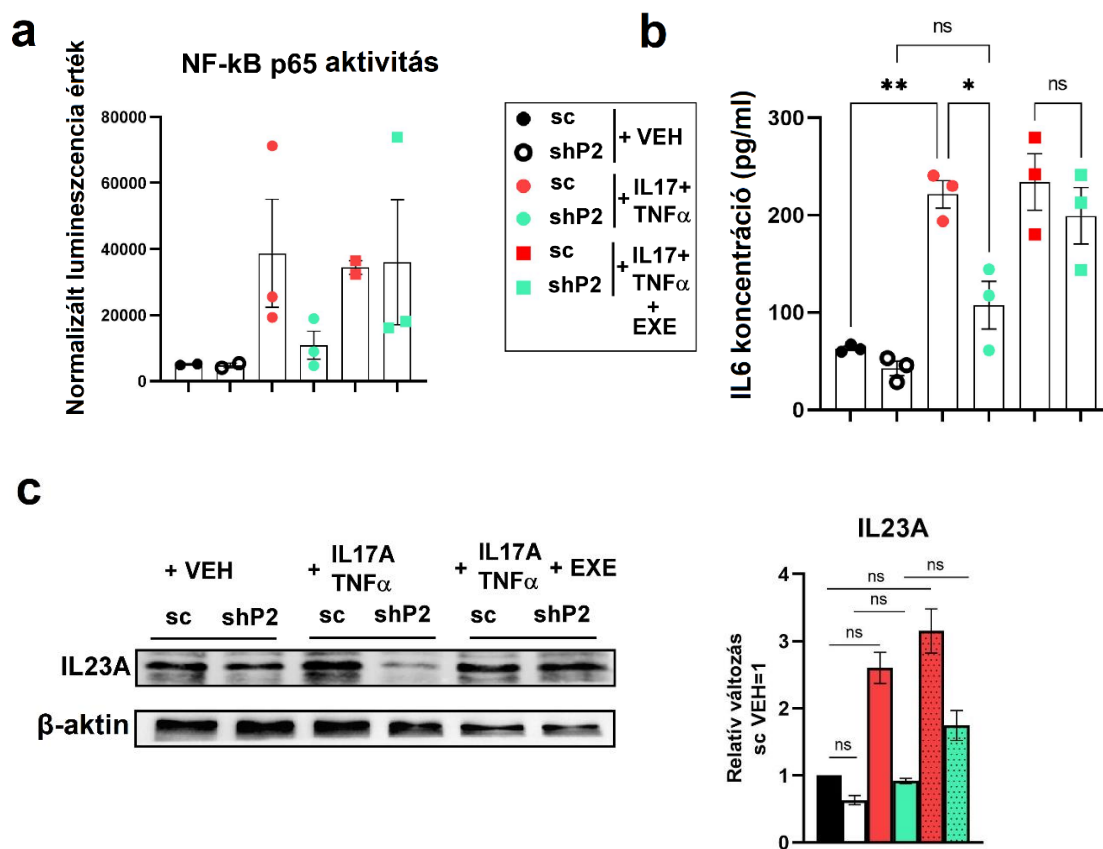


21. ábra. Az ösztadiol megakadályozza a keratinocitákban az I κ B α IL17A+TNF α hatására bekövetkező degradációját

Konfokális mikroszkóppal készült immunfluoreszcens felvételek mutatják az I κ B α -t az sc és shP2 sejtekben a feltüntetett kezelések mellett, ahol a méretség: 50 μ m. A bemutatott adatok két független kísérlet reprezentatív adatai. A fluoreszcencia intenzitását felvételenként 50 sejtben mértük, és átlagos intenzitás $\pm$ SEM formában van ábrázolva. A kísérleteknél Kruskal-Wallis-tesztet alkalmaztunk. A szignifikanciát * p <0,05, ** p <0,01 vagy *** p <0,001 értékeknél állapítottuk meg.

Annak érdekében, hogy az ösztadiol által kifejtett védő hatást funkcionálisan a PARP2 csendesítés hatásához kötni tudjuk, gátoltuk a HPV-Ker sejtekben az ösztadiol szintézist az aromatáz inhibitor exemesztán (EXE) alkalmazásával. Azt találtuk, hogy az NF- κ B p65 alegységének aktivációja IL17A és TNF α hatására az shP2 sejtekben exemesztán előkezelés hatására az sc sejtekben mért szintre emelkedett (**22a ábra**). Ezzel összhangban, az exemesztán alkalmazása csökkentette az sc és shP2 HPV-Ker sejtek között eredetileg mért különbséget az

IL6 szekrécióban (22b ábra) és az IL23A fehérje expresszióban az IL17A+TNF α kezelést követően (22c ábra).



22. ábra. Exemesztán hatására megnő az NF-κB aktiváció a PARP2 depletált keratinocitákban

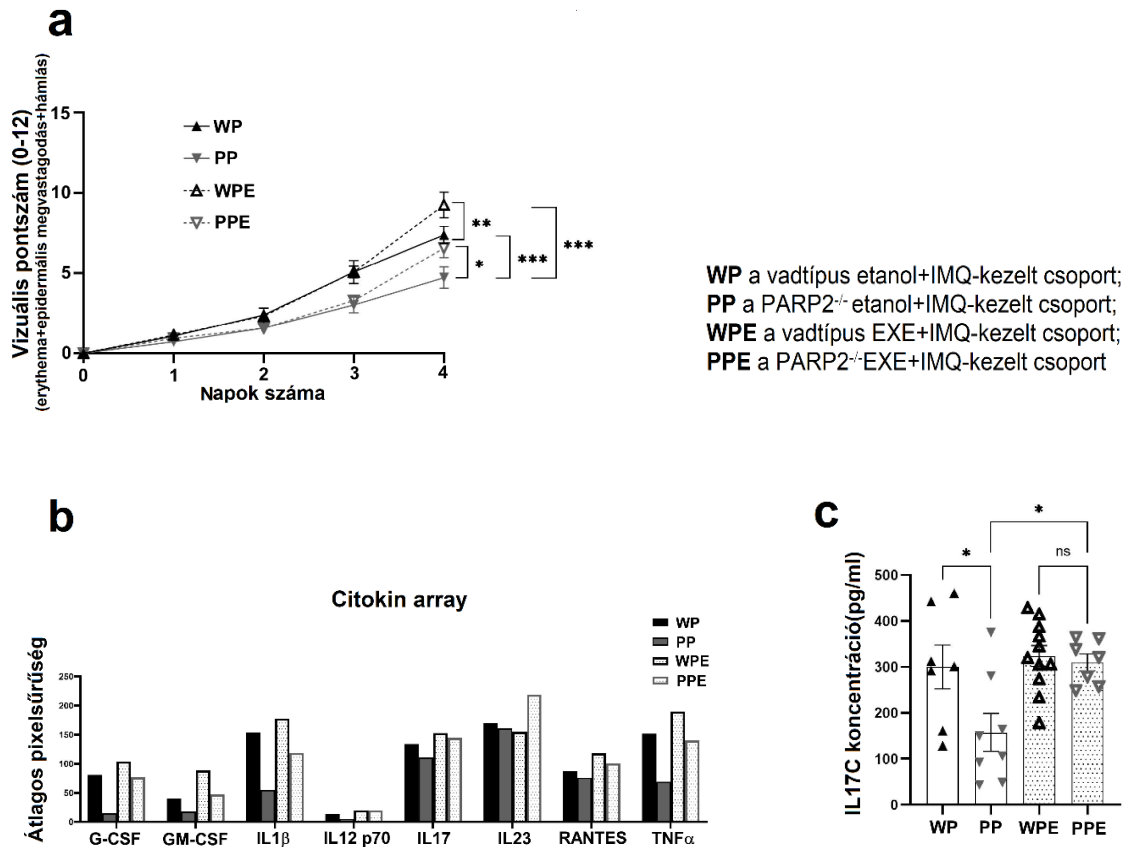
a Az NF-κB p65 aktivitást és **b** az IL6 szekréciót megmértük az sc és shP2 HPV-Ker sejtekben VEH-al vagy IL17A+TNF α -val történő kezelést követően, illetve akkor, amikor az IL17A+TNF α kezelés előtt a sejteket 5 μ M exemesztán-nal (EXE) előkezeltük. Az ábrák legalább két független kísérlet átlagát $\pm$ SEM formában mutatják. **c** Az IL23A fehérje expresszióját Western blot technikával határoztuk meg a sejtekben. A blottok denzitometrállását ImageLab szoftverrel készítettük. Az átlagos intenzitás értékeket az aktinhez viszonyított arányként mutatjuk be, a VEH-al kezelt sc sejtekhez viszonyítva, három független kísérletből származó fold change $\pm$ SEM értéként kifejezve. Az **b** panel esetében látható kísérletnél egyutas ANOVA-t, majd Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk, mivel a Shapiro-Wilk teszt az adatok normális eloszlását mutatta. A **c** panelben látható kísérletnél Kruskal-Wallis-tesztet alkalmaztunk. A szignifikanciát * p <0,05, ** p <0,01 vagy *** p <0,001 értéknél állapítottuk meg.

Úgy tűnik tehát, hogy az ösztadiol szintézis gátlása felszabadította az NF-κB aktiváció PARP2 depléción által közvetített gátlását a keratinocitákban, ami arra utal, hogy a PARP2 csendesítés gyulladáscsökkentő hatása a keratinocitákban valóban a fokozott ösztadiol termelés következménye

5.7. Az aromataáz funkció szükséges a PARP2 által közvetített gyulladáscsökkentő hatáshoz egerek bőrében

Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a bőr aromataáz aktivitásának gátlása az IMQ által kiváltott bőrgyulladást egereinkben. A PARP2^{+/+} és PARP2^{-/-} egerek egy-egy csoportját oldószerrel (etanol) és IMQ-dal (WP és PP egerek) kezeltük. Emellett újabb csoportokat is alkottunk a PARP2^{+/+} és PARP2^{-/-} egerekből, amelyek esetében az IMQ kezelést epikután alkalmazott exemesztán oldatos kezelés előzte meg (WPE és PPE egerek).

Az exemesztán kezelés mind a PARP2^{+/+}, mind a PARP2^{-/-} egerek esetében megnövelte az IMQ által kiváltott elváltozások kumulatív vizuális pontszámát (**23a ábra**), ami arra utal, hogy az aromataáz aktivitásnak védő szerepe lehet a bőrben. Az exemesztán megszüntette a PARP2 delécio gyulladáscsökkentő hatását az IMQ modellben, amit jól mutat az egerek bőrlizátumaiból mért, pikkelysömör patomechanizmusa szempontjából releváns citokinek mennyiségének növekedése a PPE egerekben a PP egerekhez képest (**23b ábra**). Az IL17C-t, a psoriasis-os gyulladás egyik központi pro-inflammatórikus citokinjét [232] külön ELISA mérésben határoztuk meg a bőrlizátumokból, és hasonlóan a citokin array-hez, itt is jelentős növekedést találtunk az exemesztán kezelés hatására (**23c ábra**).

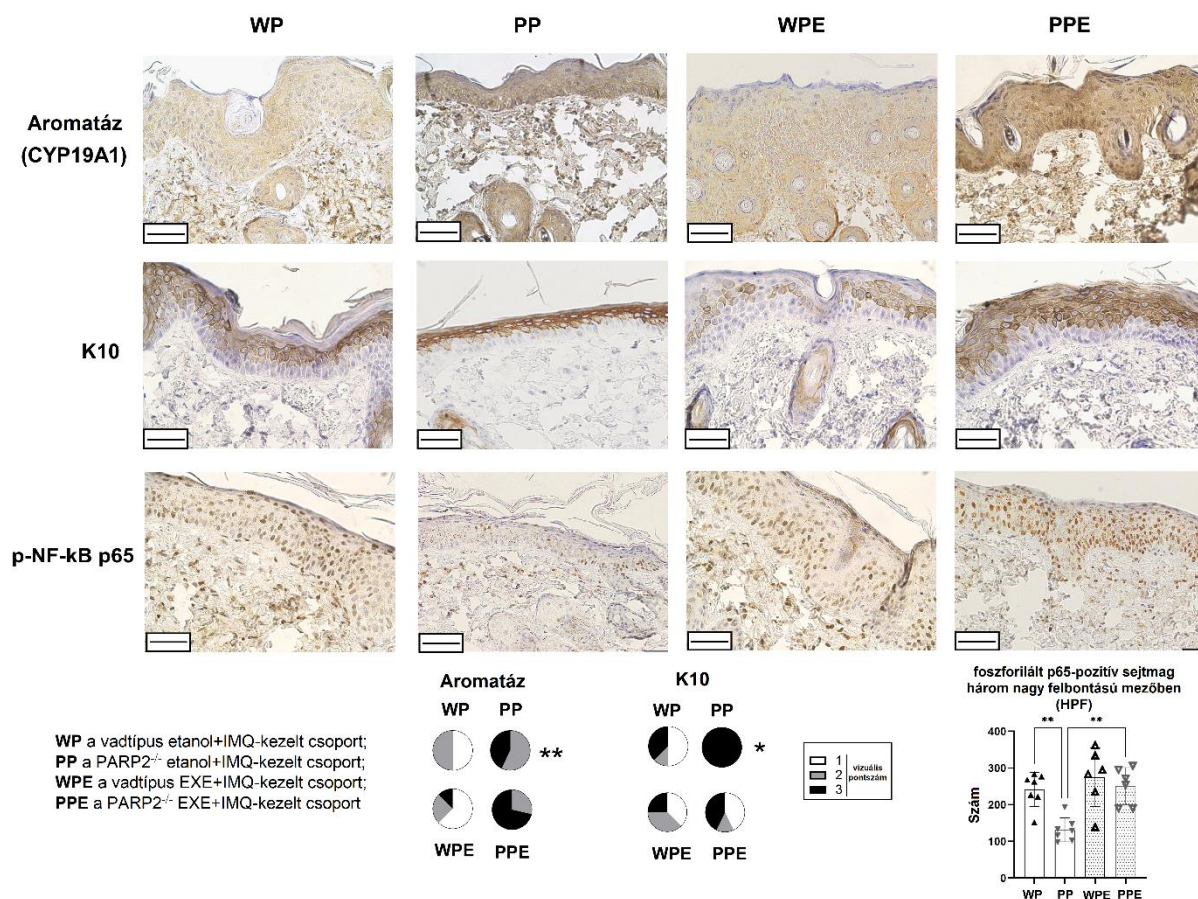


23. ábra. Az aromatáz aktivitás gátlása fokozza az IMQ által kiváltott dermatitisz súlyosságát

a PARP2^{+/+} és PARP2^{-/-} egerek szőrtelenített hátbőrét kezeltük oldószerrel és IMQ-dal (WP és PP egerek) vagy 500 μ M exemesztán és IMQ-dal (WPE és PPE egerek), és a kialakult dermatitiszt a következőképpen pontoztuk: erythema, epidermális megvastagodás és hámlás, mindegyiket egy 0-4 skálán. A kumulatív pontszámot 0-12-es skálán adtuk meg. A csoportok összehasonlításához ($n=7-11$ egér/csoport) kétutas ANOVA tesztet, majd Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. **b** A citokín array-t a WP, PP, WPE és PPE csoportok egereinek teljes bőrlizátumaiban a pro-inflammatorikus és pikkelysömörrel kapcsolatos citokinek szemikvantitatív meghatározására használtuk. Az egy csoportba tartozó egerek bőrlizátumaiból azonos mennyiségek összeadásával négy mintát hoztunk létre, amelyeket a citokín array membránjaira felvittünk. Az adatok a membránokon detektált pöttyök átlagos pixelsűrűségét mutatják csoportonként. **c** Az IL17C-t ELISA módszer segítségével határoztuk meg valamennyi egér bőrlizátumából. A szignifikanciát * $p<0,05$, ** $p<0,01$ vagy *** $p<0,001$ értéknél állapítottuk meg.

Az egerek léziós bőrből készült metszeteken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A humán keratinocitákban talált eredményeinkkel összhangban, a PARP2^{-/-} egerek epidermális keratinocitáiban magasabb aromatáz expressziót találtunk a PARP2^{+/+} egerekkel összehasonlítva, függetlenül az alkalmazott kezeléstől (PP és PPE egerek vs. WP és WPE egerek). Ugyancsak összhang az *in vitro* adatokkal, hogy a WP egereknél szignifikánsan több foszforilált p65-pozitív sejtmagot találtunk az epidermiszben, mint a PP egereknél (24. ábra). Az aromatáz gátlása azonban a p65 foszforiláció ugyancsak szignifikáns növekedését eredményezte a PPE egerek bőrében a PP egerekhez képest, aminek hatására megszűnt az

eredetileg mért különbség a PARP2 knock-out és vad típusú egércsoportok között a p65 aktivációt illetően (24. ábra). Ezen kívül, az aromatáz gátlás a keratinociták differenciációját is negatívan befolyásolta, amit az exemesztánnal kezelt egerek epidermiszében a K10 expresszió csökkenése mutatott ki a csak IMQ-val kezelt egerekhez képest (24. ábra).



24. ábra. Az exemesztán megszünteti a PARP2 deléció védő hatását az IMQ-indukált pikkelysömörben

Immunhisztokémiai (IHC) analízisekben meghatároztuk az aromatáz, a foszforilált NF-κB p65 alegység és a keratin (K)10 expresszióját a jelzett egércsoportok bőrén. Méretszáv: 50 μm. A K10 és az aromatáz IHC reakciók intenzitását 0-3 skálán pontoztuk, majd a csoportok közötti statisztikai elemzéshez χ^2 -tesztet alkalmaztunk. A p65 foszforiláció értékeléséhez a pozitív sejtmagokat minden egyes metszeten három nagy felbontású mezőben (HPF) számoltuk meg, és a számok átlag értékét ábrázoltuk az egyes egerek metszeteinek esetében. A csoportok összehasonlításához egyutas ANOVA-t, majd Tukey-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Összefoglalva, ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PARP2^{-/-} egerekben megfigyelhető védett fenotípus az IMQ által kiváltott dermatitisz súlyosságával szemben az egerek bőrén megnövekedett aromatáz aktivitás következtében alakul ki, legalábbis részben.

Végül megvizsgáltuk az aromataz expresszióját humán bőrben is, ugyanazokat a pikkelysömörös és egészséges mintákat használva, amelyekben korábban a PARP2 expresszióját is elemeztük. Az egészséges mintákban az aromataz magas expresszióját találtuk, amely egyenletesen oszlott el az epidermisz rétegeiben, míg a pikkelysömörös epidermiszben az aromataz expressziója összességében csökkenést mutatott, és főleg a stratum granulosumra korlátozódott (**25. ábra**), amiből arra következtethetünk, hogy a bőr ösztrogén bioszintézise visszaszorul pikkelysömörben. Ez a megfigyelés a fenti eredményekkel együtt arra utal, hogy a PARP2 expresszió és az epidermális keratinociták ösztrogén szintézise között összefüggés lehet, amely hozzájárulhat a lokális gyulladásos folyamatok szabályozásához a pikkelysömör patomechanizmusa során.



70

VI. Megbeszélés

A PARP1 és a PARP2 az ADP-ribozilációt, a fehérjék poszttranszlációs módosításainak egyik típusát katalizáló enzimek családjába tartozik. Katalitikus funkciójuk elsődlegesen DNS-törések hatására aktiválódik, és így a PARP1 és PARP2 sokáig csak a DNS-törések hibajavításában betöltött kulcsfontosságú szerepéről volt ismert.

Ahogy nőtt a PARP1-gyel kapcsolatos tanulmányok száma, úgy ismerték fel a kutatók, hogy a PARP1 részt vesz számos gyulladásos folyamat szabályozásában is [110]. A PARP1 több pro-inflammatorikus transzkripció faktor (pl. NF- κ B) pozitív modulátora, és az eddigi adatok alapján úgy tűnik, hogy főként a Th2 típusú gyulladás kialakulásában játszik szerepet [77]. Ennek megfelelően, a PARP1 genetikai deléciója vagy farmakológiai gátlása gyulladáscsökkentő hatást eredményezett számos Th2 típusú gyulladásos kórkép kísérleti modelljeiben [4-11].

A PARP2-vel kapcsolatos vizsgálatok a PARP1-hez képest korlátozott számban találhatók az irodalomban, azonban az elmúlt évtized kutatásai alapján egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy a PARP2 rendkívül változatos fiziológiai folyamat szabályozásában tölt be egyedi funkciókat [233], amibe beletartozik a transzkripció, sejt differenciáció, mitokondriális biogenezis, lipid és szteroid bioszintézis és a metabolikus homeosztázis szabályozása különféle sejtekben, szövetekben [2, 96, 106, 234]. Azonban a PARP2 gyulladásos folyamatokban betöltött szerepéről kevés adat áll rendelkezésre, de az eddigi információk alapján úgy tűnik, hogy a PARP1-gyel ellentétben a PARP2 Th2 típusú gyulladás szabályozásában nem vesz részt.

A psoriasis (pikkelysömör) az egyik leggyakoribb krónikus gyulladásos bőrbetegség, amelynek során a bőrön jellegzetes plakkok alakulnak ki az epidermális keratinociták túlzott mértékű proliferációjának és elégtelen differenciációjának következményeként. A jelenleg elfogadott magyarázat szerint a pikkelysömör kialakulásáért a Th sejtek bizonyos populációi, elsődlegesen a Th17 sejtek, által mediált immunválaszok felelősek, amelynek közvetítésében az IL23/IL17 citokin tengelynek központi szerepe van a psoriasis-ra jellemző gyulladás kialakulásában [13, 14]. A pikkelysömör patomechanizmusa azonban komplex folyamat, amelyben a Th sejtek szerepe nem kizárólagos, valószínű, hogy az epidermális keratinocitáknak hasonlóan fontos szerepe van a betegség megjelenésében. Szerepük lehet a gyulladás iniciációjában, fenntartásában és felerősítésében is azáltal, hogy a T sejtek toborzásában, megtartásában és aktiválásában részt vevő molekulákat szekretálnak [235].

Értekezésem fő célja az volt, hogy karakterizáljam a PARP1 és a PARP2 szerepét egy Th17 típusú gyulladásos folyamatban, a pikkelysömörben, különös tekintettel a keratinocitákban szabályozott folyamatokra.

6.1. A PARP1 gátlása felerősíti az imikimod által indukált folyamatokat keratinocita sejtekben

Kísérleteink előzményeként szolgáltak azok a tanulmányok, amelyek a PARP1 szerepét Th2 típusú gyulladásban jellemezték, viszont Th17-mediált gyulladásban a PARP1 lehetséges szerepe kevésbé karakterizált. Így vizsgáltuk a PARP1 gátlásának hatását pikkelysömörre jellemző folyamatokban keratinocitákban.

Munkatársaink azt találták, hogy a PARP1 genetikai deléciója egerekben súlyosbította a kialakult tüneteket a pikkelysömör imikimod által indukált kísérleti modelljében, ami ellentmondásban volt az eddigi ismereteinkkel a PARP1 gyulladásban betöltött szerepét illetően. Az ennek hátterében álló folyamatok megértéséhez első lépésként szövettani vizsgálatokban megállapítottuk, hogy a PARP1 expressziója csökken a pikkelysömörös betegek léziós epidermiszében normál bőrhöz viszonyítva, ami az egérmodellben tapasztaltakkal együtt megerősíti, hogy a PARP1 hiánya hozzájárulhat a psoriasis-os gyulladás kialakulásához.

Ezek után *in vitro* humán keratinocita sejt kultúrákban, a HPV-Ker sejtekben megmutattuk, hogy az IMQ-dal való kezelés PARP1 gátlással való kombinálása megismételte az *in vivo* egér modellben kapott eredményeket, nevezetesen, hogy a PARP inhibitorok felerősítették az IMQ hatását a keratinociták proliferációjára, és még inkább az egyes pro-inflammatorikus citokinek (IL6, IL1 β , IL8, IL17 és IL23A) indukciójára vonatkozóan.

Azt találtuk, hogy a nem-szelektív kation csatorna TRPV1 farmakológiai blokádjá képes volt felfüggeszteni a PARP inhibitorok proliferációt stimuláló hatását a HPV-Ker keratinocitákban. A TRPV1 bőrszöveti expressziója relatíve magas, és kifejeződik nemcsak a keratinocitákban, de a perifériás szenzoros idegrostokban és a rezidens immunsejtekben is. A TRPV1-et exogén és endogén gyulladásos mediátor képes aktiválni, amelynek hatására a TRPV1 neuropeptidek szekrécióját és neurogén gyulladásos választ indukál. Korábbi tanulmányok már összefüggésbe hozták a TRPV1-et krónikus gyulladásos bőrbetegségek, köztük a pikkelysömör patomechanizmusával, illetve a TRPV1 túltermelése psoriasis-os léziókban pozitívan korrelál a betegek viszketés érzetével [221, 236, 237]. Az IMQ által indukált psoriasis modellben ugyancsak leírták már a TRPV1 moduláló hatását [220, 222]. Érdekes módon, az egyik tanulmányban azt találták, hogy a tranziens receptor potenciál ankirin

(TRPA)1 kiütött egerekben az IMQ által kiváltott tünetek súlyosabb formában jelentek meg, viszont TRPA1/TRPV1 kettős knock-out egerekben vagy TRPA1 KO egerek TRPV1 inhibitorral való kezelése után az IMQ-indukált dermatitisz súlyossága jelentősen lecsökkent [220], ami a TRPA1 és TRPV1 közötti antagonisztikus kölcsönhatásra utal az IMQ modellben. Úgy gondoljuk, hogy hasonló antagonizmus lehet a PARP1 és a TRPV1 között is, bár ennek a kölcsönhatásnak a jellemzése további kutatások tárgyát kell, hogy képezze. A TRPV1 egyik jellegzetes modulátora, a PKC, a PARP1 aktivitását is befolyásolja [225], ezért megvizsgáltuk azt a lehetőséget, hogy esetleg a PKC aktivitás is része lehet ennek a potenciális funkcionális kölcsönhatásnak a PARP1 és a TRPV1 között. Azonban a PKC inhibitor alkalmazása nem befolyásolta a PARP inhibitorok keratinocita proliferációt stimuláló hatását modellünkben.

Összefoglalva, eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a PARP1 ellentétes szerepet tölthet be a Th17 típusú gyulladásban, például pikkelysömörben, mint a Th2-mediált folyamatokban, és javasoljuk ennek a mechanizmusnak a mélyebb vizsgálatát a jövőbeli kutatásokban.

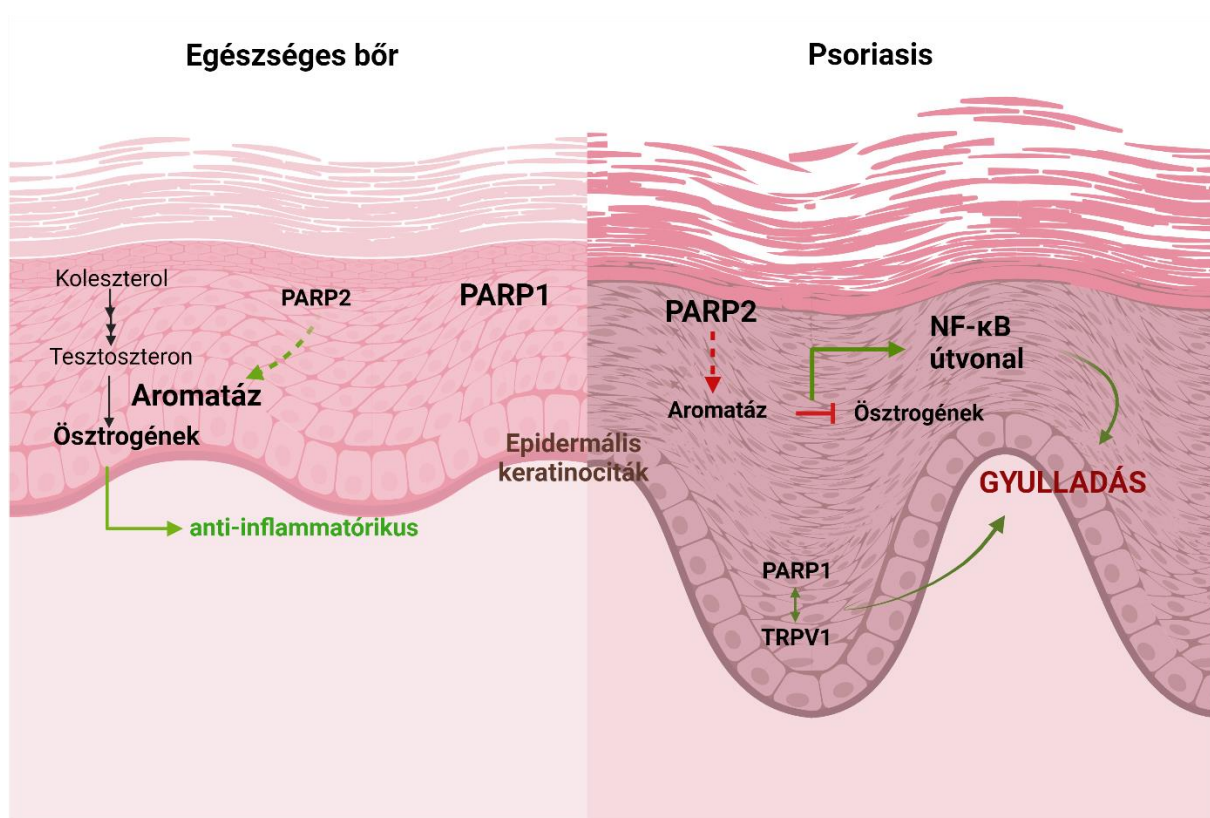
6.2. A PARP2 részt vesz a gyulladás kialakulásában psoriasis-ban a keratinociták ösztradiol bioszintézisének modulálása révén

A PARP2 a PARP1 után a második legnagyobb PARP aktivitással bíró PARP a sejtekben. Mivel előzetes eredményeinkben azt láttuk, hogy a PARP1-nek lehet szerepe psoriasis-ban, ezért kutatásunkban célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, hogy a PARP2-nek lehet-e szerepe pikkelysömörben.

Láttuk, hogy a PARP2 expressziója megemelkedett a pikkelysömörös betegek léziós bőrében. Az imikimod (IMQ) által indukált dermatitisz a PARP1^{-/-} egereknél tapasztaltakkal ellentétben PARP2^{-/-} egerek esetében enyhébb formában alakult ki, mint a vad típusú egerekben, ami arra utal, hogy a PARP1 és PARP2 eltérő mechanizmusok szabályozásában vesz részt a pikkelysömörös gyulladásban. Megjegyzendő, hogy az IMQ által kiváltott pikkelysömör modell nem az első Th17-mediált folyamat, ahol a PARP1^{-/-} és PARP2^{-/-} egerek ellentétes fenotípust mutattak. Kísérletes autoimmun enkephalomyelitiszben (EAE), a szklerózis multiplex egérmodelljében a PARP1 delécioja súlyosbította [238], míg a PARP2 delécioja csökkentette az EAE-re jellemző idegrendszeri gyulladást [239], azonban ennek hátterében álló folyamatok még tisztázásra szorulnak.

A PARP2-t egyedülálló módon a koleszterol és szteroid szintézis számos aspektusával hozták összefüggésbe, főként az intenzív lipid metabolizmust folytató szövetekben [234]. A

PARP2^{-/-} egerek vázizomzatában a 17 β -dehidrogenáz-11 (HSD17B11), az androszteron bioszintézisében részt vevő enzim, valamint a tesztoszteron még erősebb androgén hatású dihidrotesztoszteronná (DHT) történő átalakulását katalizáló 5 α -reduktázok (SRD5A1, 2) emelkedett expresszióját találták [98]. Ennek következtében, a PARP2^{-/-} egerek vázizomzatában megnőtt a DHT szintje, anélkül, hogy a DHT szisztémás szintje megváltozott volna [98]. Valamint, a PARP2 része az androgén receptor jelátviteli útvonalának a prosztatában [121]. Jelen eredményeinkkel demonstráljuk, hogy a PARP2 genetikai deléciója vagy depléciója által eredményezett védőhatás pikkelysömör-szerű gyulladásal szemben az epidermális keratinociták aromatáz funkciójától és az ösztradiol bioszintézisétől, valamint az NF- κ B aktiváció ösztadiol által közvetített gátlásától függ (26. ábra).



26. ábra. Eredményeink összefoglalása a PARP1 és a PARP2 szerepéről psoriasisban

Eredményeink alapján a PARP1 és a PARP2 eltérő mechanizmusok szabályozásában vesz részt a pikkelysömörös gyulladásban. A PARP-gátlás leírt hatásai a keratinocitákban a TRPV1 aktivitásának függvénye volt. A PARP2 expresszió és az epidermális keratinociták ösztrogén szintézise között összefüggés lehet, mely hozzájárulhat a lokális gyulladásos folyamatok szabályozásához.

Rövidítések: TRPV1 (transziens receptor potenciál vanilloid 1), NF- κ B (nukleáris faktor-kappa B)

Az ösztrogének terápiás potenciálja már felmerült pikkelysömörben, de egy hosszú távú, szisztémás ösztrogén terápia kedvezőtlen mellékhatásokkal járhat, és így szisztémás ösztrogén kezelést még nem kíséreltek meg pikkelysömörben [240, 241]. Eredményeink alapján javasoljuk a keratinociták saját ösztrogén bioszintézisének fokozását a PARP2 gátlása útján, mint egy lehetséges új megközelítést a psoriasis terápiájának.

Az ösztrogéneknek komplex szerepe van az immunmodulációban. Bár a pikkelysömör általában javulni szokott terhességkor, és romlik a menopauza idején, a betegek kisebb része a tünetek súlyosbodását tapasztalta terhesség alatt [242]. Az ösztrogének pozitív hatása a pikkelysömörre az ösztrogéneknek azzal a látszólagos képességével magyarázható, hogy eltolódást tudnak létrehozni Th1/Th17 típusú immunitás felől Th2-mediált immunitás irányába [241]. Mindazonáltal, az ösztrogén receptorok (ER) aktivitása jelentős függést mutat az ösztrogén dózistól és a modell rendszertől, amiben tanulmányozták, és ennél fogva az ER aktiváció az alkalmazott ösztrogén koncentrációjától függően a pro-inflammatorikus citokin termelés növekedését vagy csökkenését is eredményezheti [243]. Az NF- κ B aktiváció hatékony gátlásához, és ezáltal gyulladáscsökkentő hatás eléréséhez szükséges minimális ösztradiol koncentráció egy tanulmány szerint a 10^{-10} M tartományban van [244], ami megközelítőleg megfelel annak a koncentrációnak, amelyet az sc és shP2 HPV-Ker sejtek felülűszóiban mértünk. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a bőr ösztradiol szintjének kismértékű növekedése is elegendő lehet a gyulladáscsökkentő mechanizmusok beindításához, mint ahogy a PARP2-csendesített keratinocitákban láttuk. Valószínű azonban, hogy a bőr ösztradiol szintjében jelentős intra- és interperszonális eltérések lehetnek, így az ösztrogének lehetséges terápiás koncentrációjának megállapítása pikkelysömörben további vizsgálatokat igényel. Érdekes adat, hogy az EAE modellben, ahol ugyancsak a PARP2 deléciónak kedvező hatását írták le, több tanulmány is beszámol az ösztrogének hasonló idegrendszeri anti-inflammatorikus hatásáról [245-247], ami jól illeszkedik a mi adatainkhoz. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a pikkelysömör progressziója során Th1 és Th17 eredetű citokinek (mint például a TNF α és IL17A) indukálhatják a PARP2-t a keratinocitákban, amely azután gátolhatja az aromatáz aktivitást és az ösztrogén szintézist, és ezzel hozzájárul az NF- κ B aktiválódásához. Azonban, egy ilyen szabályozási kaskád mechanikus részleteinek meghatározása további vizsgálatok tárgyát kell képezze.

Jelenleg a legsikeresebb terápiák a pikkelysömör ellen a biológiai ágensek, amelyek az IL17A-t vagy a TNF α -t célozzák, azonban a biológiai terápiáknak számos kockázata lehet a betegekre nézve, ezért folyamatos az igény a jobban tolerálható megoldások iránt [16]. Ma már több PARP inhibitor használnak klinikai gyakorlatban, szisztémás alkalmazás mellett egyes

tumorok terápiájában. Ezek közé tartoznak az FDA által jóváhagyott veliparib (Abbvie), rucaparib (Pfizer/Clovis), olaparib (KuDOS/AstraZeneca), niraparib (Merck/Tesaro), talazoparib (Lead/Biomarin/Medivation/Pfizer), valamint a kínai NMPA által engedélyezett fluzoparib és pamibarib [114, 122, 123]. Ezek ún. pan-PARP inhibitorok, amelyek egyaránt célozzák a PARP1-et, a PARP2-t és valószínűleg még más PARP izoformákat is. Ezért a PARP2 szelektív célzása nem hajtható végre a jelenleg alkalmazott PARP inhibitorokkal. Azonban jelen eredményeinkkel megmutatjuk, hogy a pan-PARP inhibitor talazoparib ugyanúgy képes a keratinociták ösztadiol termelését fokozni, mint a PARP2 csendesítése vagy specifikus gátlása UPF1069-cel. Azt figyelembe véve, hogy eredményeink alapján a PARP2 hiányának kedvező hatása pikkelysömörben valószínűleg a keratinociták megnövekedett ösztadiol szintézisének következménye, adataink felvetik a PARP inhibitorok használatának lehetőségét a pikkelysömör kezelésében. Természetesen, a PARP inhibitorok ilyen irányú alkalmazhatóságát későbbi tanulmányok során kell megvizsgálni és értékelni.

Összefoglalva, egy eddig ismeretlen mechanizmust találtunk, amellyel a PARP2 részt vehet a gyulladásos folyamatok szabályozásában, és egyúttal azonosítottunk egy potenciális terápiás targetet pikkelysömörben. Tanulmányunk elősegítheti a PARP2-specifikus inhibitorok fejlesztésére tett erőfeszítéseket, és javasoljuk további vizsgálatok elvégzését a PARP2 gyulladásban és immunszabályozásban betöltött pontos szerepének tisztázásának érdekében.

VII. Összefoglalás

A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimes család tagjaiként a PARP1 és a PARP2 a sejtek PARP-aktivitásának többségéért felelős, és aktivitásukat először a DNS hibajavítása során írták le. Az elmúlt évtizedek kutatásai azonban a PARP1 és PARP2 olyan változatos biológiai funkcióit azonosították, mint a sejthalál, sejt differenciáció, a lipid homeosztázis, a sejtenergetika és a gyulladás szabályozása. PARP aktivációt leírtak számos Th2-mediált gyulladásos folyamatban, de a vizsgálatok főként a PARP1 szerepére koncentráltak, míg a PARP2 gyulladásban betöltött szerepéről kevés információval rendelkezünk. Munkánk során ezúttal egy Th17-mediált gyulladásos bőrbetegségben, a pikkelysömörben vizsgáltuk meg a PARP1 és PARP2 szerepét.

Elsőként társszerzőink segítségével megállapítottuk, hogy az eddigi ismereteinkkel szemben, a PARP1 egy gyulladáscsökkentő faktor lehet pikkelysömörben, mivel a betegség imikimod által indukált egér modelljében a PARP1 genetikai delécióna a tünetek súlyosbodását eredményezte. Humán mintákban megmutattuk, hogy a PARP1 expressziója csökken a pikkelysömörös léziókban a kontroll egyének bőrmintáihoz képest. Az imikimoddal kezelt HPV-Ker keratinocitákban a PARP gátlás az *in vivo* eredményekkel összhangban fokozta a keratinociták proliferációját, valamint egyes pro-inflammatorikus citokinek expressziójának indukcióját. Valamint azt is megmutattuk, hogy a PARP-gátlás előbbi hatásai a keratinocitákban a TRPV1 aktivitásának függvénye volt. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy a PARP1 szerepe eltérő lehet a Th17 típusú gyulladás szabályozásában attól, amit a Th2 típusú folyamatokban láthattuk. Ezzel szemben, a PARP2 mRNS expressziójának növekedését találtuk pikkelysömörös betegek léziós bőrében, valamint a PARP2 delécióna hatására enyhültek az imikimod által indukált psoriasis tünetei egerekben. A PARP2 csendesítése humán keratinocitákban megakadályozta proliferációjuk fokozódását, megtartotta terminális differenciálódásukat és csökkentette a gyulladásos mediátorok termelését az IL17A és TNF α kombinációjával történő kezelést követően. Ezen megfigyelések háttérében azt találtuk, hogy a PARP2^{-/-} egerek epidermiszében és a PARP2-hiányos humán keratinocitákban az aromatáz expresszió indukálódott, és az ebből eredő emelkedett ösztadiol termelés gátolta az NF- κ B aktivációt, és ezáltal a gyulladást a keratinocitákban. Szteroidogén változásokat leírtak már pikkelysömörben, mi ezeket a megfigyeléseket egészítjük ki azzal, hogy megmutatjuk az aromatáz expressziójának csökkenését is pikkelysömörös léziókban. Összefoglalva, adataink a PARP2-t az epidermális keratinociták ösztrogén bioszintézisének modulátoraként azonosítják, amely releváns lehet a Th17 típusú gyulladásban.

VIII. Summary

As a members of the poly(ADP-ribose) polymerase enzyme family, PARP1 and PARP2 are primarily responsible for the majority of cellular PARP activity, and their activity was first described during DNA damage repair. However, research over the past decades has revealed diverse biological functions of PARP1 and PARP2, including roles in cell death, cell differentiation, lipid homeostasis, cellular energetics, and inflammation regulation. PARP activation has been described in numerous Th2-mediated inflammatory processes, but investigations have mainly focused on the role of PARP1, with limited information about the role of PARP2 in inflammation. In our work, we examined the roles of PARP1 and PARP2 in a Th17-mediated inflammatory skin disease, psoriasis.

Firstly, with the help of our co-authors, we found that contrary to our current knowledge, PARP1 could unexpectedly act as an anti-inflammatory factor in psoriasis, as genetic deletion of PARP1 worsened symptoms in a mouse model of imiquimod-induced psoriasis. In human samples, we demonstrated that PARP1 expression decreases in psoriatic lesions compared to skin samples from control individuals. In HPV-Ker keratinocytes treated with imiquimod, PARP inhibition increased keratinocyte proliferation and induced the expression of certain pro-inflammatory cytokines in line with *in vivo* results. Furthermore, we showed that the former effects of PARP inhibition in keratinocytes were dependent on TRPV1 activity. Based on these findings, we can conclude that the role of PARP1 in regulating Th17 type inflammation might differ from what we observed in Th2 type processes.

In contrast, we observed an increase in PARP2 mRNA expression in lesional skin of psoriasis patients and the deletion of PARP2 attenuated the imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice. Silencing PARP2 in human keratinocytes prevented the increased proliferation, maintained their terminal differentiation, and reduced the production of inflammatory mediators following treatment with IL17A and TNF α . Behind these observations, we found that aromatase expression was induced in PARP2^{-/-} mouse epidermis and PARP2 deficient human keratinocytes, leading to elevated estradiol production that inhibited NF- κ B activation and thereby inflammation in keratinocytes. Steroidogenic changes have been described in psoriasis before, and our observations complement these findings by demonstrating a decrease in aromatase expression in psoriatic lesions.

In summary, our data identify PARP2 as a modulator of estrogen biosynthesis in epidermal keratinocytes, that may be relevant in Th17 type inflammation.

IX. Irodalomjegyzék

1. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3046-82.
2. Szántó, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA-repair protein*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(24): p. 4079-92.
3. Bai, P., *Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 947-58.
4. Datta, R., et al., *PARP-1 deficiency blocks IL-5 expression through calpain-dependent degradation of STAT-6 in a murine asthma model*. Allergy, 2011. **66**(7): p. 853-61.
5. Oumouna, M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition prevents eosinophil recruitment by modulating Th2 cytokines in a murine model of allergic airway inflammation: a potential specific effect on IL-5*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6489-96.
6. Havranek, T., et al., *Increased poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 expression and activity are associated with inflammation but not goblet cell metaplasia in murine models of allergen-induced airway inflammation*. Exp Lung Res, 2010. **36**(7): p. 381-9.
7. Mota, R.A., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates the severity of acute pancreatitis and associated lung injury*. Lab Invest, 2005. **85**(10): p. 1250-62.
8. Zingarelli, B., et al., *Activator protein-1 signalling pathway and apoptosis are modulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in experimental colitis*. Immunology, 2004. **113**(4): p. 509-17.
9. Bai, P., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase mediates inflammation in a mouse model of contact hypersensitivity*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 234-8.
10. Brunyánszki, A., et al., *Genetic ablation of PARP-1 protects against oxazolone-induced contact hypersensitivity by modulating oxidative stress*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(11): p. 2629-37.
11. Szabó, E., et al., *Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(1): p. 74-80.
12. Pazzaglia, S. and C. Pioli, *Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases*. Cells, 2019. **9**(1).

13. Yamanaka, K., O. Yamamoto, and T. Honda, *Pathophysiology of psoriasis: A review*. J Dermatol, 2021. **48**(6): p. 722-731.
14. Chiu, H.-Y., Y.-P. Cheng, and T.-F. Tsai, *T helper type 17 in psoriasis: From basic immunology to clinical practice*. Dermatologica Sinica, 2012. **30**(4): p. 136-141.
15. Ni, X. and Y. Lai, *Keratinocyte: A trigger or an executor of psoriasis?* J Leukoc Biol, 2020. **108**(2): p. 485-491.
16. Kamata, M. and Y. Tada, *Efficacy and Safety of Biologics for Psoriasis and Psoriatic Arthritis and Their Impact on Comorbidities: A Literature Review*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(5).
17. Avci, P., et al., *Animal models of skin disease for drug discovery*. Expert Opin Drug Discov, 2013. **8**(3): p. 331-55.
18. Schön, M.P., *Animal models of psoriasis: a critical appraisal*. Exp Dermatol, 2008. **17**(8): p. 703-12.
19. Géhl, Z., et al., *Poly(ADP-ribose) in the skin and in melanomas*. Histol Histopathol, 2012. **27**(5): p. 651-9.
20. Krishnakumar, R. and W.L. Kraus, *The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets*. Mol Cell, 2010. **39**(1): p. 8-24.
21. Chambon, P., J.D. Weill, and P. Mandel, *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 1963. **11**: p. 39-43.
22. Shimizu, Y., et al., *Solubilization of enzyme forming ADPR polymer from NAD*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1967. **29**(1): p. 80-83.
23. Shieh, W.M., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30069-72.
24. Ame, J.C., C. Spenlehauer, and G. de Murcia, *The PARP superfamily*. Bioessays, 2004. **26**(8): p. 882-93.
25. Hottiger, M.O., et al., *Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(4): p. 208-19.
26. Marsischky, G.T., B.A. Wilson, and R.J. Collier, *Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 3247-54.
27. Palazzo, L., et al., *ADP-ribosylation signalling and human disease*. Open Biol, 2019. **9**(4): p. 190041.

28. Steffen, J.D., et al., *Structural Implications for Selective Targeting of PARPs*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 301.
29. Vyas, S., et al., *Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4426.
30. Gupte, R., Z. Liu, and W.L. Kraus, *PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes*. Genes Dev, 2017. **31**(2): p. 101-126.
31. Yang, C.S., et al., *Ubiquitin Modification by the E3 Ligase/ADP-Ribosyltransferase Dtx3L/Parp9*. Mol Cell, 2017. **66**(4): p. 503-516 e5.
32. Bock, F.J. and P. Chang, *Identifying Target RNAs of PARPs*. Methods Mol Biol, 2018. **1813**: p. 327-341.
33. Barkauskaite, E., G. Jankevicius, and I. Ahel, *Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation*. Mol Cell, 2015. **58**(6): p. 935-46.
34. Martí, J.M., et al., *The Multifactorial Role of PARP-1 in Tumor Microenvironment*. Cancers (Basel), 2020. **12**(3).
35. Hassa, P.O., et al., *Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?* Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(3): p. 789-829.
36. Leon, O. and M. Roth, *Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions*. Biol Res, 2000. **33**(1): p. 21-30.
37. Rack, J.G., D. Perina, and I. Ahel, *Macrodomains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities*. Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 431-54.
38. Li, P., et al., *Functional roles of ADP-ribosylation writers, readers and erasers*. Front Cell Dev Biol, 2022. **10**: p. 941356.
39. Gibson, B.A. and W.L. Kraus, *New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(7): p. 411-24.
40. Li, N. and J. Chen, *ADP-ribosylation: activation, recognition, and removal*. Mol Cells, 2014. **37**(1): p. 9-16.
41. Richard, I.A., et al., *Beyond PARP1: The Potential of Other Members of the Poly (ADP-Ribose) Polymerase Family in DNA Repair and Cancer Therapeutics*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 801200.
42. Hottiger, M.O., *Nuclear ADP-Ribosylation and Its Role in Chromatin Plasticity, Cell Differentiation, and Epigenetics*. Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 227-63.

43. Ke, Y., et al., *Novel insights into PARPs in gene expression: regulation of RNA metabolism*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(17): p. 3283-3299.
44. Zhen, Y. and Y. Yu, *Proteomic Analysis of the Downstream Signaling Network of PARP1*. Biochemistry, 2018. **57**(4): p. 429-440.
45. Nizi, M.G., et al., *Medicinal Chemistry Perspective on Targeting Mono-ADP-Ribosylating PARPs with Small Molecules*. J Med Chem, 2022. **65**(11): p. 7532-7560.
46. Kukolj, E., et al., *PARP inhibition causes premature loss of cohesion in cancer cells*. Oncotarget, 2017. **8**(61): p. 103931-103951.
47. Hoch, N.C. and L.M. Polo, *ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease*. Genet Mol Biol, 2019. **43**(1 suppl 1): p. e20190075.
48. Nguewa, P.A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications*. Prog Biophys Mol Biol, 2005. **88**(1): p. 143-72.
49. Ishiwata-Endo, H., et al., *ARH1 in Health and Disease*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
50. Gros Lambert, J., E. Prokhorova, and I. Ahel, *ADP-ribosylation of DNA and RNA*. DNA Repair (Amst), 2021. **105**: p. 103144.
51. van der Heden van Noort, G.J., *Chemical Tools to Study Protein ADP-Ribosylation*. ACS Omega, 2020. **5**(4): p. 1743-1751.
52. Morales, J., et al., *Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2014. **24**(1): p. 15-28.
53. Reber, J.M. and A. Mangerich, *Why structure and chain length matter: on the biological significance underlying the structural heterogeneity of poly(ADP-ribose)*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(15): p. 8432-8448.
54. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(9): p. 1534-53.
55. Hassa, P.O., et al., *Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-I*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45145-53.
56. Nakajima, H., et al., *Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42774-86.

57. Zong, W., et al., *PARP1: Liaison of Chromatin Remodeling and Transcription*. Cancers (Basel), 2022. **14**(17):4162.
58. Kamaletdinova, T., Z. Fanaei-Kahrani, and Z.Q. Wang, *The Enigmatic Function of PARP1: From PARylation Activity to PAR Readers*. Cells, 2019. **8**(12):1625.
59. Li, R., et al., *Biological function, mediate cell death pathway and their potential regulated mechanisms for post-mortem muscle tenderization of PARP1: A review*. Front Nutr, 2022. **9**: p. 1093939.
60. Li, W.H., et al., *PARP-1: a critical regulator in radioprotection and radiotherapy-mechanisms, challenges, and therapeutic opportunities*. Front Pharmacol, 2023. **14**: p. 1198948.
61. Eleazer, R. and Y.N. Fondufe-Mittendorf, *The multifaceted role of PARP1 in RNA biogenesis*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2021. **12**(2): p. e1617.
62. Chaitanya, G.V., A.J. Steven, and P.P. Babu, *PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration*. Cell Commun Signal, 2010. **8**: p. 31.
63. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517-28.
64. Caldecott, K.W., et al., *XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(22): p. 4387-94.
65. D'Amours, D., et al., *Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J, 1999. **342** (Pt 2)(Pt 2): p. 249-68.
66. Satoh, M.S. and T. Lindahl, *Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 356-8.
67. Pascal, J.M., *The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage*. DNA Repair (Amst), 2018. **71**: p. 177-182.
68. Kauppinen, T.M. and R.A. Swanson, *The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease*. Neuroscience, 2007. **145**(4): p. 1267-1272.
69. Koh, D.W., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Poly-ADP-ribosylation in health and disease*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2005. **62**(7): p. 760-768.
70. de la Lastra, C.A., I. Villegas, and S. Sánchez-Fidalgo, *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: new pharmacological functions and potential clinical implications*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(9): p. 933-62.

71. Hamby, A.M., et al., *Use of a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion*. Stroke, 2007. **38**(2 Suppl): p. 632-6.
72. Tóth-Zsámboki, E., et al., *Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes*. Mol Med, 2006. **12**(9-10): p. 221-8.
73. García, S., et al., *Partial protection against collagen antibody-induced arthritis in PARP-1 deficient mice*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(1): p. R14.
74. Xu, S., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in atherosclerosis: from molecular mechanisms to therapeutic implications*. Med Res Rev, 2014. **34**(3): p. 644-75.
75. Aguilar-Quesada, R., et al., *Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation*. Curr Med Chem, 2007. **14**(11): p. 1179-87.
76. Oliver, F.J., et al., *Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice*. Embo j, 1999. **18**(16): p. 4446-54.
77. Sambucci, M., et al., *Effects of PARP-1 deficiency on Th1 and Th2 cell differentiation*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 375024.
78. Saenz, L., et al., *Transcriptional regulation by poly(ADP-ribose) polymerase-1 during T cell activation*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 171.
79. Nasta, F., et al., *Increased Foxp3+ regulatory T cells in poly(ADP-Ribose) polymerase-1 deficiency*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3470-7.
80. Aldinucci, A., et al., *A key role for poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity during human dendritic cell maturation*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 305-12.
81. Swindall, A.F., J.A. Stanley, and E.S. Yang, *PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis?* Cancers (Basel), 2013. **5**(3): p. 943-58.
82. Ali, S.O., et al., *Understanding specific functions of PARP-2: new lessons for cancer therapy*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(9): p. 1842-1863.
83. Yelamos, J., et al., *PARP-1 and PARP-2: New players in tumour development*. Am J Cancer Res, 2011. **1**(3): p. 328-346.
84. Ray Chaudhuri, A. and A. Nussenzweig, *The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(10): p. 610-621.

85. Dantzer, F., et al., *Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(4): p. 1595-607.
86. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 23028-36.
87. Schreiber, V., et al., *PARP-2: Structure-Function Relationship*, in *Poly(ADP-Ribosyl)ation*, A. Bürkle, Editor. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 13-31.
88. Zuo, X., H. Zhao, and D. Li, *Systematic inhibitor selectivity between PARP1 and PARP2 enzymes: Molecular implications for ovarian cancer personalized therapy*. J Mol Recognit, 2021. **34**(7): p. e2891.
89. Yélamos, J., et al., *PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes*. Embo j, 2006. **25**(18): p. 4350-60.
90. Farrés, J., et al., *PARP-2 sustains erythropoiesis in mice by limiting replicative stress in erythroid progenitors*. Cell Death Differ, 2015. **22**(7): p. 1144-57.
91. Bai, P., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 [corrected] controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma [corrected] heterodimer*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37738-46.
92. Dantzer, F., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(40): p. 14854-9.
93. Bock, F.J. and P. Chang, *New directions in poly(ADP-ribose) polymerase biology*. Febs j, 2016. **283**(22): p. 4017-4031.
94. Navarro, J., et al., *PARP-1/PARP-2 double deficiency in mouse T cells results in faulty immune responses and T lymphomas*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41962.
95. Galindo-Campos, M.A., et al., *Coordinated signals from the DNA repair enzymes PARP-1 and PARP-2 promotes B-cell development and function*. Cell Death Differ, 2019. **26**(12): p. 2667-2681.
96. Bai, P., et al., *PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure*. Cell Metab, 2011. **13**(4): p. 450-460.
97. Szántó, M., et al., *Deletion of PARP-2 induces hepatic cholesterol accumulation and decrease in HDL levels*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(4): p. 594-602.

98. Márton, J., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is a lipid-modulated modulator of muscular lipid homeostasis*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2018. **1863**(11): p. 1399-1412.
99. Bardot, O., et al., *PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192**(1): p. 37-45.
100. Horváth, E.M., et al., *Treatment with insulin inhibits poly(ADP-ribose)polymerase activation in a rat model of endotoxemia*. Life Sci, 2008. **82**(3-4): p. 205-9.
101. Mabley, J.G., et al., *Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(2): p. 812-20.
102. Jog, N.R. and R. Caricchio, *Differential regulation of cell death programs in males and females by Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 and 17 β estradiol*. Cell Death Dis, 2013. **4**(8): p. e758.
103. Joshi, A., et al., *PARP1 during embryo implantation and its upregulation by oestradiol in mice*. Reproduction, 2014. **147**(6): p. 765-80.
104. Shimizu, T., et al., *Androgen and PARP-1 regulation of TRPM2 channels after ischemic injury*. J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(10): p. 1549-55.
105. Ghabreau, L., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1, a novel partner of progesterone receptors in endometrial cancer and its precursors*. Int J Cancer, 2004. **109**(3): p. 317-21.
106. Szántó, M. and P. Bai, *The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism*. Genes Dev, 2020. **34**(5-6): p. 321-340.
107. Ke, Y., et al., *The Role of PARPs in Inflammation-and Metabolic-Related Diseases: Molecular Mechanisms and Beyond*. Cells, 2019. **8**(9).
108. Popoff, I., et al., *Antisense oligonucleotides to poly(ADP-ribose) polymerase-2 ameliorate colitis in interleukin-10-deficient mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(3): p. 1145-54.
109. Jijon, H.B., et al., *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(3): p. G641-51.
110. Rosado, M.M., et al., *Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings*. Immunology, 2013. **139**(4): p. 428-37.

111. Madariaga, A., et al., *Manage wisely: poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor (PARPi) treatment and adverse events*. Int J Gynecol Cancer, 2020. **30**(7): p. 903-915.
112. Shall, S., *Proceedings: Experimental manipulation of the specific activity of poly(ADP-ribose) polymerase*. J Biochem, 1975. **77**(1?): p. 2p.
113. Purnell, M.R. and W.J. Whish, *Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase*. Biochem J, 1980. **185**(3): p. 775-7.
114. Lord, C.J. and A. Ashworth, *PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic*. Science, 2017. **355**(6330): p. 1152-1158.
115. Mateo, J., et al., *A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective*. Ann Oncol, 2019. **30**(9): p. 1437-1447.
116. Langelier, M.F., et al., *Clinical PARP inhibitors allosterically induce PARP2 retention on DNA*. Sci Adv, 2023. **9**(12): p. eadf7175.
117. Cseh, A.M., et al., *PARP Inhibitor PJ34 Protects Mitochondria and Induces DNA-Damage Mediated Apoptosis in Combination With Cisplatin or Temozolomide in B16F10 Melanoma Cells*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 538.
118. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-917.
119. Farmer, H., et al., *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 917-921.
120. Curtin, N.J. and C. Szabo, *Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(6): p. 1217-56.
121. Gui, B., et al., *Selective targeting of PARP-2 inhibits androgen receptor signaling and prostate cancer growth through disruption of FOXA1 function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(29): p. 14573-14582.
122. Lee, A., *Fuzuloparib: First Approval*. Drugs, 2021. **81**(10): p. 1221-1226.
123. Markham, A., *Pamiparib: First Approval*. Drugs, 2021. **81**(11): p. 1343-1348.
124. Berger, N.A., et al., *Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases*. Br J Pharmacol, 2018. **175**(2): p. 192-222.
125. Zhang, R.L., et al., *A rat model of focal embolic cerebral ischemia*. Brain Res, 1997. **766**(1-2): p. 83-92.
126. Eliasson, M.J.L., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia*. Nature Medicine, 1997. **3**(10): p. 1089-1095.

127. Zingarelli, B., et al., *Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase*. Cardiovascular Research, 1997. **36**(2): p. 205-215.
128. Pacher, P. and C. Szabo, *Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease*. Am J Pathol, 2008. **173**(1): p. 2-13.
129. Cohen-Armon, M., et al., *DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation*. Mol Cell, 2007. **25**(2): p. 297-308.
130. Wong, R., et al., *The dynamic anatomy and patterning of skin*. Exp Dermatol, 2016. **25**(2): p. 92-8.
131. Vidal Yucha, S.E., K.A. Tamamoto, and D.L. Kaplan, *The importance of the neuro-immuno-cutaneous system on human skin equivalent design*. Cell Prolif, 2019. **52**(6): p. e12677.
132. Nguyen, A.V. and A.M. Soulika, *The Dynamics of the Skin's Immune System*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).
133. Knox, S. and N.M. O'Boyle, *Skin lipids in health and disease: A review*. Chem Phys Lipids, 2021. **236**: p. 105055.
134. Khavkin, J. and D.A. Ellis, *Aging skin: histology, physiology, and pathology*. Facial Plast Surg Clin North Am, 2011. **19**(2): p. 229-34.
135. Rapp, S.R., et al., *Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases*. J Am Acad Dermatol, 1999. **41**(3 Pt 1): p. 401-7.
136. Dubertret, L., et al., *European patient perspectives on the impact of psoriasis: the EUROPSO patient membership survey*. Br J Dermatol, 2006. **155**(4): p. 729-36.
137. World Health, O., *Global report on psoriasis*. 2016, Geneva: World Health Organization.
138. Augustin, M., et al., *Epidemiology and comorbidity of psoriasis in children*. Br J Dermatol, 2010. **162**(3): p. 633-6.
139. Schön, M.P. and W.H. Boehncke, *Psoriasis*. N Engl J Med, 2005. **352**(18): p. 1899-912.
140. Balato, N., et al., *Effect of weather and environmental factors on the clinical course of psoriasis*. Occup Environ Med, 2013. **70**(8): p. 600.
141. Bu, J., et al., *Epidemiology of Psoriasis and Comorbid Diseases: A Narrative Review*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 880201.
142. Oliveira Mde, F., O. Rocha Bde, and G.V. Duarte, *Psoriasis: classical and emerging comorbidities*. An Bras Dermatol, 2015. **90**(1): p. 9-20.

143. Boehncke, W.H. and M.P. Schön, *Psoriasis*. Lancet, 2015. **386**(9997): p. 983-94.
144. Nedoszytko, B., et al., *Pathogenesis of psoriasis in the "omic" era. Part II. Genetic, genomic and epigenetic changes in psoriasis*. Postepy Dermatol Alergol, 2020. **37**(3): p. 283-298.
145. Diani, M., G. Altomare, and E. Reali, *T cell responses in psoriasis and psoriatic arthritis*. Autoimmun Rev, 2015. **14**(4): p. 286-92.
146. Bronckers, I.M., et al., *Psoriasis in Children and Adolescents: Diagnosis, Management and Comorbidities*. Paediatr Drugs, 2015. **17**(5): p. 373-84.
147. Capon, F., R.C. Trembath, and J.N. Barker, *An update on the genetics of psoriasis*. Dermatol Clin, 2004. **22**(4): p. 339-47, vii.
148. Allen, M.H., et al., *The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(1): p. 103-6.
149. Ogawa, K. and Y. Okada, *The current landscape of psoriasis genetics in 2020*. J Dermatol Sci, 2020. **99**(1): p. 2-8.
150. Hwang, S.T., T. Nijsten, and J.T. Elder, *Recent Highlights in Psoriasis Research*. J Invest Dermatol, 2017. **137**(3): p. 550-556.
151. Grän, F., et al., *Current Developments in the Immunology of Psoriasis*. Yale J Biol Med, 2020. **93**(1): p. 97-110.
152. Tsoi, L.C., et al., *Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity*. Nat Genet, 2012. **44**(12): p. 1341-8.
153. Nair, R.P., et al., *Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 199-204.
154. Ellinghaus, E., et al., *Genome-wide association study identifies a psoriasis susceptibility locus at TRAF3IP2*. Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 991-5.
155. Armstrong, A.W. and C. Read, *Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review*. Jama, 2020. **323**(19): p. 1945-1960.
156. Uppala, R., et al., *"Autoinflammatory psoriasis"-genetics and biology of pustular psoriasis*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(2): p. 307-317.
157. Langley, R.G., G.G. Krueger, and C.E. Griffiths, *Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life*. Ann Rheum Dis, 2005. **64 Suppl 2**(Suppl 2): p. ii18-23; discussion ii24-5.
158. Theodorakopoulou, E., et al., *Early- and late-onset psoriasis: a cross-sectional clinical and immunocytochemical investigation*. Br J Dermatol, 2016. **175**(5): p. 1038-1044.
159. Ayala, F., *Clinical presentation of psoriasis*. Reumatismo, 2007. **59 Suppl 1**: p. 40-5.

160. Bocheńska, K., et al., *Models in the Research Process of Psoriasis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
161. Halprin, K.M., *Epidermal "turnover time"--a re-examination*. Br J Dermatol, 1972. **86**(1): p. 14-9.
162. Ogawa, E., et al., *Pathogenesis of psoriasis and development of treatment*. J Dermatol, 2018. **45**(3): p. 264-272.
163. Zhang, X., M. Yin, and L.J. Zhang, *Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis*. Cells, 2019. **8**(8).
164. Iizuka, H., et al., *Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death*. J Dermatol, 2004. **31**(4): p. 271-6.
165. Hammar, H., et al., *Subpopulations of mononuclear cells in microscopic lesions of psoriatic patients. Selective accumulation of suppressor/cytotoxic T cells in epidermis during the evolution of the lesion*. J Invest Dermatol, 1984. **83**(6): p. 416-20.
166. Jiang, M., et al., *Keratinocyte exosomes activate neutrophils and enhance skin inflammation in psoriasis*. Faseb j, 2019. **33**(12): p. 13241-13253.
167. De Rosa, G. and C. Mignogna, *The histopathology of psoriasis*. Reumatismo, 2007. **59 Suppl 1**: p. 46-8.
168. Lowes, M.A., A.M. Bowcock, and J.G. Krueger, *Pathogenesis and therapy of psoriasis*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 866-73.
169. Griffiths, C.E. and J.N. Barker, *Pathogenesis and clinical features of psoriasis*. Lancet, 2007. **370**(9583): p. 263-271.
170. Xia, Y.P., et al., *Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis*. Blood, 2003. **102**(1): p. 161-8.
171. Nickoloff, B.J., J.Z. Qin, and F.O. Nestle, *Immunopathogenesis of psoriasis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2007. **33**(1-2): p. 45-56.
172. Elder, J.T., *Genome-wide association scan yields new insights into the immunopathogenesis of psoriasis*. Genes Immun, 2009. **10**(3): p. 201-9.
173. Elder, J.T., et al., *Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(5): p. 1213-26.
174. Korman, N.J., *Management of psoriasis as a systemic disease: what is the evidence?* Br J Dermatol, 2020. **182**(4): p. 840-848.
175. Strychalski, M.L., H.S. Brown, and S.C. Bishop, *Cytokine Modulators in Plaque Psoriasis - A Review of Current and Prospective Biologic Therapeutic Approaches*. JAAD Int, 2022. **9**: p. 82-91.

176. Zhou, X., et al., *Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective*. Cell Death Dis, 2022. **13**(1): p. 81.
177. Gratton, R., et al., *Unraveling the Role of Sex Hormones on Keratinocyte Functions in Human Inflammatory Skin Diseases*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(6).
178. Lowes, M.A., et al., *The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses*. Trends Immunol, 2013. **34**(4): p. 174-81.
179. Nestle, F.O., D.H. Kaplan, and J. Barker, *Psoriasis*. N Engl J Med, 2009. **361**(5): p. 496-509.
180. Hawkes, J.E., et al., *Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis*. J Immunol, 2018. **201**(6): p. 1605-1613.
181. Griffiths, C.E.M., et al., *Psoriasis*. Lancet, 2021. **397**(10281): p. 1301-1315.
182. Hawkes, J.E., T.C. Chan, and J.G. Krueger, *Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **140**(3): p. 645-653.
183. Wang, Z., et al., *Autophagy-based unconventional secretion of HMGB1 by keratinocytes plays a pivotal role in psoriatic skin inflammation*. Autophagy, 2021. **17**(2): p. 529-552.
184. Li, H., et al., *Epigenetic control of IL-23 expression in keratinocytes is important for chronic skin inflammation*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1420.
185. Furue, M., et al., *Interleukin-17A and Keratinocytes in Psoriasis*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(4).
186. Xu, M., et al., *An Interleukin-25-Mediated Autoregulatory Circuit in Keratinocytes Plays a Pivotal Role in Psoriatic Skin Inflammation*. Immunity, 2018. **48**(4): p. 787-798.e4.
187. Lauffer, F., et al., *IL-17C amplifies epithelial inflammation in human psoriasis and atopic eczema*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2020. **34**(4): p. 800-809.
188. Johnston, A., et al., *Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2252-62.
189. Moos, S., et al., *Imiquimod-Induced Psoriasis in Mice Depends on the IL-17 Signaling of Keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2019. **139**(5): p. 1110-1117.
190. Tsuruta, D., *NF-kappaB links keratinocytes and lymphocytes in the pathogenesis of psoriasis*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2009. **3**(1): p. 40-8.
191. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
192. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.

193. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
194. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
195. Moorchung, N., et al., *Role of NF- κ B in the pathogenesis of psoriasis elucidated by its staining in skin biopsy specimens*. Int J Dermatol, 2014. **53**(5): p. 570-4.
196. Lizzul, P.F., et al., *Differential expression of phosphorylated NF-kappaB/RelA in normal and psoriatic epidermis and downregulation of NF-kappaB in response to treatment with etanercept*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(6): p. 1275-83.
197. Yan, S., et al., *NF- κ B-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7652.
198. Goldminz, A.M., et al., *NF- κ B: an essential transcription factor in psoriasis*. J Dermatol Sci, 2013. **69**(2): p. 89-94.
199. Raychaudhuri, S.K., E. Maverakis, and S.P. Raychaudhuri, *Diagnosis and classification of psoriasis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(4-5): p. 490-5.
200. Mrowietz, U., et al., *Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus*. Arch Dermatol Res, 2011. **303**(1): p. 1-10.
201. Stein Gold, L.F., *Topical Therapies for Psoriasis: Improving Management Strategies and Patient Adherence*. Semin Cutan Med Surg, 2016. **35**(2 Suppl 2): p. S36-44; quiz S45.
202. Tonel, G. and C. Conrad, *Interplay between keratinocytes and immune cells--recent insights into psoriasis pathogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 963-8.
203. Mikhaylov, D., et al., *Systemic Psoriasis Therapies and Comorbid Disease in Patients with Psoriasis: A Review of Potential Risks and Benefits*. J Clin Aesthet Dermatol, 2019. **12**(6): p. 46-54.
204. Hadas, E., et al., *Examples of adverse effects after biological therapy*. Postepy Dermatol Alergol, 2020. **37**(5): p. 712-718.
205. Jeon, C., et al., *Monoclonal antibodies inhibiting IL-12, -23, and -17 for the treatment of psoriasis*. Hum Vaccin Immunother, 2017. **13**(10): p. 2247-2259.
206. Lowe, N.J., et al., *Psoriasiform dermatitis in a rhesus monkey*. J Invest Dermatol, 1981. **76**(2): p. 141-3.
207. Jayo, M.J., M.D. Zanolli, and J.M. Jayo, *Psoriatic plaques in Macaca fascicularis*. Vet Pathol, 1988. **25**(4): p. 282-5.

208. Nakajima, K. and S. Sano, *Mouse models of psoriasis and their relevance*. J Dermatol, 2018. **45**(3): p. 252-263.
209. Pearson, C.M., *EXPERIMENTAL JOINT DISEASE OBSERVATIONS ON ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS*. J Chronic Dis, 1963. **16**: p. 863-74.
210. Pearson, C.M. and F.D. Wood, *Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant. VII. Pathologic details of the arthritis and spondylitis*. Am J Pathol, 1963. **42**(1): p. 73-95.
211. Gangwar, R.S., J.E. Gudjonsson, and N.L. Ward, *Mouse Models of Psoriasis: A Comprehensive Review*. J Invest Dermatol, 2022. **142**(3 Pt B): p. 884-897.
212. Wu, J.K., G. Siller, and G. Strutton, *Psoriasis induced by topical imiquimod*. Australas J Dermatol, 2004. **45**(1): p. 47-50.
213. Geisse, J.K., et al., *Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: a double-blind, randomized, vehicle-controlled study*. J Am Acad Dermatol, 2002. **47**(3): p. 390-8.
214. van der Fits, L., et al., *Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5836-45.
215. Singh, T.P., et al., *IL-23- and Imiquimod-Induced Models of Experimental Psoriasis in Mice*. Curr Protoc Immunol, 2019. **125**(1): p. e71.
216. Chuang, S.Y., et al., *Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery*. Expert Opin Drug Discov, 2018. **13**(6): p. 551-562.
217. Ménissier de Murcia, J., et al., *Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse*. Embo j, 2003. **22**(9): p. 2255-63.
218. Lamprecht, M.R., D.M. Sabatini, and A.E. Carpenter, *CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis*. Biotechniques, 2007. **42**(1): p. 71-5.
219. Li, B., et al., *Transcriptome analysis of psoriasis in a large case-control sample: RNA-seq provides insights into disease mechanisms*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(7): p. 1828-1838.
220. Kemény, Á., et al., *TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(8): p. 1774-1784.
221. Gouin, O., et al., *Major Role for TRPV1 and InsP3R in PAR2-Elicited Inflammatory Mediator Production in Differentiated Human Keratinocytes*. Journal of Investigative Dermatology, 2018. **138**(7): p. 1564-1572.

222. Zhou, Y., et al., *TRPV1 mediates inflammation and hyperplasia in imiquimod (IMQ)-induced psoriasiform dermatitis (PsD) in mice*. J Dermatol Sci, 2018. **92**(3): p. 264-271.
223. Bhawe, G., et al., *Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12480-5.
224. Premkumar, L.S. and G.P. Ahern, *Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 985-90.
225. Hegedus, C., et al., *Protein kinase C protects from DNA damage-induced necrotic cell death by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1672-8.
226. Chiricozzi, A., et al., *Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(3): p. 677-87.
227. Shen, F., et al., *Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24138-48.
228. Li, H., et al., *IL-1 α , IL-6, and GM-CSF Are Downstream Mediators of IL-17A that Promote Asymmetric Stem Cell Self-Renewal in Human Keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2021. **141**(2): p. 458-462.e3.
229. Murphy, A.J., P.M. Guyre, and P.A. Pioli, *Estradiol suppresses NF-kappa B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5029-37.
230. Sun, W.H., et al., *Estrogen inhibits phorbol ester-induced I kappa B alpha transcription and protein degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(3): p. 691-5.
231. Okamoto, M. and Y. Mizukami, *GPER negatively regulates TNF α -induced IL-6 production in human breast cancer cells via NF- κ B pathway*. Endocr J, 2016. **63**(5): p. 485-93.
232. Vandeghinste, N., et al., *Neutralization of IL-17C Reduces Skin Inflammation in Mouse Models of Psoriasis and Atopic Dermatitis*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(7): p. 1555-1563.
233. Yélamos, J., V. Schreiber, and F. Dantzer, *Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2*. Trends Mol Med, 2008. **14**(4): p. 169-78.
234. Szántó, M., et al., *PARPs in lipid metabolism and related diseases*. Prog Lipid Res, 2021. **84**: p. 101117.

235. Albanesi, C., O. De Pità, and G. Girolomoni, *Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes*. Clin Dermatol, 2007. **25**(6): p. 581-8.
236. Nattkemper, L.A., et al., *The Genetics of Chronic Itch: Gene Expression in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis with Severe Itch*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(6): p. 1311-1317.
237. Xiao, T., et al., *TRPV1: A promising therapeutic target for skin aging and inflammatory skin diseases*. Front Pharmacol, 2023. **14**: p. 1037925.
238. Selvaraj, V., et al., *PARP-1 deficiency increases the severity of disease in a mouse model of multiple sclerosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(38): p. 26070-84.
239. Kamboj, A., et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase 2 contributes to neuroinflammation and neurological dysfunction in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 49.
240. Lin, X. and T. Huang, *Impact of pregnancy and oestrogen on psoriasis and potential therapeutic use of selective oestrogen receptor modulators for psoriasis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2016. **30**(7): p. 1085-91.
241. Danesh, M. and J.E. Murase, *The immunologic effects of estrogen on psoriasis: A comprehensive review*. Int J Womens Dermatol, 2015. **1**(2): p. 104-107.
242. Murase, J.E., et al., *Hormonal effect on psoriasis in pregnancy and post partum*. Arch Dermatol, 2005. **141**(5): p. 601-6.
243. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. Endocr Rev, 2007. **28**(5): p. 521-74.
244. Harnish, D.C., et al., *The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor-kappaB in HepG2 cells*. Endocrinology, 2000. **141**(9): p. 3403-11.
245. Benedek, G., et al., *Estrogen induces multiple regulatory B cell subtypes and promotes M2 microglia and neuroprotection during experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2016. **293**: p. 45-53.
246. Haghmorad, D., et al., *Medium-dose estrogen ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in ovariectomized mice*. J Immunotoxicol, 2016. **13**(6): p. 885-896.
247. Laffont, S., et al., *Estrogen-mediated protection of experimental autoimmune encephalomyelitis: Lessons from the dissection of estrogen receptor-signaling in vivo*. Biomed J, 2015. **38**(3): p. 194-205.

X. Tárgyszavak

Poli(ADP-ribóz) polimeráz-1	Poly(ADP-ribose) polymerase-1
Poli(ADP-ribóz) polimeráz-2	Poly(ADP-ribose) polymerase-2
Pikkelysömör	Psoriasis
Keratinocita	Keratinocyte
Nukleáris faktor-kappa B	Nuclear factor kappa B
Aromatáz	Aromatase
Ösztradiol	Estradiol
Imikimod	Imiquimod
PARP inhibitorok	PARP inhibitors
Gyulladás	Inflammation
T-sejtek	T cells

Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Szántó Magdolnának, aki lehetőséget biztosított PhD munkám elkezdéséhez és megosztotta velem szakmai és elméleti tudását. Köszönöm, hogy iránymutatásával, tanácsaival minden helyzetben rengeteg segítséget nyújtott és emberileg is mellettem állt. Köszönettel tartozom, hogy segítségével szakmailag fejlődhettem és megírhattam doktori disszertációm.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Bay Péternek, hogy munkacsoportjának tagja lehettem és szakmai tanácsaival segítséget nyújtott kutatásunkhoz.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Virág László intézeigazgatónak, hogy az Orvosi Vegytani Intézetben végezhettem PhD munkám.

Munkacsoportunk minden korábbi és jelenlegi tagjának szeretném megköszönni, hogy a laborban bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzájuk, mindig jó tanácsokkal láttak el. Gyakorlati útmutatásukért és segítségükért külön hálás vagyok Dr. Sipos Adriennek és Dr. Nagy Lilla Nikolettnek. Köszönettel tartozom Dr. Jankó Laurának és Dr. Máténé Dr. Sári Zsanettnek, akik nem csak szakmai tudásukat osztották meg velem, de barátságukkal is támogattak a munkám során. Hálásan köszönöm Dr. Matolay Orsolyának, hogy idejét áldozta arra, hogy segítséget nyújtson nekünk a metszetek szkennelésével. Továbbá technikai segítségéért köszönetet szeretnék mondani Gelenczei-Finta Lászlónak.

Köszönetemet szeretném kifejezeni Prof. Dr. Szegedi Andreának, aki rendelkezésünkre bocsátotta a pikkelysömörös betegek mintáit és szakmai tudásával segítette kutatásunkat.

Legnagyobb hálával és köszönettel szüleimnek tartozom, akik minden helyzetben mellettem álltak, bíztattak és hittek bennem. Köszönöm a családom összes tagjának, hogy szeretetükkel támogattak. Külön köszönöm férjemnek, Nagy Gábornak, aki türelmesen, támogatott.

A tanulmány alapjául szolgáló kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (FK134588) támogatta.

Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/365/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Antal Dóra
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10071151

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Antal, D.**, Pór, Á., Kovács, I., Dull, K., Pólska, S., Ujlaki, G., Demény, M. Á., Szöllősi, A. G., Kiss, B., Szegedi, A., Bai, P., Szántó, M.: PARP2 promotes inflammation in psoriasis by modulating estradiol biosynthesis in keratinocytes.
J. Mol. Med. (Berl). [Epub ahead of print], 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-023-02338-z>
IF: 4.7 (2022)
2. Kiss, B. K., Szántó, M., Hegedűs, C., **Antal, D.**, Sződényi, A., Márton, J., Méhes, G., Virág, L., Szegedi, A., Bai, P.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 depletion enhances the severity of inflammation in an imiquimod-induced model of psoriasis.
Exp. Dermatol. 29 (1), 79-85, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1111/exd.14061>
IF: 3.96

További közlemények

3. **Antal, D.**, Alimohammadi, S., Bai, P., Szöllősi, A. G., Szántó, M.: Antigen-Presenting Cells in Psoriasis.
Life (Basel). 12 (2), 1-10, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life12020234>
IF: 3.2
4. **Antal, D.**, Janka, E. A., Szabó, J., Szabó, I. L., Szegedi, A., Gáspár, K., Bai, P., Szántó, M.: Culture-based analyses of skin bacteria in lesional moist, and unaffected dry and sebaceous skin regions of hidradenitis suppurativa patients.
J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 36 (9), e731-e733, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.18254>
IF: 9.2





5. Szántó, M., Dózsa, A., **Antal, D.**, Szabó, K., Kemény, L. V., Bai, P.: Targeting the gut-skin axis - Probiotics as new tools for skin disorder management?
Exp. Dermatol. 28 (11), 1210-1218, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.14016>
IF: 3.368

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,428

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,66**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.07.31.



Függelék

A függelék tartalmazza az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatait.