

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Antal Dóra

Témavezető: Dr. Szántó Magdolna



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2023

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Antal Dóra, okleveles népegészségügyi szakember

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Szántó Magdolna, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Miskeiné Dr. Kapitány Anikó, PhD
Dr. Fajka-Boja Roberta, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok:	Dr. Miskeiné Dr. Kapitány Anikó, PhD
	Dr. Fajka-Boja Roberta, PhD
	Dr. Erdélyi Katalin, PhD
	Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2023. november 15, 13:00 óra.

Bevezetés

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 sejtmetabolizmus szabályozása.

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. 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, az allergiás légúti gyulladás, az akut pankreatitisz, a kolitisz, valamint bőrben a kontakt hiperszenzitivitás 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.

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. 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. 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. A psoriasis egér modelljeinek megjelenései hozzájárultak ahhoz, hogy bővüljenek ismereteink a betegség patomechanizmusáról és általa hatékonyabb terápiákat lehessen létrehozni.

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. A PARP1 aktivációját már leírták a bőr több patofiziológiai állapotában, mint a napégés, melanoma, kontakt hiperszenzitivitás. A PARP2 lehetséges szerepéről azonban a bőrben keveset tudunk, viszont a PARP1-gyel ellentétben a PARP2 nem vesz részt a kontakt hiperszenzitivitási reakcióban, 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 psoriasisban.

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 delécióna 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 kultúrás 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 kultúrás kísérletekben a PARP2^{-/-} egerekben kialakuló fenotípus mögött rejlő molekuláris mechanizmusok vizsgálata PARP2 csendesített keratinocita sejtekben.

Anyagok és módszerek

Sejtenyésztés

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 passzázon át tartó folyamatos tenyésztéssel hozták létre a stabil sejtvonalat.

A HPV-Ker sejteket keratinocita szérummentes médiumban (SFM) tenyésztettük, amelyet szarvasmarha hipofízis kivonattal (BPE) (50 µg/ml), humán rekombináns epidermális növekedési faktorral (rEGF) (5 ng/ml), 1% penicillin/streptomocinnal és 1% L-glutamin oldattal egészítettünk 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 egészítettünk ki.

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

Géncsendesítés

A PARP2 géncsendesített HPV-Ker keratinociták (shPARP2) létrehozásához egy előre megtervezett, a PARP2-t célzó rövid hajtú-szerkezetű RNS (shRNS) pLKO.1 vektorba klónozott és lentivírus hordozóba csomagolt partikulumokat használtunk. A negatív kontroll HPV-Ker sejteket (scPARP2) egy nem-célzott shRNS szekvenciát tartalmazó 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.

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 eltelté 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 µg/ml), valamint 1,7 mM Ca^{2+} -nal kiegészített keratinocita-SFM médiummal indítottuk el és 3 nap elteltével állítottuk le. Az IL17A (200 ng/ml) és TNFα (10 ng/ml) kezelést a differenciáló médiumban alkalmaztuk.

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 µM) 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 °C-on 1 óráig inkubáltuk. A sejtek mosását követően SRB oldattal (0,4% (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.

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 sejteken IL17A +TNFα kezelést alkalmaztunk, 6 órán keresztül. 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 x g-n 5 percig. Ezután a sejteket 5 ml jéghideg 70%-os etanollal cseppenként, lassú vortexelés mellett fixáltuk, majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk, és másnap lecentrifugáltuk 10000 x g-n 5 percig. A sejteket 1% BSA-PBS pufferben reszuszpendáltuk, mostuk, majd 100 µg/ml propidium-jodid törzsoldatot adtunk a pufferhez (1 µl/minta), és 20 percig inkubáltuk sötétben. A sejtciklus-elemzést NovoCyte áramlási citométerrel végeztük.

NF- κ B 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 ($5 \mu\text{M}$ -24h) előkezelés elvégzése után IL17A+TNF α együttes kezelést alkalmaztunk, 6 órán keresztül. A sejtekből a fehérjét a Complete Lysis Buffer AM2 segítségével extraháltuk, és a felülúszó fehérjetartalmát Pierce BCA protein assay kit segítségével határoztuk meg. Az NF- κ B p65 alegység aktivációját minden egyes mintából származó $4 \mu\text{g}$ teljes sejtféhrje kivonatban határoztuk meg a TransAM™ NF κ B p65 Chemi Kits segítségével, a gyártó utasításai szerint. A készlethez mellékelt forbol-mirisztát-acetátot (PMA), és kalcium-ionofórral kezelt Jurkat magkivonatot használtuk pozitív kontrollként az NF κ B p65 aktiválására. A lumineszcenciát Spark 10M mikrolemez olvasóval mértük.

A sejtek citokin és ösztradiol koncentrációjának meghatározása

A különböző kezeléseknél kitett HPV-Ker sc és shPARP2 sejtek felülúszóit összegyűjtöttük, és kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitek segítségével határoztuk meg a felülúszók IL6, IL23A, IL17C és ösztradiol 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 ösztradiol 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 ösztradiol 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.

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 ösztradiol (1nM) 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. A sejtmagokat DAPI-val 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 készítettük.

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 a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS-szekvenáláshoz használt RNS-mintákat a Qiagen RNeasy Kitjével izoláltuk a gyártó utasítása szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük és Ambion DNase I-el 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 segítségével.

Az RT-qPCR-reakciókat fluoreszcens jelölésű egyszálú oligonukleotidokkal, azaz TaqMan próbákkal és a TaqMan Gene Expression Master Mix protokoll segítségével végeztük el Light-Cycler 480 Real-Time PCR készülékkel. Belső kontrollként gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtuk.

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 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 expresszálódó gének meghatározására. A CytoScape v3.4 szoftvert a ClueGo v2.3.5. alkalmazással, a túlreprezentált génontológiai (GO) kifejezések azonosítására használtuk. A különbözően expresszálódó 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>.

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 sejtlyzátumokban lévő DNS-fehérje komplexeket szonifikáció 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 segítségével határoztuk meg.

Sejtfractionálás

A citoszolikus és nukleáris fehérjefrakciók elválasztásához a sejteket jéghideg PBS-sel mostuk, összegyűjtöttük és 4 °C-on 3000 × g-n 10 percig centrifugáltuk. A pelleteket 600 µl 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 citoszolos frakciót használtuk. A pelletet 400 µl A pufferrel mostuk, majd ismét tű segítségével tovább lizáltuk. Ezután 4 °C-on $15\,000 \times g$ -n 1 percig centrifugáltuk a pelletet 400 µl 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 segítségével határoztuk meg.

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-merkaptoetanollal kiegészítve 10 percig 100°C-on forraltuk. A fehérje extraktumokat (25-35µg) 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. A jeleket fokozott kemilumineszcens reakcióval vizualizáltuk és ChemiDoc™ Touch gép segítségével rögzítettük. A sávokat denzitometriával számszerűsítettük az Image lab 5.2.1 szoftver segítségével.

Állatkísérletek

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 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 ($365 \times 207 \times 140$ mm, 530 cm² felület; 1284 L Eurostandard II. típus. L, Techniplastól beszerezve) voltak, valamint Lignocel Select Fine 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) minőségű részlegen történt. A kísérleteinkhez csak hím egereket választottunk ki 8-16 hetes korukban, majd a kísérletek során az egereket elkülönítve helyeztük el.

A psoriasis egér modellje - az IMQ által kiváltott dermatitisz

Az IMQ modell létrehozásához az egereket először kezelési csoportokra osztottuk (PARP2^{+/+} CTL n=6 IMQ n=8 EXE+IMQ n=8; PARP2^{-/-} CTL n=5 IMQ n=7 EXE+IMQ n=7). 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 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.

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 tartalmazó PBS-ben homogenizáltuk, 5 mm-es rozsdamentes acélgyöngyök felhasználásával, 30 hertz frekvencián 8 percig TissueLyser II készülék segítségével. Ezt követően Triton X-100-at adtunk a mintákhoz, hogy elérjük az 1%-os végső koncentrációt.

Ezután a mintákat $10000 \times g$ -n 5 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 $300\text{ }\mu\text{g}$ fehérjét kapjunk csoportonként. Az egér citokin profil meghatározásához használt kit, az ún. citokin array 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 segítségével rögzítettük és vizualizáltuk. A képek elemzését a CellProfiler 3.1.5 programmal végeztük. 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.

További citokin meghatározás ELISA módszerrel az egerek bőrén

Az egerek szöveti homogenizátumaiból nyert fehérje mintákból $\text{TNF}\alpha$, IL17A és IL17C citokineket detektáltunk kereskedelmi forgalomban lévő ELISA kitek segítségével. Az előre csomagolt ELISA mikrolemezek egér $\text{TNF}\alpha$, IL17A vagy IL17C specifikus antitesttel voltak bevonva. A standard és minta hígításokat mintahígítási pufferben készítettük. Az egér IL17A és egér $\text{TNF}\alpha$ esetében a mintákat $\frac{1}{2}$ -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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Ezt követően a lemezeket 3 alkalommal mostuk. A mosás után minden egyes mélyedésbe peroxidázzal konjugált streptavidint pipettáztunk és 30 percig inkubáltuk $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A mélyedésekbe H_2O_2 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.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai elemzéseket formalinban fixált, paraffinba ágyazott egér vagy humán bőrmintákból vágott 4 µm vastagságú metszeteken hajtottuk végre. A formalinban fixált mintákon hőindukált antigén-visszanyerést végeztünk. EDTA puffert alkalmaztunk mikrohullámú sütőben 15 percig, hogy a célfehérjék epitópjait feltárjuk. Az endogén peroxidáz aktivitást 3%-os H₂O₂-dal 10 percig blokkoltuk. A blokkolás után a szöveti metszeteket specifikus primer antitestekkel inkubáltuk. A fehérjeexpressziót egér és nyúl specifikus HRP/DAB (ABC) detektáló IHC kit 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.

Humán mintákon végzett kísérlet

Kromogén in situ hibridizáció (CISH)

A bőrbioopsziákat 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 vagy egy nem specifikus mRNS negatív kontroll ún. lezárt/kötött nukleinsavat (LNA) tartalmazó próbát használtunk a gyártó utasításai szerint. A metszeteket 2x proteináz K oldattal kezeltük 15 percig, majd 100 nM előzetesen linearizált (90 °C-on 4 percig) próba keveréket 1xISH pufferben hígítva alkalmaztuk. A hibridizációt 53 °C-on végeztük a PARP2 specifikus és 57 °C-on a negatív kontroll LNA próbával 60 percig, hibridizációs. A vizualizációhoz alkalikus foszfátazzal konjugált digoxigenin antitestet és nitroblue tetrazolium /5-bromo-4-klór-indolil-

foszfát (NBT/BCIP) kromogén szubsztrátot alkalmaztunk 2 órán keresztül 30 °C-on. A tárgylemezeket stabil folyékony nukleáris vörössel festettük és a ragasztó egyben konzerváló anyaggal, az Eukitt oldattal fedtük be, majd fedőlemezt raktunk rá. A képeket Leica DM200LED mikroszkóppal készítettük.

***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](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS5260) / [ILMN1686871](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=ILMN1686871) ([nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=ILMN1686871)); [GDS4602](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS4602) / [208644](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=208644) at ([nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=208644))). A pikkelysömör egér modelljeinek összehasonlításához szintén az NCBI GEO publikus adatbázisát alkalmaztuk ([GDS3907](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3907) / [1435368](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=1435368) a at ([nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=1435368))). A PARP2 vizsgálata során az egészséges bőrből és pikkelysömörös betegek léziós bőréből 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>), valamint az általunk elvégzett IL17A+TNF α -val kezelt sc és shPARP2 HPV-Ker sejtekből RNS-szekvenálással nyert adatokat használtuk a hőterképek létrehozásához. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA889321>)

Statisztikai analízis

A statisztikai értékeléshez GraphPad Prism 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 Dunnet 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.

Eredmények

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. 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 bőrében ugyancsak a PARP1 expresszió csökkenését mutatták, bár nem szignifikáns mértékben. 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.

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 sejtkultúrákat, a HPV-Ker sejteket alkalmazva szeretnénk 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; ezért sejtkultúrás 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. 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.

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. Ezek az adatok összhangban álltak *in vivo* megfigyeléseinkkel.

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, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon a TRPV1 gátlásával felfüggeszthetőek-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. A TRPV1-et cAMP-függő protein kinázok, köztük a protein kináz C (PKC) foszforilálja és ezáltal szenzitized. A PKC a PARP1 aktivitását is szabályozza, 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.

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 mRNS expresszió.

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. A léziók szövettani metszeteiben a hematoxin-eozin (H&E) festés az IMQ által kiváltott dermatitisz jellegzetességeit mutatta a WP egerek léziós bőrén, 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. Az epidermisz megvastagodása kifejezettebb volt a WP egerek bőrén, mint a PP egerekében, a vehikulummal kezelt vad típusú (WC) és PARP2^{-/-} (PC) egerek bőrével összehasonlításban. A PP egerek epidermiszében a WP egerekéhez képest jelentősen kevesebb BrdU-pozitív sejtmag volt látható, ami a PARP2^{-/-} keratinociták kisebb proliferációs rátájára utal.

A PP egerek bőrén kialakult mérsékelt gyulladást mutatja az IL17A és a TNF α alacsonyabb szintje a PP egerek léziós bőrlizátumaiban a WP egerekéhez képest. A léziós metszetek immunhisztokémiai (IHC) elemzése azt mutatják, hogy a korai differenciálódást jelző involukrin a PP egerekben megőrizte jellegzetes expresszióját a stratum spinosumban, míg a WP csoportban az involukrin expresszió az egész epidermiszre kiterjedt. Ezen kívül, a késői terminális differenciálódás markere, a keratin 10 szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a PP egerek epidermiszében, mint a WP egerekben.

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

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. 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. Az IL17A és TNF α kezelés hatására a keratinociták PARP2 expressziója megnőtt. IL17A és TNF α jelenlétében differenciálódva az shP2 keratinociták CK10 expressziója jelentősen magasabb volt, mint az sc keratinocitáké. 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.

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.

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 szuppressziójára utal a PARP2-csendesített keratinocitákban. A TNF α önmagában vagy az IL17A-val együttesen elsősorban az NF- κ B aktiválásán keresztül hat, 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 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.

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.

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. Először RT-qPCR mérésekben validáltuk az RNS szekvenálási adatokat, amelyek megerősítették, hogy az IL17A és a TNF α szignifikánsan kisebb mértékben emelte az IL6 és IL23A mRNS expresszióját az shP2 keratinocitákban, mint az sc keratinocitákban. Emellett az IL17A+TNF α által megnövelt IL6 szekréció és IL23A fehérje expresszió 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.

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, ami összhangban volt korábbi vizsgálatainkkal, amelyek a PARP2-t a koleszterin- és szteroid homeosztázis szabályozásával hozták összefüggésbe. Ezen felül, az shP2 sejtekben emelkedett a 17 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz-3-at kódoló HSD17B3 expressziója is, amely az androsztendion tesztoszteronná történő átalakítását katalizálja. Valamint a CYP19A1, amely a tesztoszteront ösztrogénné alakító aromatázt kódolja, és a G-proteinhez kapcsolt ösztrogén receptor 1 (GPER1) expressziója is indukálódott az shP2 sejtekben, ami pedig a PARP2-csendesített keratinociták fokozott ösztrogénválaszára utal. Ezek a génexpressziós változások felkeltették érdeklődésünket, mivel az ösztadiol (E2), a fő humán ösztrogén és a GPER1 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 aromatáz expressziója. Ezzel összhangban, az shP2 HPV-Ker sejtek felülúszójában szignifikánsan magasabb ösztadiol koncentrációt mutattunk ki, mint az sc HPV-Ker sejtek esetében. 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. 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. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a PARP2 enzimatis aktivitása, bár nem tisztázott módon, de részt vesz az aromatáz 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 és szekrécit mérünk 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.

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 célgén 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. Amikor azonban az sc HPV-Ker sejtek a citokin stimulus előtt ösztadiol előkezelést kaptak, az I κ B α degradációja kisebb mértékben ment végbe, ami megerősíti az I κ B α degradáció ösztadiol által közvetített gátlását mutató korábbi eredményeket.

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. Ezzel összhangban, az exemesztán alkalmazása csökkentette az sc és shP2 HPV-Ker sejtek között eredetileg mért különbséget az IL6 szekréción és az IL23A fehérje expresszióban az IL17A+TNF α kezelést követően.

Úgy tűnik tehát, hogy az ösztadiol szintézis gátlása felszabadította az NF- κ B 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.

Az aromataz funkció szükséges a PARP2 által közvetített gyulladáscsökkentő hatáshoz egerek bőrén

Megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a bőr aromataz 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, ami arra utal, hogy az aromataz 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. Az IL17C-t, a psoriasisos gyulladás egyik központi pro-inflammatorikus citokinjét külön ELISA mérésben határoztuk meg a bőrlizátumokból, és hasonlóan a citokin array-hez, itt is jelentős növekedést találtunk az exemesztán kezelés hatására.

Az egerek léziós bőrből készült metszeteken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk. A humán keratinocitákban talált eredményeinkkel összhangban, a PARP2^{-/-} egerek epidermális keratinocitáiban magasabb aromataz expressziót találtunk a PARP2^{+/+} egerekkel összehasonlítva, függetlenül az alkalmazott kezeléstől (PP és PPE egerek vs. WP és WPE egerek). Ugyancsak összévág az *in vitro* adatokkal, hogy a WP egereknél szignifikánsan több foszforilált p65-pozitív sejtmagot találtunk az epidermiszben, mint a PP egereknél. Az aromataz gátlása azonban a p65 foszforiláció ugyancsak szignifikáns növekedését eredményezte a PPE egerek bőrén a PP egerekhez képest, aminek hatására megszűnt az eredetileg mért különbség a PARP2 knock-out és vad típusú egércsoportok között a p65 aktivációt illetően. Ezen kívül, az aromataz 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.

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

Az aromatáz expressziója csökken a humán pikkelysömörös léziókban

Végül megvizsgáltuk az aromatáz expresszióját humán bőrben is, ugyanazokat a pikkelysömörös és egészséges mintákat használva, amelyekben korábban a PARP2 expresszióját is elemeztük. Az egészséges mintákban az aromatáz magas expresszióját találtuk, amely egyenletesen oszlott el az epidermisz rétegeiben, míg a pikkelysömörös epidermiszben az aromatáz expressziója összességében csökkenést mutatott, és főleg a stratum granulosumra korlátozódott, 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.

Megbeszélés

A PARP1 és a PARP2 az ADP-ribosilációt, 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. A PARP1 több pro-inflammatorikus transzkripciós faktor (pl. NF- κ B) pozitív modulátora, és az eddigi adatok alapján úgy tűnik, hogy főként a Th2 típusú gyulladás kialakulásában játszik szerepet. Ennek megfelelően, a PARP1 genetikai delécioja vagy farmakológiai gátlása gyulladáscsökkentő hatást eredményezett számos Th2 típusú gyulladásos kórkép kísérleti modelljeiben.

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, amibe beletartozik a transzkripció, sejt differenciáció, mitokondriális biogenezis, lipid és szteroid bioszintézis és a metabolikus homeosztázis szabályozása különféle sejtekben, szövetekben. 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. 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.

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.

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 bőrhez 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. Az IMQ által indukált psoriasis modellben ugyancsak leírták már a TRPV1 moduláló hatását. Érdekes módon, az egyik tanulmányban azt találták, hogy a tranziens receptor potenciál ankirin (TRPA)1 kiűtött 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, 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, 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.

A PARP2 részt vesz a gyulladás kialakulásában psoriasis-ban a keratinociták ösztadiol 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 encephalomyelitisben (EAE), a szklerózis multiplex egérmodelljében a PARP1 deléciója súlyosbította, míg a PARP2 deléciója csökkentette az EAE-re jellemző idegrendszeri gyulladást, 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. 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. Ennek következtében, a PARP2^{-/-} egerek vázizomzatában megnőtt a DHT szintje,

anélkül, hogy a DHT szisztémás szintje megváltozott volna. Valamint, a PARP2 része az androgén receptor jelátviteli útvonalának a prosztatában. 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 ösztradiol által közvetített gátlásától függ.

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. 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. 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. Mindazonáltal, az ösztrogén receptorok (ER) aktivitása jelentős függést mutat az ösztrogén dózisától 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. 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, ami megközelítőleg megfelel annak a koncentrációnak, amelyet az sc és shP2 HPV-Ker sejtek felüluszoiban 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 deléció kedvező hatását írták le, több tanulmány is beszámol az ösztrogének hasonló idegrendszeri anti-inflammatorikus hatásáról, 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 kaszkád mechanikus részleteinek meghatározása további vizsgálatok tárgyát kell képezze.

Jelenleg a legsikeresebb terápiák a pikkelysömör ellen a biológiai ágensek, amelyek az IL17A-t vagy a $\text{TNF}\alpha$ -t célozzák, azonban a biológiai terápiáknak számos kockázata lehet a betegekre nézve, ezért folyamatos az igény a jobban tolerálható megoldások iránt. Ma már több PARP inhibitort 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. 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.

Összefoglalás

A poli(ADP-ribóz) polimeráz enzimcsalád 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-inflammatórikus 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 bőrén, 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 aromataz 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 aromataz expressziójának csökkenését is pikkelysömörös léziókban.

Összefoglalva, adataink a PARP2-t az epidermális keratinociták ösztrogén bioszintézisének modulátoraként azonosítják, amely releváns lehet a Th17 típusú gyulladásban.



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.**, Szödegyi, 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.

