

37. OTDK Biológia Szekció

**Különböző pikkelysömörös tünetmentes bőrtípusokból tenyésztett
keratinociták eltérő proteomikai összetétellel rendelkeznek**

Készítette:

Virág Nikolett

Biológus MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar



SZTE Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Témavezető:

Dr. Bozó Renáta

tudományos munkatárs
SZTE SZAOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika
Sejtbiológiai Laboratórium

Belső konzulens:

Dr. Huliák Ildikó

egyetemi adjunktus
SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2024.

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
1 BEVEZETÉS	3
1.1 A BŐR SZERKEZETE ÉS FUNKCIÓI	3
1.2 PIKKELYSÖMÖR	5
1.2.1 Általános jellemzők	5
1.2.2 Tünetek	5
1.2.3 Súlyosság szerinti osztályozás	7
1.2.4 Gyógymódok.....	8
1.2.5 A pikkelysömörös tünetmentes bőr	9
2 CÉLKITŰZÉS	12
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
3.1 DONOROK ADATAI	13
3.2 KERATINOCITÁK FELVÉTELE FAGYASZTÁSBÓL, ÉS TENYÉSZTÉSÜK	13
3.3 KERATINOCITÁK MORFOLÓGIAI MEGFIGYELÉSE FÁZISKONTRASZT MIKROSKÓPPAL	13
3.4 KERATINOCITÁK MORFOLÓGIAI MEGFIGYELÉSE TÉREMISSZIÓS PÁSZTÁZÓ ELEKTRONMIKROSKÓPPAL	14
3.5 KERATINOCITÁK FILOPÓDIUMAINAK SZÁMSZERŰSÍTÉSE	14
3.6 PROTEOMIKAI MINTAVÉTEL	14
3.7 FEHÉRJÉK TÖMEGSPEKTROMETRIÁS AZONOSÍTÁSA	15
3.8 PROTEOMIKAI EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE.....	15
3.9 IN VITRO SEBGYÓGYULÁS MODELL	16
3.10 SEBGYÓGYULÁSI FOLYAMATBAN SZEREPET JÁTSZÓ FEHÉRJÉK VIZSGÁLATA.....	16
3.11 SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA MTT ESSZÉVEL.....	16
4 EREDMÉNYEK	18
4.1 PS-TM KERATINOCITÁK MORFOLÓGIÁJA ELTÉR AZ EGÉSZSÉGES SEJTEKÉTŐL	18
4.2 PS-TM KERATINOCITÁK FEHÉRJE KIFEJEZŐDÉSI MINTÁZATA ELTÉR AZ EGÉSZSÉGES SEJTEKÉTŐL	22
4.3 A RES PS-TM KERATINOCITÁK FEHÉRJE KIFEJEZÉSE TÉR EL LEGINKÁBB AZ EGÉSZSÉGES SEJTEKÉTŐL	23
4.4 SEJT SZENESZCENCIA ÉS SEJTCIKLUS FOLYAMATAIBAN HASONLÍTANAK LEGINKÁBB A KÜLÖNBÖZŐ PS-TM CSOPORTOK	24
4.5 RES PS-TM KERATINOCITÁK SEBGYÓGYULÁSA ELTÉRŐ	25
4.6 RES PS-TM KERATINOCITÁK ÉLETKÉPESSÉGE CSÖKKENŐ TENDENCIÁT MUTAT.....	28
5 DISZKUSSZIÓ	29
6 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	31
7 IRODALOMJEGYZÉK	32
8 FÜGGELÉKEK	37
8.1 FÜGGELÉK A.....	37
9 TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	38

Rövidítések jegyzéke

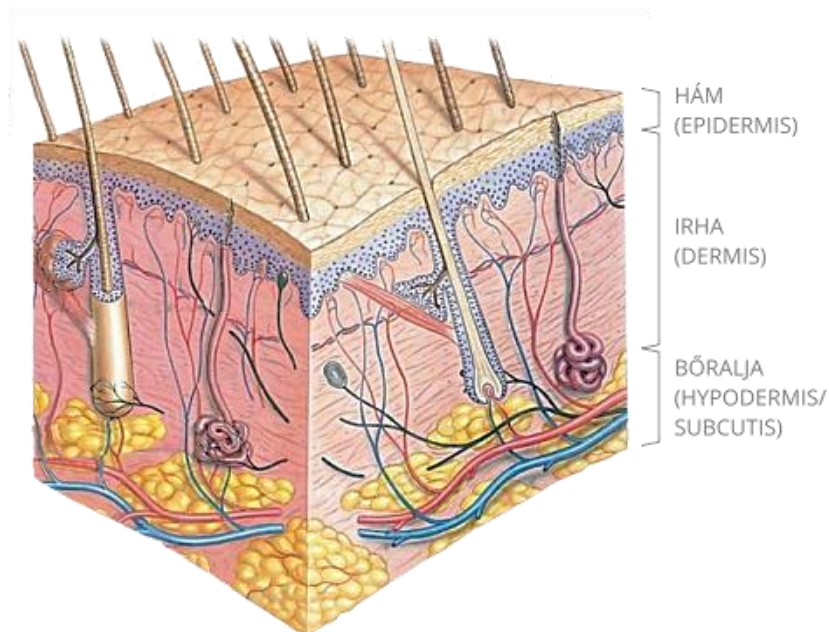
AB/AM	antibiotikum/antimikotikum
BSA	testfelület, body surface area
FBS	újszülött borjúsérum
FDA	Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatósága
IL	interleukin
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBS	foszfát pufferelt sóoldat
PBS-EDTA	foszfát pufferolt sóoldat etilén-diamin-tetraecetsavval kiegészítve
PRINS	Psoriasis Associated Non-Protein Coding RNA Induced By Stress
PS-TM	pikkelysömörös tünetmentes
PUVA	Psoralen és UV-A
RES PS-TM	resolved pikkelysömörös tünetmentes
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TBS	Tris pufferolt sóoldat
TNF α	tumor nekrosis faktor alfa
VENTX	VENT homeobox gén

1 Bevezetés

1.1 A bőr szerkezete és funkciói

A bőr az egyik legnagyobb szervünk, amely az emberi test teljes felületét lefedi és elsődleges védelmi vonalat alkot a külső környezeti hatásokkal szemben. Legfőbb feladata a mechanikai védelem, de ide sorolhatók a sugárzással és más környezeti ártalmakkal szembeni védekező mechanizmusok is. Ezen túl a bőr fontos szerepet játszik a test hőmérsékletének szabályozásában a verejtékezés révén, valamint a tápanyagok és víz raktározásában, amelyek alapvetőek a szervezet normális működéséhez.

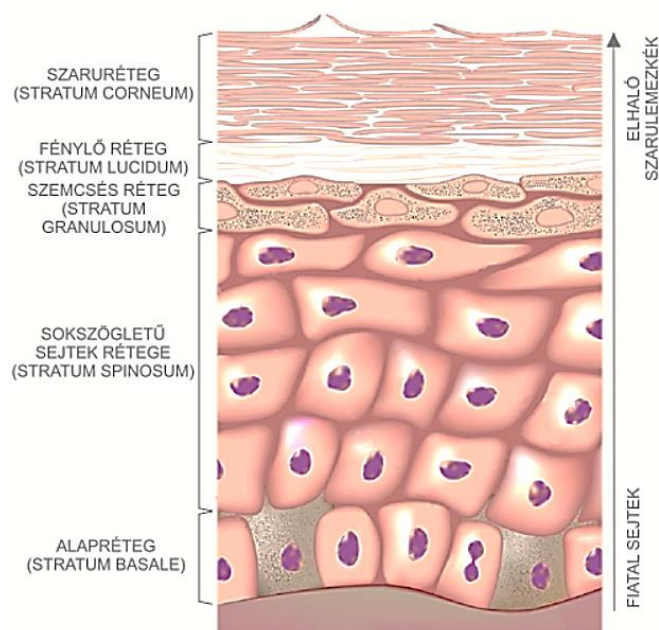
A bőr egy dinamikus, állandóan változó szerv, amely három rétegből, az epidermiszből, a dermiszből és a hipodermiszből/szubkutiszból áll (1. ábra).



1. ábra. A bőr felépítésének sematikus ábrája. (Forrás: <https://vizzeneklasszik.hu/hogyan-epulnek-fel-a-bor-retegei>)

A legalsó rétegben található hipodermiszt gazdagon erezett zsírszövet alkotja, amely mechanikai támaszt nyújt és segíti a hőháztartás fenntartását. Középen található a dermisz, amelynek fő strukturális alkotóelemei a kollagének és az elasztikus rostok. Ennek a rétegnek fontos szerepe van a verejtékezés szabályozásában és az érzékelésben. Legfelül helyezkedik el az epidermisz, ami védi a testet a kórokozóktól és a folyadékvesztéstől (1. ábra). A legbelső bazális sejtrétegben képződő keratinocita sejtek itt 5 alréteget hoznak létre (2. ábra). Ezek a

sejtek fokozatosan a bőrfelszín felé vándorolnak, miközben keratint és epidermális lipideket termelnek. Ezt a folyamatot nevezzük keratinizációnak. Az epidermisz legkülső rétegében már csak halott sejtek találhatóak, amelyek fokozatosan lehullanak a bőrrel hámolás során. Az epidermisz legkülső rétege a Stratum corneum, azaz szaruréteg, amely elszarusodott, elhalt sejtekből áll. Fő funkciója a védelem, mivel megakadályozza a vízvesztést és a külső káros anyagok bejutását. Alatta helyezkedik el a Stratum lucidum, a fénylő réteg, amely lapos sejtekből áll, amelyek segítik a bőr védelmét a dörzsölés ellen. Az ezt követő réteg a Stratum granulosum, a szemcsés réteg. Itt a keratinociták fokozatosan laposodni kezdenek, és olyan anyagokat termelnek, mint a keratin és a lamelláris granulumok, amelyek hozzájárulnak a bőr vízállóságának kialakításához. A sokszögletű sejtek, Stratum spinosum rétegében a keratinocitákon tüskeszerű nyúlványok vannak, amelyeken keresztül dezmoszómák segítségével egymáshoz kapcsolódnak, továbbá itt találhatóak a Langerhans-sejtek, amelyek az immunválaszban játszanak szerepet. A Stratum basale a bazális keratinociták rétege található legalul, ahol a keratinociták folyamatosan osztódnak. Ezek a sejtek hemidezmoszómákon keresztül kapcsolódnak a bazális membránhoz, amely elválasztja az epidermist a dermistról. Emellett itt találhatóak a melanociták, amelyek a bőr pigmentjét, a melanint termelik.



2. ábra. Az epidermisz felépítésének sematikus ábrája. (Forrás: <https://meravigliosa.hu/borteszt/>)

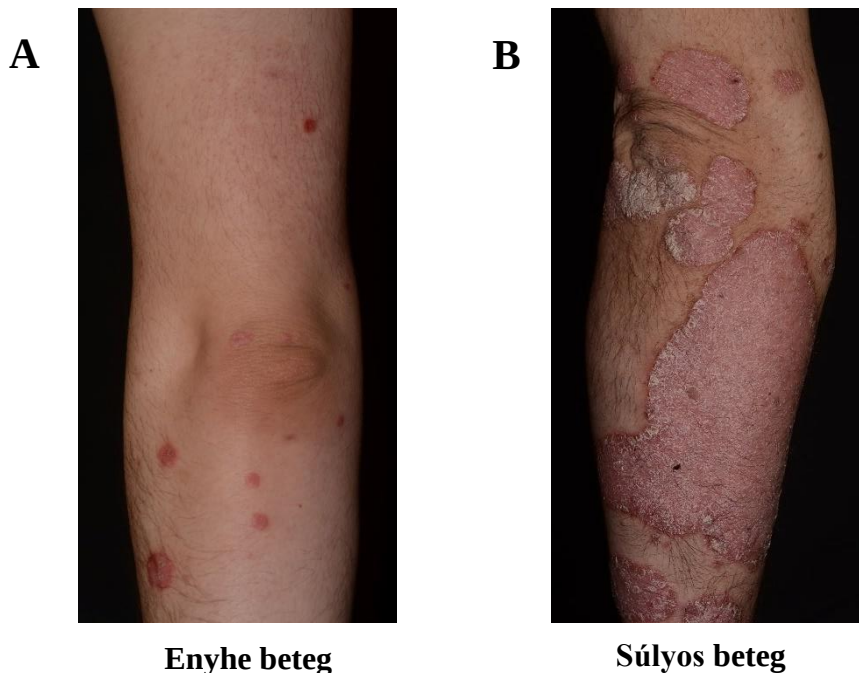
1.2 pikkelysömör

1.2.1 Általános jellemzők

A pikkelysömör (psoriasis) egy krónikus, immun-mediált gyulladásos bőrbetegség, amely az emberek 1-3%-át érinti világszerte. A betegség kialakulásának folyamata komplex, a bőr veleszületett immunrendszerének túlzott helyi immunválasza jellemzi, amelyet egy ismeretlen inger vált ki. A genetikai hajlam mellett, a tünetek megjelenését és súlyosbodását környezeti tényezők is segítik, ezek közé tartozik például a stressz, a fertőzések (például streptococcus fertőzés), a mechanikai hatások, a dohányzás, az elhízás és az alkoholfogyasztás (Lowes és mtsai. 2014). Továbbá a betegségre jellemző még a keratinociták hiperproliferációja és az immunsejtek infiltrációja is. Ezen folyamatoknak a következménye, hogy létrejönnek a jellegzetes vörös, hámló, ezüstös pikkelyekkel borított plakkok. A betegség leggyakoribb megjelenési formája a krónikus plakkos típusú pikkelysömör, másnéven *Psoriasis vulgaris*, amely az immunválasz diszregulációjának következménye. Kulcsszerepe van az interleukin (IL)-17, IL-23, valamint tumor nekrosis faktor (TNF)- α citokineknek a betegség patogenezisében (Di Meglio és mtsai. 2011; Nestle és mtsai. 2009). A pikkelysömör gyakori társbetegségei közé tartozik az ízületi gyulladás, a kardiovaszkuláris megbetegedések, metabolikus szindróma, valamint gyakori a pszichés érintettség, mint például a depresszió. Ezenkívül a betegség nagy hatással van az érintettek életminőségére, hiszen jelentős pszichoszociális nehézségekkel kell szembenéznük (Singh és mtsai. 2017; Ryan és mtsai. 2015). Bár a pikkelysömör kezelésére számos modern kezelési lehetőség áll rendelkezésre, melyek hatékonyan működnek a tünetek enyhítésében és a fizikai, valamint pszichológiai káros hatások minimalizálásában (Griffiths és mtsai. 2021; Kárpáti és Kemény 2013), azonban a tünetek kiújulásának megakadályozására jelenleg még nincs megoldás.

1.2.2 Tünetek

A pikkelysömör tünetei változatosak lehetnek, attól függően, hogy melyik klinikai altípusról van szó. Krónikus plakkos típusú pikkelysömörben jól körülhatárolt, vöröses-rózsaszín a felszínükön ezüstös pikkelyekkel borított plakkokkal jelenik meg (3. ábra). A plakkok mérete és vastagsága igen változékony lehet, ami a betegség aktivitását vagy a terápiára adott választ tükrözheti. Leggyakrabban a térd és a könyök külső felületein, a lumbosakrális régióban, valamint a fejbőrön jelennek meg, azonban a teljes bőrfelület hordozza a pikkelysömör kialakításának képességét. Egy jellemző tünet, az ún. Koebner-jelenség, ami azt jelenti, hogy a bőrelváltozások gyakran jelennek meg a bőrt ért trauma helyén vagy mechanikai nyomás alatt lévő területeken (Griffiths és mtsai. 2021).



3. ábra. A krónikus plakkos pikkelysömör megjelenése. **(A)** Enyhe krónikus plakkos típusú pikkelysömörös beteg alkarja. **(B)** Súlyos krónikus plakkos típusú pikkelysömörös beteg alkarja. (Forrás: SZTE SZAOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika archívuma)

Az inverz pikkelysömört, a palmoplantáris pikkelysömört, a sebopszoriázis és a köröm pikkelysömört előfordulási hely alapján jellemzik. Az inverz pikkelysömör leggyakrabban a hónaljban, ágyékban, mell alatt vagy a nemi szervek bőrredőiben jelentkezik pikkelyesedés nélküli fényes vörös plakkok formájában (Griffiths és mtsai. 2021). A palmoplantaris pikkelysömör a tenyéren és a talpon, a sebopszoriázis pedig a fejbőrön, az arcon, valamint a fülek mögötti és a mellkas előtti területeken hoz létre plakokat (Griffiths és mtsai. 2021). A köröm pikkelysömört a plakkos pikkelysömörben szenvedő betegek közel fele tapasztal. Ez a forma a körmöket számos módon érinti, például sárgásbarna színváltozást, lyukakat, érzékenységet és fájdalmat okozhat az érintett területen (Augustin és mtsai. 2010; Griffiths és mtsai. 2021).

A pikkelysömör ritkább formái közé tartozik a guttált, erythrodermiás és pustulosus pikkelysömör. A guttált forma számos apró, pikkelyes centripetális mintázatban elhelyezkedő papulával jár (Dupire és mtsai. 2019). Ez a forma gyakran alakul ki egy korábbi torokfertőzést követően, és bár a betegek többsége spontán gyógyul néhány héten vagy hónapon belül, az esetek körülbelül 40%-a krónikus plakkos pikkelysömörre alakul (Martin és mtsai. 1996; Griffiths és mtsai. 2021). Az erythrodermiás forma a pikkelysömör súlyos, életveszélyes

változata, amely az egész testfelület több mint 75%-át érintheti. A bőr kiterjedt pirossága, hámlása és exfoliációja hővesztéssel, elektrolit-zavarral, pruritussal (viszketéssel) és bőrfájdalommal járhat (Singh és mtsai. 2016; Griffiths és mtsai. 2021). A pustulosus pikkelysömör steril gennyhólyagokkal jár, amelyek körül bőrpír jelentkezik. Három altípust különböztetünk meg: generalizált pustulosus pikkelysömör, palmoplantaris pustulosis és Hallopeau acrodermatitise (Griffiths és mtsai. 2021).

1.2.3 Súlyosság szerinti osztályozás

A pikkelysömör súlyosságát a testfelület (body surface area, BSA) érintettsége alapján az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatósága (FDA) enyhe, közép súlyos és súlyos kategóriákba sorolja. Az enyhe esetekben a testfelület kevesebb mint 5%-a érintett, míg közép súlyos formánál ez az arány 10-20%, súlyos pikkelysömörnél pedig a testfelület több mint 20%-a érintett (Winterfield és mtsai. 2005).

A pikkelysömör objektív mérésére széles körben alkalmazott módszer a Psoriasis Area and Severity Index (PASI), amely figyelembe veszi az érintett bőrfelület százalékos arányát, a plakkok vastagságát, vörösségét és hámlását. A PASI skála 0 és 72 pont között mozog, ahol a magasabb értékek a pikkelysömör súlyosabb formáját jelzik. Enyhe pikkelysömör esetén a PASI értéke általában 10 alatti, míg a közép súlyos és súlyos esetekben ez 10-20, illetve 20 pont feletti értéket mutat. A kezelések célja gyakran a PASI 75 elérése, amely legalább 75%-os javulást jelent a tünetekben (Griffiths és mtsai. 2021).

Az FDA az újonnan jóváhagyott biológiai terápiák hatékonyságának mérésére a PASI változását javasolja, amely a test négy specifikus területén (fej-nyak, törzs, felső és alsó végtagok) méri az erythema, induráció és hámlás mértékét. Ugyanakkor a legújabb kutatások rámutattak, hogy a BSA és PASI értékek nem állnak szoros összefüggésben a betegség életminőségre gyakorolt hatásával (Rapp és mtsai. 1999; Ashcroft és mtsai. 1998; Mckenna és mtsai. 1996). Erre reagálva az Országos Pikkelysömör Alapítvány Orvosi Tanácsadó Testülete olyan új kritériumokat javasolt az enyhe, közepes és súlyos betegség meghatározására, amelyek az életminőségre gyakorolt hatást is figyelembe veszik (Krueger és mtsai. 2000). Ezen új, életminőség-alapú kritériumok célja, hogy a kezelési stratégia megválasztásánál elsődleges szempontként szolgáljanak (Winterfield és mtsai. 2005).

1.2.4 Gyógymódok

Az enyhe pikkelysömör az esetek többségében a testfelület 3-5%-ánál kisebb mértékű érintettséget jelent, és kezelésének megtervezése előtt szükséges felmérni, hogy a beteg szenved-e pszoriázisos ízületi gyulladásban, mivel ez befolyásolhatja a terápiás megközelítést (Singh és mtsai. 2018). Az enyhe pikkelysömör kezelésére alkalmazható módszerek közé tartoznak a helyi kortikoszteroidok, D-vitamin-analógok, kalcineurin inhibitorok, keratolitikus szerek és a célzott fototerápia (Armstrong és Read 2020).

A közepesen súlyos és súlyos pikkelysömör pontos meghatározása orvosonként eltérhet; általában azonban 3-10% testfelületi érintettség esetén közepesen súlyosnak, 10% felett pedig súlyosnak tekintik a betegséget. Az ilyen esetekben szisztémás kezeléseket alkalmaznak, melyek különösen hatékonyak a fejbőrön, tenyéren, talpon vagy nemi szerveken megjelenő, illetve helyi kezelésekre nem reagáló pikkelysömör esetén. A kezelés során biológiai terápiás szerek, orális gyógyszerek és fototerápia kombinációját is javasolják a szakmai irányelvek. Összességében a biológiai terápiás szerek hatékonyabbak az orális gyógyszereknél vagy a fototerápiánál (Armstrong és Read 2020; Armstrong és mtsai. 2020).

A fototerápia alkalmazása csökkent, amióta elérhetővé váltak a biológiai szerek. A keskenysávú UV-B terápiát előnyben részesítik a szélessávúval szemben, mivel hatékonyabb és biztonságosabb, bár a fototerápia egyik kihívása, hogy rendszeres rendelői látogatásokat igényelhet. (Armstrong és Read 2020).

Az UV-B sugárzás DNS-szintézis gátlásával elősegíti a keratinociták elhalását és csökkenti a T-sejtek gyulladásos citokin termelését. (Armstrong és Read 2020).

A PUVA-terápia során psoralent, például metoxalent alkalmaznak, majd UV-A sugárzás következik. Bár kezdetben hatékonyabbnak bizonyulhat az UV-B-nél, hosszú távon növelheti a bőrrák kialakulásának esélyét, ezért alkalmazását ritkábban ajánlják. A PUVA különösen hatékony tenyér- és talpi pikkelysömör esetén. (Stern 2012; Armstrong és Read 2020).

A biológiai szerek jelentős előrelépést jelentenek a közepesen súlyos és súlyos plakkos pikkelysömör kezelésében, négy fő osztályuk pedig különböző gyulladásgátló mechanizmusokon alapul: TNF-inhibitorok, IL-12/23 inhibitor, IL-17 inhibitorok és IL-23 inhibitorok. A legtöbb biológiai szert szubkután injekció formájában alkalmazzák. Az ilyen kezelések mellett nincs kimutathatóan nagyobb gyakorisága a súlyos fertőzéseknek vagy belső

daganatoknak, és gyakori mellékhatásként főként az injekció helyén jelentkező reakciók, nátha és felső légúti fertőzések fordulnak elő (Armstrong és Read 2020). A TNF- α inhibitorok a legrégebbi biológiai szerek, melyek a pikkelysömör kóros gyulladásos folyamatait gátolják (Armstrong és mtsai. 2020). Az IL-12/23 inhibitorok közül az ustekinumab gátolja mind az IL-12, mind az IL-23 hatását, főként az IL-23-at célozva, hatékonysága kiemelkedő. (Armstrong és Read 2020). Az IL-17 inhibitorok többségében az IL-17A-t célozzák, gyors hatáskezdetük és hatékony válaszuk miatt népszerűek, és biztonságosan alkalmazhatóak. (Armstrong és Read 2020). Az IL-23 inhibitorok kifejezetten az IL-23 p19 alegységét gátolják, így a Th17 útvonal aktivitását csökkentik (Armstrong és Read 2020).

Az orális szereket hosszú ideje alkalmazzák a pikkelysömör kezelésére, ideértve a metotrexátot, apremilasztot, acitretint és ciklosporint. Bár hatékonyságuk általában alacsonyabb a biológiai szerekhez képest, mégis elsővonalbeli terápiás szerek (Armstrong és Read 2020).

1.2.5 A pikkelysömörös tünetmentes bőr

A pikkelysömörös gyulladásos léziókat klinikailag egészségesnek tűnő bőr veszi körül, amelyet nem léziós vagy tünetmentes bőrnek nevezünk. Bár a tünetmentes bőr makroszkóposan hasonlít az egészséges bőrre, molekuláris és sejtes szinten számos eltérést mutat, és bizonyos szempontból „prepszoriaticus” fenotípussal rendelkezik (Nosbaum és mtsai. 2021).

A pikkelysömörös léziós és nem léziós bőr közötti különbségeket az epidermisz különböző jellemzői alapján is megfigyelhetjük. A léziós bőrt a keratinociták hiperproliferációja és abnormális differenciációja jellemzi, amely gyulladásos mediátorok és leukociták besűrűsödésével jár együtt. A nem léziós bőr azonban egy különleges állapotot képvisel. Ugyan itt nem figyelhető meg intenzív immunsejt-infiltráció, az egészséges bőrhöz képest megnövekedett számú T-helper és szupresszor sejtek, CD11b⁺ sejtek és bizonyos dendritikus sejtek jelenléte érzékelhető, amelyek már a léziós állapot előtt is jelen vannak (Baker és mtsai., 1984; Placek és mtsai., 1988; Prens és mtsai., 1991). Emellett a nem léziós epidermiszben számos citokin mRNS-e, például az IL1 α , IL1 β , IL17, TNF α és IFN γ , magasabban expresszálódik, ami azt jelzi, hogy a TNF α /IL-23/IL-17 tengely szerepet játszik a pikkelysömörös plakkok kialakulásában és fenntartásában (Uyemura és mtsai., 1993; Griffiths és mtsai., 2021).

Korábbi kutatások bebizonyították, hogy a tünetmentes bőr nem csupán a lézió kialakulásának lehetőségét rejt magában, hanem olyan gátló mechanizmusokkal is rendelkezik, amelyek

segíthetnek fenntartani a tünetmentes állapotot. A tünetmentes bőrfelületeken, bár jelen vannak gyulladást előidéző molekulák, ezek nem aktívak, ami arra utal, hogy olyan gátló faktorok is jelen vannak, amelyek fenntartják a nem léziós állapotot és meggátolják a plakkok kialakulását (Kelemen és mtsai., 2021). A cartilage oligomeric matrix protein például kölcsönhatásba lép a bazális keratinociták által kifejezett $\alpha 5 \beta 1$ -integrinnel, ezáltal képes visszafogni a keratinociták proliferációját, megakadályozva ezzel a tünetmentes bőrben a hiperproliferatív állapot kialakulását (Bozó és mtsai., 2020).

A mechanikai stressz szintén egy olyan faktor, amely hatással van a pikkelysömör kialakulására. Jellemző rá az úgynevezett Köbner-jelenség, amely szerint bőrsérülés hatására egészséges bőrfelületeken is léziók alakulhatnak ki (Weiss, Shemer, és Trau, 2002). Azon bőrfelületeken, amelyek gyakrabban ki vannak téve mechanikai terhelésnek, például a könyökön és térdén, a pikkelysömör tünetei is nagyobb valószínűséggel jelentkeznek (Qiao és mtsai., 2019). A "tape-stripping" módszerrel előidézett mechanikai stressz hatására a tünetmentes bőrben fokozott epidermális proliferáció és növekedési faktor-alfa termelés figyelhető meg az egészséges bőrhöz képest (Hatta és mtsai., 1997). Ezen kívül, olyan sebgyógyulásban részt vevő fehérjék, mint az $\alpha 5$ -integrin és a fibronectin splice variánsa (EDA+FN) szintén nagyobb mértékben kifejeződnek a tünetmentes pikkelysömörös bőrben (Gubán és mtsai., 2016). A tünetmentes pikkelysömörös bőrben az emelkedett PRINS (Psoriasis Associated Non-Protein Coding RNA Induced By Stress) - amely egy hosszú, nem kódoló RNS – szint szintén arra utal, hogy a nem léziós területeknek van egyfajta stresszválasz szabályozása, amely szerepet játszhat a gyulladás csökkentésében (Sonkoly és mtsai., 2005).

A transzkriptomikai elemzések több olyan gént is azonosítottak, amelyek eltérő expressziót mutatnak a nem léziós bőrben az egészséges bőrhöz képest (Xie és mtsai. 2014; Zhou és mtsai. 2003). A legmarkánsabb eltérések az immunrendszerhez, az epidermális differenciációhoz, az exocitózishoz, a lipid bioszintézishez, a sejtszerveződéshez és a melanin bioszintézishez kapcsolódó génekben jelentkeztek. Egy korábbi proteomikai vizsgálat, amely a pikkelysömörös betegek tünetmentes és léziós bőrét egészséges egyének bőrével hasonlította össze, további bizonyítékkal szolgált arra, hogy a tünetmentes bőr a betegség köztes stádiumát képviseli. Kutatócsoportunk korábban megállapította, hogy a léziós és egészséges bőr között differenciálisan kifejeződő fehérjék 80%-a köztes szinten volt jelen a nem léziós bőrben, azaz az egészséges és léziós bőr szintjei között helyezkedett el (Szél és mtsai. 2019).

Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a nem léziós bőr sajátos egyensúlyban van a gyulladást serkentő és gátló faktorokkal, amelyek együttesen hozzájárulhatnak a tünetmentes állapot fenntartásához.

A pikkelysömörös kezelt betegek korábban léziós bőre, klinikailag szintén tünetmentes, ezt a típust pedig ún. „resolved” pikkelysömörös tünetmentes (RES PS-TM) bőrtípusnak nevezzük. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a resolved tünetmentes keratinocitákban megfigyelhetők epigenetikai elváltozások, valamint a tünetes bőrre jellemző, a betegség hatásaként fennmaradó transzkriptomikai elváltozások (Ghaffarinia és mtsai. 2023). Az ún. szöveti rezidens memória T sejtek hosszú időn keresztül fennmaradhatnak a bőrben, melyeknek szerepe van a tünetek kiújulásában (Cheuk és mtsai. 2014). A RES PS-TM bőrből tenyésztett keratinociták esetén megfigyeltük, hogy tenyészetben az egészségestől eltérő morfológiájú sejteket is láthatunk.

2 Célkitűzés

Ugyan a pikkelysömör kezelésére számtalan sikeres kezelési lehetőség áll rendelkezésre, azonban idővel a tünetek visszatérhetnek. Az utóbbi időben azonban egyre nagyobb figyelem fordult a betegek tünetmentes bőrterületeinek vizsgálatára, mivel még mindig nem tisztázott miként tartja meg a pikkelysömörre hajlamos bőr a látszólag egészségesnek tűnő állapotát. Feltételezhetően a különböző súlyosságú pikkelysömörös tünetmentes keratinocitáknak eltérhetnek a sejtbiológiai tulajdonságai az egészséges keratinocitákétól, melyeknek szerepe lehet a nem-léziós állapot fenntartásában. Éppen ezért a TDK munkám célja a potenciálisan eltérő sejtbiológiai tulajdonságok vizsgálata az egészséges és az enyhe-, súlyos pikkelysömörös betegek és a klinikailag tünetmentes betegek keratinocitái között.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Donorok adatai

Kutatócsoportunk korábban punch biopsziákat ($d = 6 \text{ mm}$) gyűjtött egészséges donorok bőréből ($n = 3$; 25-60 év), különböző súlyosságú kezeletlen pikkelysömörben szenvedő betegek tünetmentes bőrterületeiről ($n_{\text{enyhe}} = 3$; $n_{\text{súlyos}} = 3$; 25–60 év; $\text{PASI}_{\text{enyhe}} = >15$; $\text{PASI}_{\text{súlyos}} = 25<$). A betegek nem részesültek lokális kezelésben a mintavételt megelőző négy hétben, szisztémás kezelést pedig legalább nyolc hétig nem kaptak. Emellett kezelt betegek korábban léziós, és a kezelés hatására tünetmentessé vált ún. resolved (RES PS-TM) bőrterületeiről ($n = 3$; 25-60 év). A mintavétel minden esetben előzetes tájékoztatás és írásos beleegyezés után történt, megfelelő intézményünk etikai engedélyeinek (2799, 3517, PSO-CELL-01, 90/2021, 4969, 2021. április 26., Szeged). Ezekből a mintákból izolálták az epidermális keratinocitákat, majd folyékony nitrogénbe lefagyasztották.

3.2 Keratinociták felvétele fagyasztásból, és tenyésztésük

Miután a sejteket kivettük a $-180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -os folyékony N_2 tartályból hozzáadtunk a félig fagyos keratinocitákhoz 0,5 ml főtális borjú szérumot (FBS, Euroclone) és 4,5 ml szérummentes keratinocita tápfolyadékot (Gibco Keratinocyte SFM, Life Technologies), majd 1150 rpm-en 10 percig $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk (Heraeus). Ezt követően a sejteket T75-ös sejttenyésztő flaskában (Corning) 80%-os konfluenciáig növesztettük.

A sejteket szérummentes keratinocita tenyésztő közegben (Gibco Keratinocyte SFM, Life Technologies) neveltük, amelyet 1% antibiotikum/antimikotikum (AB/AM) oldattal (Lonza), 1% L-glutaminnal (Lonza), agyalapi mirigy kivonattal ($50 \text{ } \mu\text{g/ml}$, Life Technologies) és epidermális növekedési faktorról (5 ng/ml , Life Technologies) egészítettünk ki. A sejttenyésztést $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 5% szén-dioxid mellett végeztük, a közeg cseréjét pedig 3 naponta biztosítottuk. A kísérleteket a harmadik passzázsban levő primer sejtekkel végeztük. Minden kísérlethez a donorokból tenyésztett primer keratinocitákat azonos sejtszámmal kiindulva, azonos körülmények között tenyésztettük. A sejtszámolást Bürker-kamrában végeztük.

3.3 Keratinociták morfológiai megfigyelése fáziskontraszt mikroszkóppal

Minden tenyésztéről a 72 órás tenyésztést követően, a proteomikai mintavétel előtt Zeiss AxioVert mikroszkóppal (Carl Zeiss AG) különböző nagyításokkal fotókat készítettünk, majd ImageJ szoftver segítségével elemeztük.

3.4 Keratinociták morfológiai megfigyelése téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal

A keratinocita kultúrákat 12 lyukú tenyésztőedénybe helyezett 5 mm átmérőjű steril üvegkorongra növesztettük, majd 2,5% -os (v/v%) glutár-aldehid és 0,05 mólos kakodilát puffert (pH=7,2) tartalmazó PBS-ben fixáltuk legalább egy éjszakán át. Ezt követően a korongokat kétszer PBS-sel átmostuk, majd felszálló alkoholsor (30%, 50%, 70%, 80%, és 100%) használatával víztelenítést végeztünk el. Lépésenként 120 perc kezelési időt alkalmaztunk, a tiszta alkohol esetében a mosási lépést háromszor megismételtük. Ezt követően a minták további feldolgozását a HCEMM-USZ Functional Cell Biology and Immunology Advanced Core Facility közreműködésével végeztük. A minták kémiai szárításához at hexametil-diszilazán alkalmazása történt 1 órán át, majd 12 nm arany bevonat mintákra történő porlasztása (Q150 Quorum Technologies). A mintákról Zeiss Sigma 300 téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal (Carl Zeiss AG) 50 nm/pixel felbontásban ún. nagy terület szkennelési módban készültek felvételek, melyeket ezt követően ImageJ program segítségével elemeztünk.

3.5 Keratinociták filopódiumainak számszerűsítése

A filopódiumok számát szoftveresen az ImageJ/Fiji (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) program FiloQuant pluginjének segítségével határoztuk meg. A kapott eredményeket a GraphPad Prism szoftver 10.4.1-es verziójával értékeltük ki, egyszempontos ANOVA-t és Dunnett-féle többszörös összehasonlítási tesztet alkalmazva. Az eredményeket ugyanezen szoftverrel ábrázoltuk. A $p < 0,05$ értékeket szignifikánsnak fogadtuk el (** $p < 0,01$), ns: nem szignifikáns.

3.6 Proteomikai mintavétel

A sejteket minden donorból T25-ös sejtenyésztő flaskában (Corning) tenyésztettük 350 000 kiindulási sejtszámmal, 72 órán át. Ezt követően 5 ml szérummentes keratinocita tenyésztő közeggel (Gibco Keratinocyte SFM, Life Technologies) átmostuk és inkubáltuk 3 percig ezt követően etilén-diamin-tetraecetsavval kiegészített foszfát puffereelt sóoldattal (PBS-EDTA) is mosást végeztünk. Majd 1 ml EDTA-val kiegészített tripszinnel 5 percig inkubáltuk 37 °C-on, míg azok leváltak a tenyésztő edény faláról. Ezt követően az edény alját 5 ml PBS-EDTA-val átmostuk és egy centrifugacsőbe mértük, majd centrifugálással (Heraeus) üleptítettük. Ezután 1% proteináz inhibitor koktéllal (PIC, Sigma Aldrich) kiegészített PBS-sel kétszer, majd egyszer PIC nélküli PBS-sel átmostuk a sejtpelletet az emésztő közeg maradékainak

eltávolítására. A mosási lépések között centrifugálással távolítottuk el a puffert. Az utolsó mosás után a felülúszót leszívtuk és a sejtpelletet -80 °C-ra lefagyasztottuk

3.7 Fehérjék tömegspektrometriás azonosítása

Az előző pontban leírtak alapján készített mintákból a fehérjék tömegspektrometriai azonosítását a HUN-REN-SZBK Proteomikai Kutatócsoportja végezte el az alábbi lépések szerint. A minták előkészítése a Thermo EasyPep™ Mini MS Sample Prep Kittel történt a gyártó utasításai szerint (Thermo Scientific). A folyamat pedig az alábbi fő lépésekből állt: 1. sejtek lízise, 2. fehérje koncentráció mérése, 3. fehérjék redukálása és alkilezése, 4. fehérjék tripszines emésztése, 5. fehérjék donoronkénti ún. TMT (tandem mass tag) jelölése, 6. minták 1:1 arányú keverése donoronként, 7. peptidek tisztítása az EasyPep™ peptide clean-up oszlopon. Ezt követően történt a minták keverésének ellenőrzése, majd frakcionálása magas pH-n a Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit használatával (Thermo Scientific). A frakciókat lehetett ezt követően folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriai (LC-MS/MS) analízisnek alávetni, amely Evosep One kromatográfval kapcsolt ionmobilitás egységgel felszerelt Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific) tömegspektrométeren történt. Az adatok kiértékelése a Thermo ProteomeDiscoverer 3.0 szoftvercsomag (Thermo Scientific) segítségével történt.

3.8 Proteomikai eredmények kiértékelése

A donoronkénti fehérje kifejeződési adatokat csoportonként átlagoltuk, melyeket hőtérképen ábrázoltunk, ahol az osztályozást átlagos kapcsolódás alapján végeztük, a távolságmérés módszereként a Pearson módszert alkalmaztuk (www.heatmapper.ca). A csoportok páros összehasonlításával határoztuk meg a legalább kétszeres változást mutató fehérjéket, fókuszálva az egészséges csoporthoz hasonlított eltérésekre. Az ún. background based t teszt szolgált hipotézisvizsgálatként. Azok a fehérjék kerültek a kétszeres változók csoportjába, ahol a teszt eredményeként szignifikáns változás, azaz $p < 0,05$ volt azonosítható. Az eredményeket vulkán grafikonon ábrázoltuk. A függelékek ábráin a $\log_2$ fold change értékeket az x tengelyen, míg a $-\log_{10}$ p-értékeket az y tengelyen ábrázoltuk, így vizualizálva a szignifikáns eltéréseket. A differenciálisan expresszálódó fehérjék, amelyek legalább kétszeres változást (növekedést vagy csökkenést) mutattak, Reactome over-reprezentációs teszt segítségével kerültek elemzésre a leginkább érintett biológiai folyamatok és útvonalak azonosítására (www.reactome.org).

3.9 *In vitro* sebgyógyulás modell

Minden donorból 100 000 keratinocita sejtet passzáltunk mikroszkópos tárgylemezre rögzített 8 osztatú sejtenyésztő kamra egy lyukába, majd 24 óráig tenyésztettük. Ilyen kiindulási sejtszám mellett ennyi idő alatt 100%-os konfluencia érhető el. 24 óra után a kamrák alját egy pipettahegy segítségével egy határozott fentről-lefelé irányuló mozdulattal megkarcoltuk, majd a mintákat az inkubátorba helyezett CytoSmart Lux2 time lapse mikroszkóppal (Axion Biosystems) monitoroztuk. A mikroszkóp 5 percenként készített képet a sejtek állapotáról, emellett a készülékhez tartozó program ún. scratch algoritmus meghatározza a készített képek alapján a sejtekkel nem fedett terület méretét. A felvételt addig folytattuk, míg a keratinociták újból elérték a 100%-os konfluenciát, azaz a mesterségesen karcollással létrehozott seb bezáródott.

3.10 Sebgyógyulási folyamatban szerepet játszó fehérjék vizsgálata

A proteomikai eredmények közül kiválogattuk a sebgyógyulás mechanizmusában szerepet játszó fehérjéket (génazonosítók szerint: ACTA2, ACTC1, ANGPT1, CCL2, CCL7, CD40LG, CDH1, COL14A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A3, COL5A1, COL5A2, COL5A3, CSF2, CSF3, CTGF, CTNNB1, TSG, CTSK, CTSL2, CXCL1, CXCL11, CXCL2, CXCL5, EGF, EGFR, F13A1, F3, FGA, FGF10, FGF2, FGF7, HBEGF, HGF, IFNG, IGF1, IL10, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL6ST, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6, MAPK1, MAPK3, MIF, MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, PDGFA, PLAT, PLAU, PLAUR, PLG, PTEN, PTGS2, RAC1, RHOA, SERPINE1, STAT3, TAGLN, TGFA, TGFB1, TGFB3, TIMP1, TNF, VEGFA, VTN, WISP1, WNT5A, ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPLP0, HGDC), melyek kifejeződését a vizsgált csoportokban szintén hő térkép formájában ábrázoltuk.

3.11 Sejtek életképességének vizsgálata MTT esszével

Minden donor keratinocitáiból 10.000 keratinocita sejtet helyeztünk egyenként egy 96 lyukú sejtenyésztő edény négy lyukába (4 párhuzamos technikai replika), emellett 2 lyukba sejtmentes tápfolyadékot mértünk a háttér érték meghatározásához. 72 órás tenyésztést követően 20 µl MTT reagenst (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid, Sigma Aldrich) adtunk egyenként a sejtekhez és a kontroll tápfolyadékhoz is, majd 4 órára visszahelyeztük az inkubátorba. Ez idő alatt az életképes sejtek mitokondriális enzimeik az MTT-t oldhatatlan formában kristályokká redukálták, tehát a sejtek életképességére metabolikus aktivitásuk alapján lehet következtetni. Az inkubációt követően a felülúszót

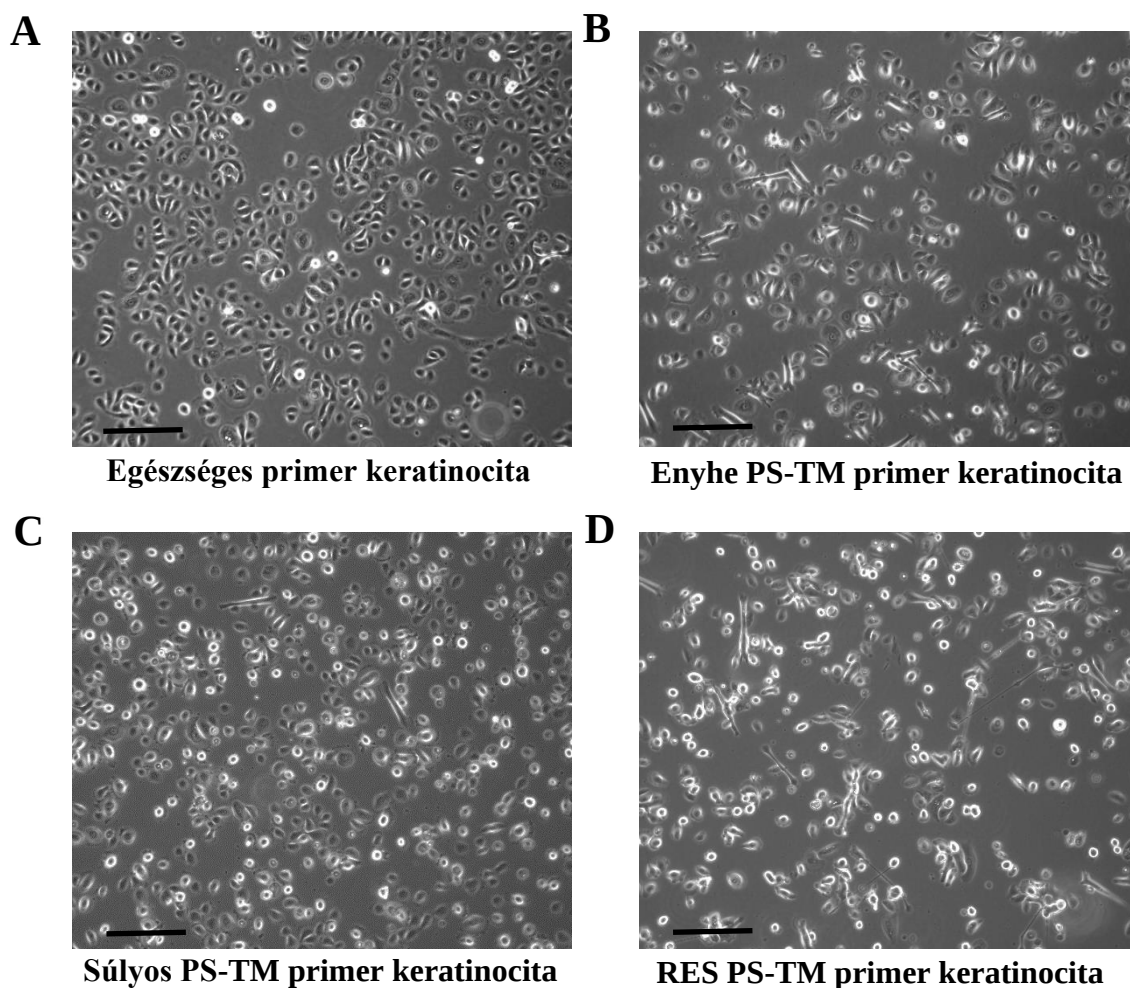
eltávolítottuk, majd 100 μ l sósavas izopropil alkohollal feloldottuk a sejtekben keletkező formazán kristályokat, és 20 μ l 10%-os SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát) adtunk még detergensként a mintákhoz. A felszabaduló formazán kristályok lilás-kék színt adtak a mintának. A feloldott kristályok színintenzitását mikrotiter plate readerrel (Thermo Scientific) 540 nm hullámhosszon határoztuk meg. A színintenzitás arányos a sejtek metabolikus aktivitása alapján meghatározott életképességével és értékéből következtethetünk sejtszámbeli különbségekre is, ami proliferációs különbségből adódhat. A mért értékekből kivontuk a háttér tápfolyadék mért értékeit, majd csoportonként átlagoltuk, és az egészséges csoport értékére normalizáltuk az adatokat.

4 Eredmények

4.1 PS-TM keratinociták morfológiája eltér az egészséges sejtektől

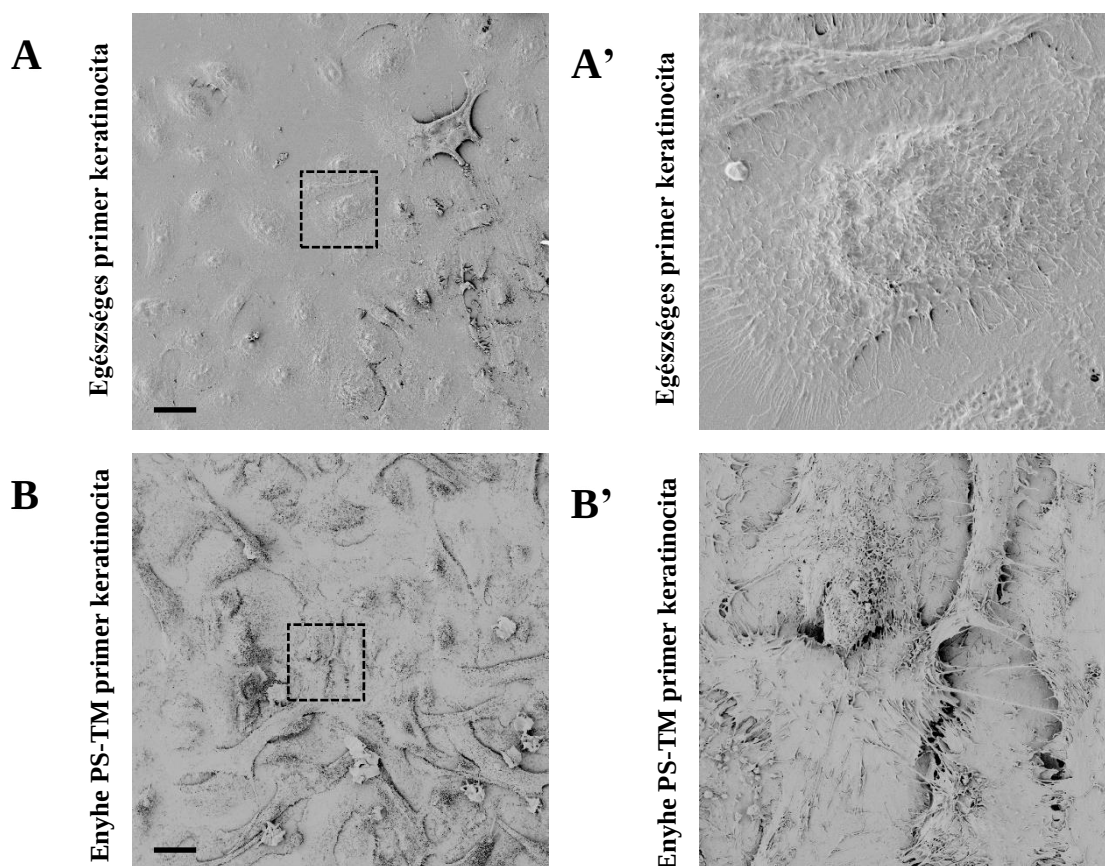
Korábban megfigyeltük, hogy az egészséges és a RES PS-TM sejtek fáziskontraszt mikroszkóp alatt különböző alakokat vettek fel. Ezért, az egészséges és a különböző PS-TM donorok primer keratinocita tenyészeit különböző mikroszkópos technikákkal vizsgáltuk.

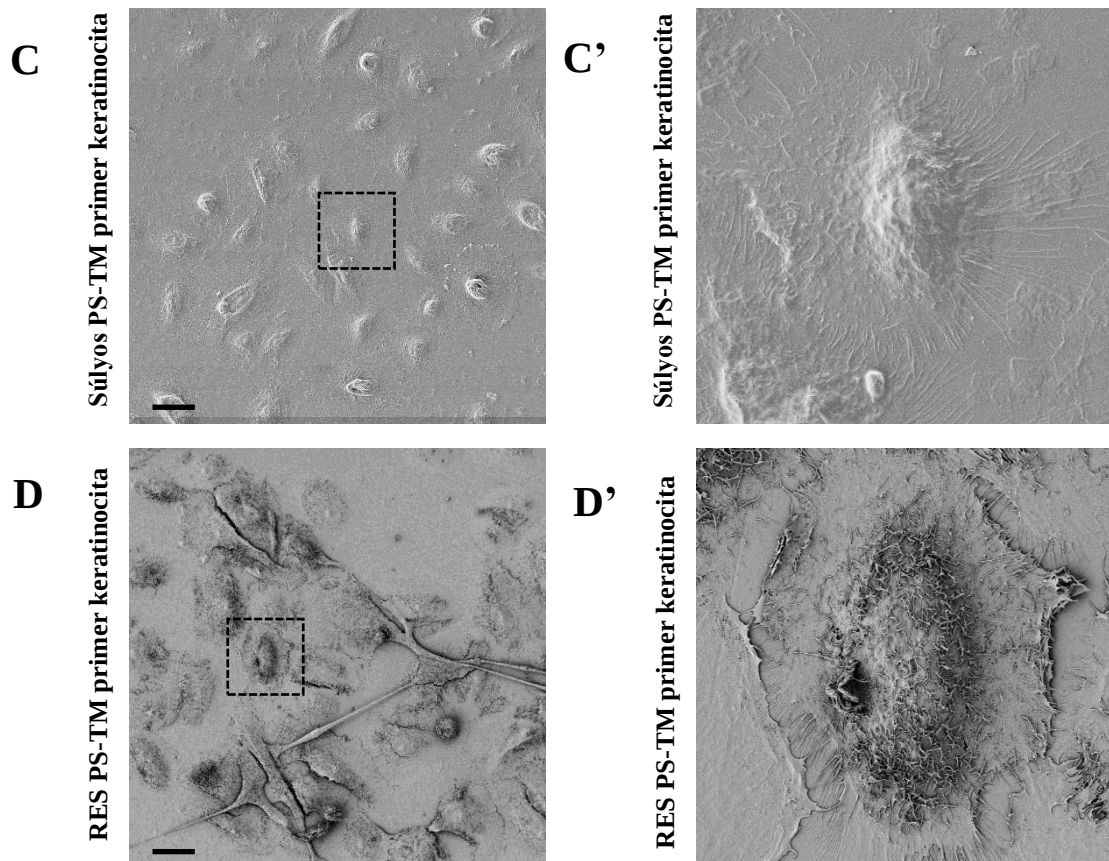
Azt tapasztaltuk, hogy a különböző súlyosságú és gyógyult minták morfológiailag eltérnek az egészséges sejtektől fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgálva. Ugyanolyan tenyésztési körülményeket alkalmazva, azonos kiindulási sejtszámmal, az egészséges kultúrák sejtjei főként szabályos alakot mutattak élesebb határokkal. Azonban a PS-TM csoportokban gyakrabban voltak megfigyelhetők a kevésbé szabályos alakú, és megnyúlt sejtek, ami leginkább a RES PS-TM csoportra volt jellemző (4. ábra).



4. ábra. Az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) primer keratinocita sejtenyészetek fáziskontraszt mikroszkóppal történő megfigyelése. **(A)** egészséges keratinocita sejtek. **(B-C)** enyhe és súlyos PS-TM keratinocita sejtek, **(D)** korábban léziós, resolved (RES PS-TM) keratinociták. n=3 donor csoportonként; reprezentatív képek ábrázolva, 10x nagyítás, Zeiss AxioVert mikroszkóp, Lépték: 100 μ m

Annak érdekében, hogy részletesebben megvizsgáljuk a különböző típusú keratinocita sejtek morfológiájában rejlő eltéréseket nagyfelbontású képeket készítettünk téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal. A legnagyobb különbséget a RES PS-TM és az egészséges minták között tapasztaltuk, a legnagyobb hasonlóságot pedig az enyhe és RES PS-TM minták mutatták. A RES PS-TM minták morfológiai jellegzetessége, hogy számos filopódium, illetve lamellipódium látható a felszínükön (5. ábra).





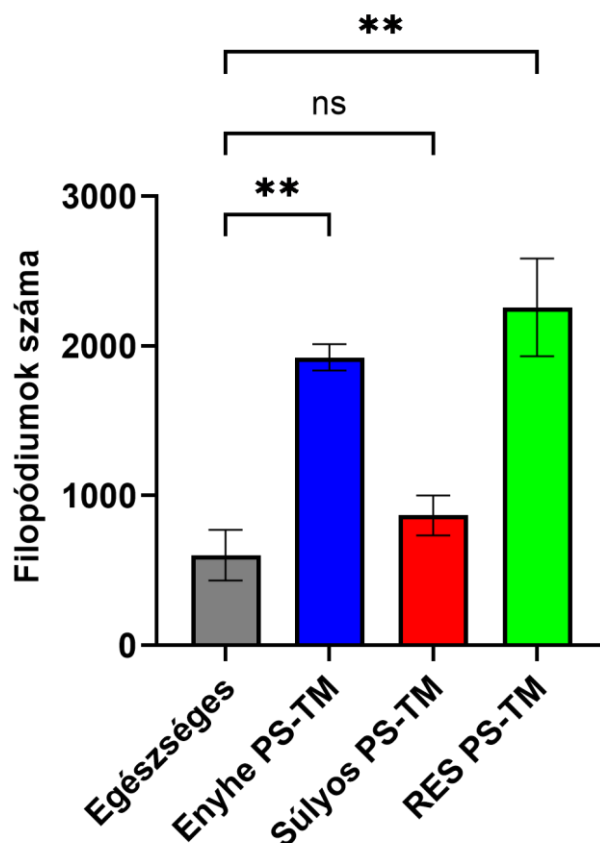
5. ábra. Az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) primer keratinocita sejtenyészetek téremissziós pásztázó elektronmikroszkóppal történő megfigyelése. **(A-A')** egészséges keratinocita sejtek, **(B-B')** enyhe PS-TM keratinociták, **(C-C')** súlyos PS-TM keratinociták, **(D-D')** korábban léziós, resolved (RES) PS-TM keratinociták. A szaggatott vonallal kijelölt területek nagyított nézete az **A', B', C'** és **D'** panelben látható. n=3 donor csoportonként (súlyos csoportban n=2); reprezentatív képek ábrázolva; Zeiss Sigma 300 mikroszkóp, Lépték: 30 μ m

A filopódiumok és lamellipódiumok a sejtek mozgásában és környezetérzékelésében kulcsszerepet játszó citoplazmatikus kinyúlások, amelyek különböző sejtípusokban, például keratinocitákban, fibroblasztokban és idegsejtekben jelennek meg. Mindkettő aktin-alapú struktúra, azonban különböző megjelenéssel és funkciókkal rendelkeznek. A filopódiumok hosszú, vékony, ujj-szerű kinyúlások, amelyek párhuzamos aktin filamentumokat tartalmaznak, és ezek nagy mechanikai stabilitást biztosítanak a struktúrának. Ezek a kinyúlások a sejtek környezetérzékelésében és a kapcsolódásban játszanak fontos szerepet, lehetővé téve a sejtek számára, hogy felismerjék és reagáljanak a különböző kémiai és mechanikai jelekre. Emellett a filopódiumok segítik a sejtek irányérzékelését, amikor például vonzó vagy taszító faktorokat azonosításával a környezetükben (Wood és Martin 2002).

A lamellipódiumok ezzel szemben széles, lapos, szalagszerű kinyúlások, amelyek a sejt előrehaladási irányában alakulnak ki, és hálózatos aktin filamentumokat tartalmaznak. Az aktin hálózat lazább elrendezése nagyobb felületet biztosít, ami fontos a mozgás során. Elsődleges feladatuk a sejt előrehaladásának biztosítása azáltal, hogy a sejtmembránt kinyújtják és új adhéziós kapcsolatokat alakítanak ki az aljzathoz. A lamellipódiumok így stabilizálják a sejtek mozgását és gyorsan alkalmazkodnak a környezeti változásokhoz, ami különösen fontos a sebgyógyulás, a rákos sejtek inváziója, valamint a sejtek differenciálódása során (Sadhu és mtsai 2023).

Míg a filopódiumok irányérzékelésért és tájékozódásért felelnek, addig a lamellipódiumok konkrét előrehaladást biztosítanak. A két struktúra gyakran együttműködik: a filopódiumok elsőként érzékelik a környezet jeleit és megjelölik a mozgás irányát, amelyet a lamellipódiumok nagy felületükkel stabilizálnak és elősegítenek. Mindkét struktúra aktin-dinamikától függően folyamatosan alakul és visszahúzódik, lehetővé téve a sejtek számára a hatékony mozgást és a környezeti változásokhoz való alkalmazkodást.

Hogy meghatározzuk a filopódiumok számát, a Fiji szoftver FiloQuant pluginjét használtuk. Az elemzés során azt tapasztaltuk, hogy az enyhe és RES PS-TM minták keratinocita sejtjei szignifikánsan több filopódiummal rendelkeztek az egészséges sejtekhez képest (6. ábra).

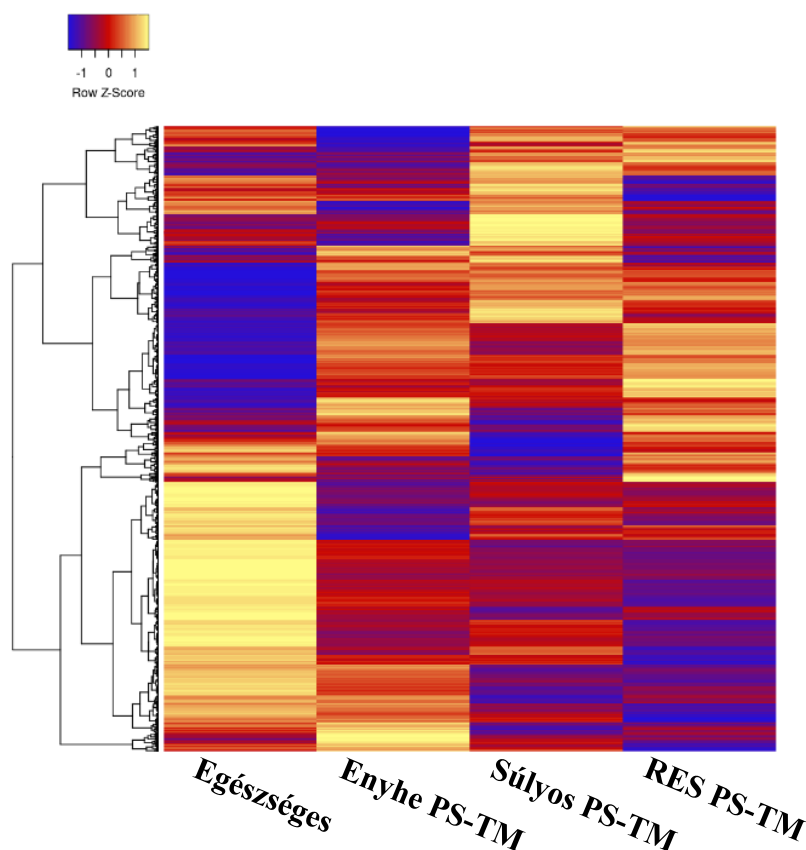


6. ábra. Az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) primer keratinocita sejtek filopódiumainak száma. X tengelyen a csoportok, Y tengelyen a filopódiumok száma látható. $n=3$ donor csoportonként (súlyos csoportban $n=2$); A donorok csoportonkénti átlaga ábrázolva $\pm$ az átlag standard hibája. Resolved (RES) PS-TM keratinociták. Statisztika: egyszempontos ANOVA Dunnett teszttel, ** $p < 0,01$; ns: nem szignifikáns

4.2 PS-TM keratinociták fehérje kifejeződési mintázata eltér az egészséges sejtektől

A különböző súlyosságú és RES PS-TM keratinocita sejtek morfológiájának különbségeiből adódó eltérések alapján feltételeztük, hogy molekuláris szinten is különbségeket mutatnak a sejtek, ezért elvégeztük a sejtek teljes proteomikai analízisét.

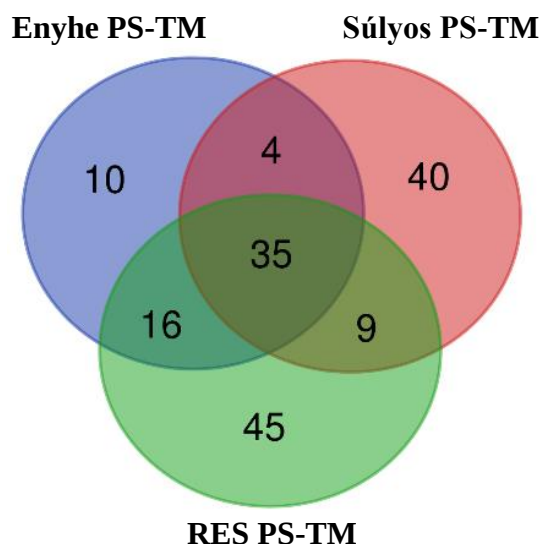
Az elemzés során azt tapasztaltuk, hogy mindhárom PS-TM csoport (enyhe PS-TM, súlyos PS-TM, RES PS-TM) fehérje kifejezése eltér az egészséges primer keratinocitáktól. Továbbá a legnagyobb különbséget a RES PS-TM és az egészséges minták között figyeltük meg. (7. ábra).



7. ábra. Az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) primer keratinocita sejttenyészetek teljes fehérje expressziós mintázata. A kék szín jelzi az alacsonyabb, a sárga pedig a magasabb expressziós szintet. n=3 donor csoportonként; csoportonkénti átlagok ábrázolva

4.3 A RES PS-TM keratinociták fehérje kifejezése tér el leginkább az egészséges sejtektől

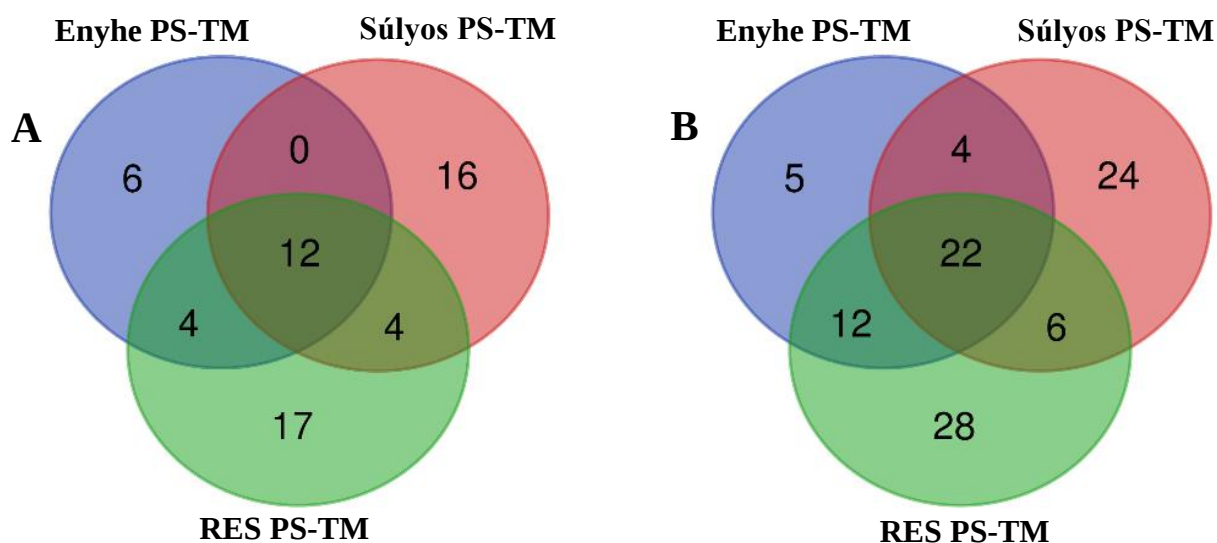
Ezt követően a proteomikai elemzésben kapott eredmények alapján kiválogattuk a differenciálisan expresszálódó, azaz legalább kétszeres változást mutató fehérjéket a PS-TM csoportokban az egészségeshez képest (Függelék A), melyeket a változást mutató fehérjék száma alapján venn-diagramon ábráztunk. Az összes kétszeres változót tartalmazó diagram alapján szintén megállapítható, hogy a RES PS-TM csoport különbözik leginkább az egészségestől. Az enyhe PS-TM és RES PS-TM közös halmaza a legnagyobb, az enyhe PS-TM és súlyos PS-TM közös halmaza pedig a legkisebb (8. ábra).



8. ábra. Kétszeresen változó fehérjék számszerinti eloszlása a különböző pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) bőrtípusokban. Korábban léziós, resolved PS-TM: RES PS-TM, n=3 donor csoportonként; csoportonkénti átlagok ábrázolva.

4.4 Sejt szeneszscencia és sejtciklus folyamataiban hasonlítanak leginkább a különböző PS-TM csoportok

Emellett a kétszeres változást mutató fehérjék közül külön válogattuk a növekedést és a csökkenést mutató fehérjéket. A mindhárom PS-TM csoportban változó fehérjékkel Reactome over-reprezentációs tesztet végeztünk a leginkább érintett folyamatok azonosítására. A növekvő csoport fehérjei többségében a szeneszscencia különböző útvonalait, míg a csökkenő fehérjék pedig a mitotikus sejtciklust érintették (9. ábra).



C

Útvonal neve	p-érték	FDR*
Onkogén indukált szeneszscencia	1.16e-09	1.76e-07
Oxidatív stressz indukálta szeneszscencia	1.55e-07	1.18e-05
VENTX általi transzkripciós szabályozás	2.61e-07	1.31e-05
Sejtszeneszscencia	2.48e-06	9.42e-05
Sejtszeneszscencia betegségei	9.96e-06	2.49e-04

D

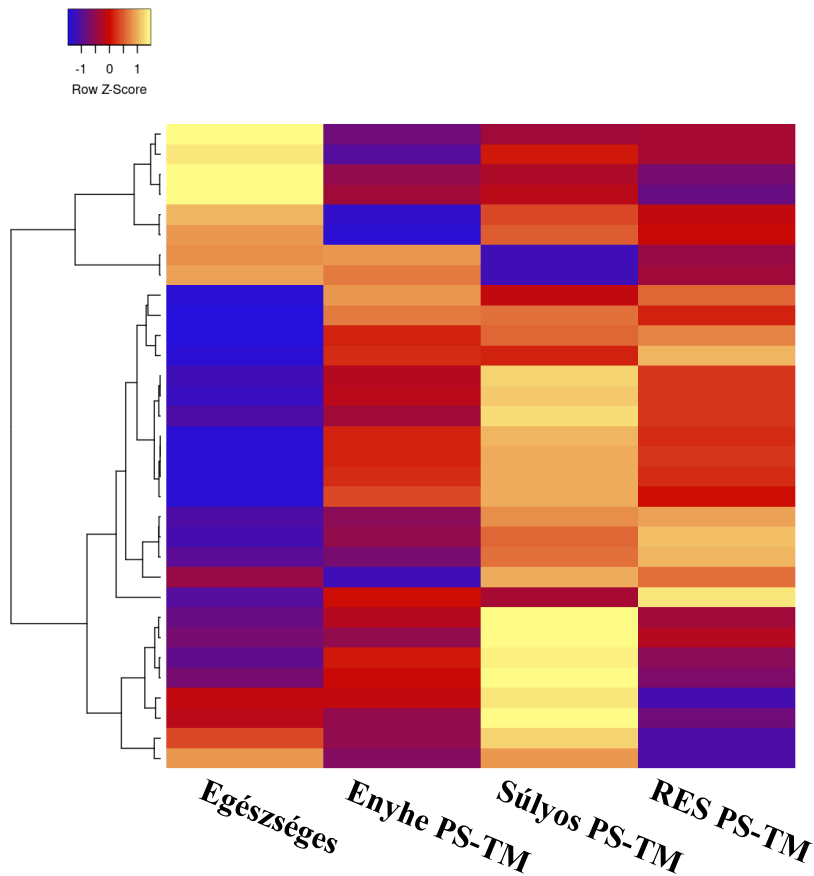
Útvonal neve	p-érték	FDR*
Sejtciklus, mitózis	1.11e-07	2.27e-05
Mitotikus G1 fázis és G1/S átmenet	7.78e-07	5.29e-05
Sejtciklus	7.89e-07	5.29e-05
G0 és korai G1	1.04e-06	5.29e-05
Kromatid kohézió feloldása	6.72e-06	2.76e-04

9. ábra. A pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) primer keratinociták kétszeres változó fehérjéinek eloszlása, és a leginkább érintett folyamatok. **(A)** Kétszeresen növekvő expressziót mutató fehérjék venn-diagramja és a **(C)** fehérjék által érintett útvonalak táblázata. **(B)** Kétszeresen csökkenő expressziót mutató fehérjék venn-diagramja és a **(D)** fehérjék által érintett útvonalak táblázata. FDR: false discovery rate; Korábban léziós, resolved PS-TM: RES PS-TM

4.5 RES PS-TM keratinociták sebgyógyulása eltérő

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján a tünetmentes keratinociták sebgyógyuláshoz hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek (Bozó és mtsai. 2021b; Flink és mtsai. 2023), valamint a morfológia vizsgálataink eredményei és a proteomikai eredmények a migrációban, a szeneszscenciában és a mitotikus folyamatokban mutattak eltéréseket a különböző PS-TM csoportokban az egészséges keratinocitákhoz képest, melyek szintén köthetők a sebgyógyuláshoz is, ezért a továbbiakban a sejtek viselkedésének tanulmányozásakor ezirányban vizsgáldtunk tovább.

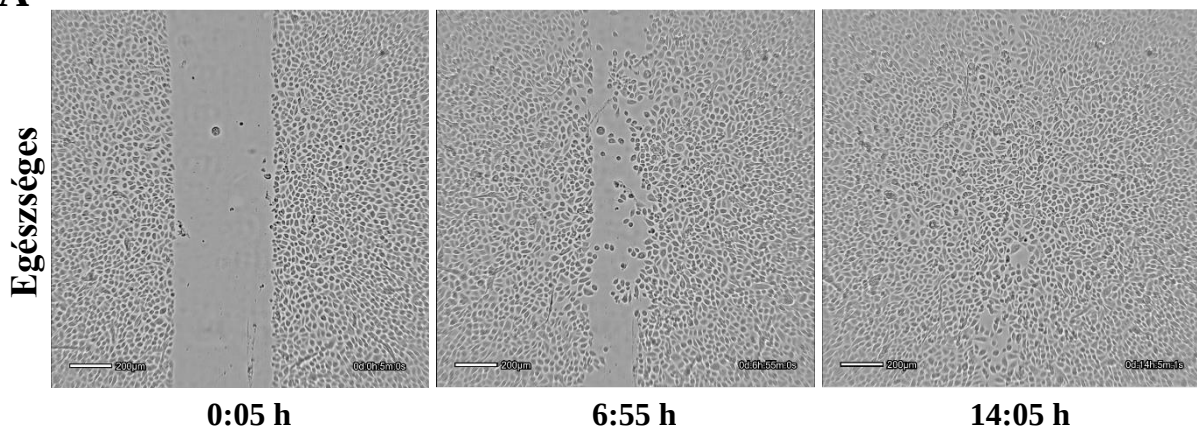
Először kiválogattuk a proteomikai eredmények közül a sebgyógyulási folyamatban résztvevő fehérjéket. Ezen esetben is megfigyelhető, hogy a RES PS-TM csoport különbözik leginkább az egészségestől (10. ábra).

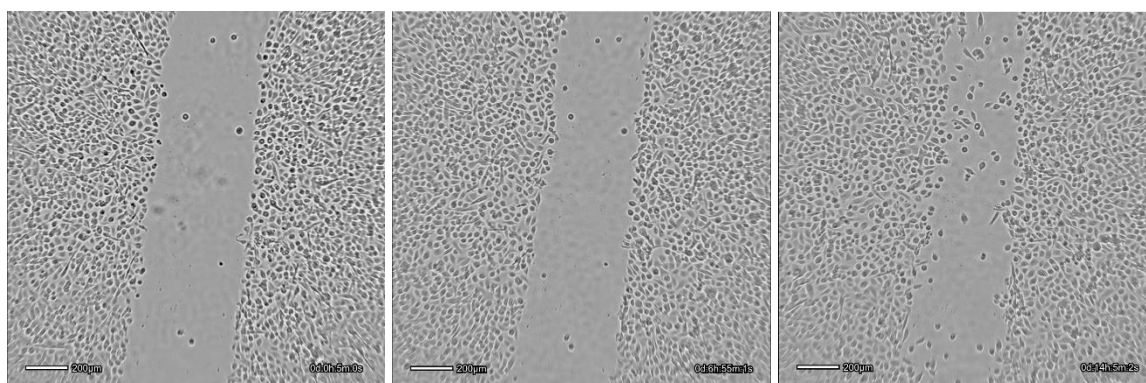
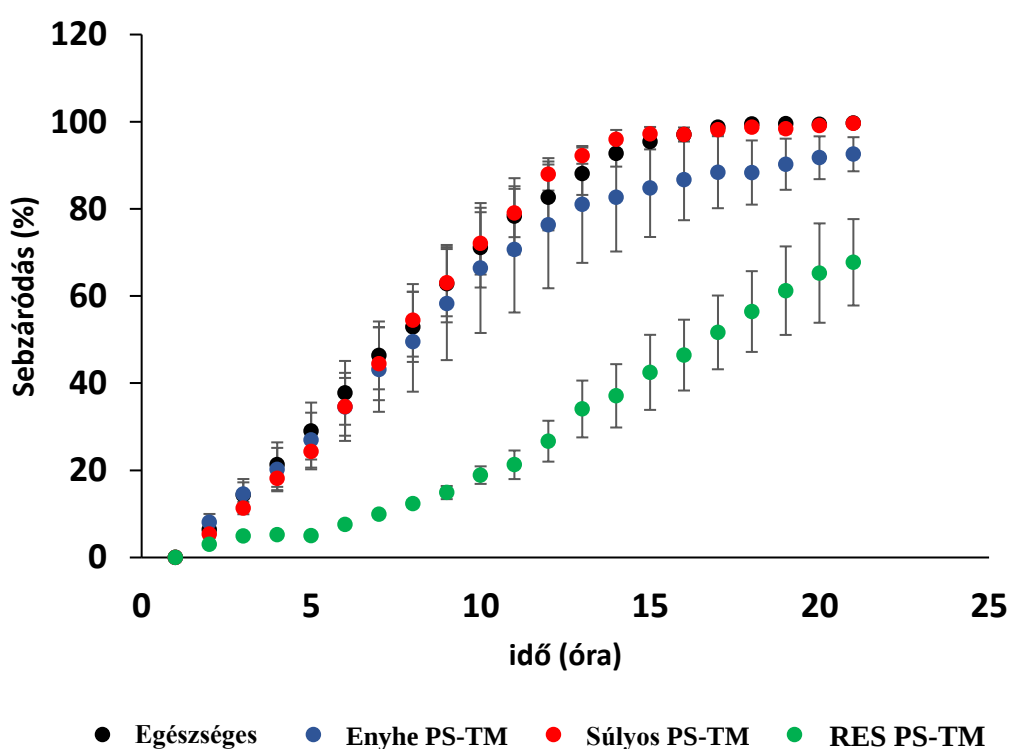


10. ábra. A Kétszeresen változó sebgyógyulási fehérjék eloszlása a különböző pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) bőrtípusokban. A kék szín jelzi az alacsonyabb, a sárga pedig a magasabb expressziós szintet. n=3 donor csoportonként; csoportonkénti átlagok ábrázolva; Korábban léziós, resolved PS-TM: RES PS-TM.

Megvizsgáltuk a különböző típusú primer keratinocita sejtenyészetek sebgyógyulási képességét *in vitro* sebgyógyulási modellben. Eredményeink során azt tapasztaltuk, hogy a RES PS-TM minták sebzáródása lassabb, ellenben a súlyos PS-TM keratinociták nem mutatnak eltérést az egészséges sejtekhez képest (11. ábra).

A

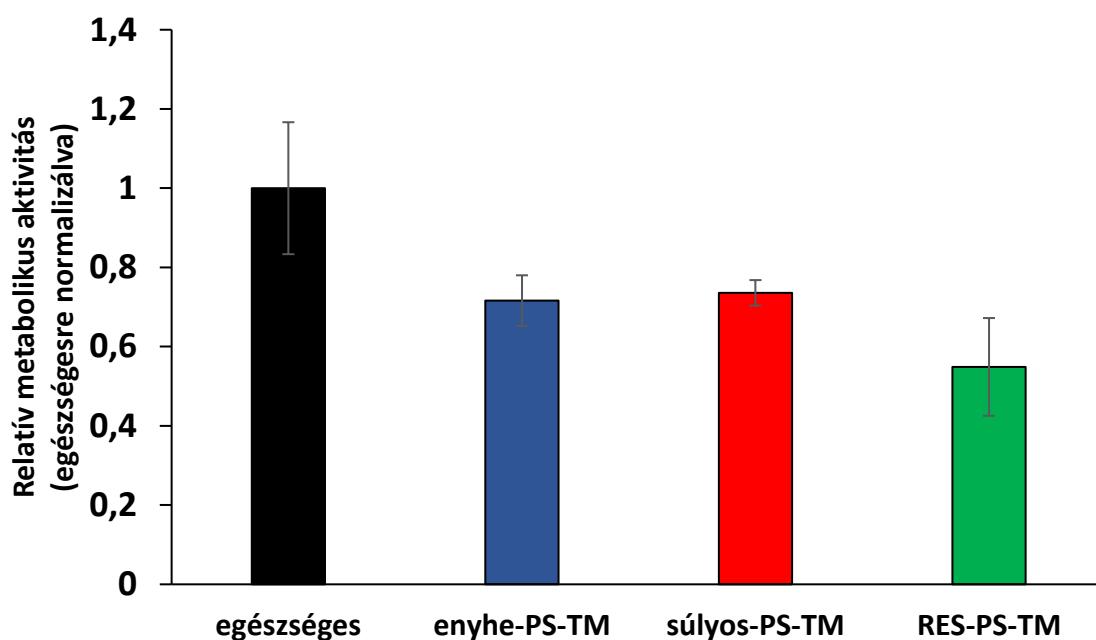


B**RES PS-TM****0:05 h****6:55 h****14:05 h****C**

11. ábra. Az egészséges és pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) primer keratinocita sejtenyészetek sebzáródásának vizsgálata. **(A-B)** A CytoSmart mikroszkóp által készített felvételek a sebzéstől számított 0:05, 6:55 és 14:05 órás időpontokban. **(A)** egészséges donor keratinocitái **(B)** resolved (RES) PS-TM donor keratinocitái. Reprezentatív képek; 10x-es nagyítás, Lépték: 200 μ m **(C)** A seb záródásának százalékos aránya a kiindulási sebhez viszonyítva. A donorok csoportonkénti átlaga ábrázolva +/- az átlag standard hibája

4.6 RES PS-TM keratinociták életképessége csökkenő tendenciát mutat

Ezt követően megvizsgáltuk a különböző sejtcsoportok életképességét a metabolikus aktivitásuk mérésének segítségével MTT esszével, amely alkalmas a sejtproliferációra irányuló vizsgálatokra. Ugyan a kapott eredmények nem szignifikánsak, de jól látható egy csökkenő tendencia az egészséges mintáktól a RES PS-TM sejtekig haladva (12. ábra).



12. ábra. Az egészséges és a különböző pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) primer keratinocita sejtenyészetek életképességének vizsgálata. A donorok csoportonkénti átlag értékei vannak ábrázolva, +/- az átlag standard hibája. n=3 donor csoportonként; Korábban léziós, resolved PS-TM: RES PS-TM.

5 Diszkusszió

A pikkelysömör (psoriasis) egy krónikus, immunmediált gyulladásos bőrbetegség, amely a bőr megvastagodását és jellegzetes plakkok kialakulását okozza, és nagyban befolyásolja az érintettek életminőségét. A pikkelysömörös bőrben a tünetmentes (nem léziós) keratinociták fontos szerepet játszanak, mivel bár ezek a sejtek makroszkopikusan egészségesnek tűnnek, valójában olyan molekuláris eltéréseket hordozhatnak, amelyek hajlamosíthatják a bőrt a betegség aktív stádiumára. Emellett a PS-TM keratinociták olyan sejtbiológiai jellemzőkkel is rendelkezhetnek, amelyek segíthetnek fenntartani a tünetmentes állapotot és megakadályozhatják az aktív léziók kialakulását (Kelemen és mtsai., 2021), köztes állapotot képviselve az egészséges és a pikkelysömörös tünetes bőr között (Nosbaum és mtsai. 2021;). A terápián átesett pikkelysömörös betegeknek a kezelés hatására tünetmentessé vált, RES PS-TM bőrterületei szintén számos elváltozást, közöttük epigenetikai módosulásokat hordoznak annak ellenére, hogy klinikailag a bőr tünetmentes (Ghaffarinia és mtsai. 2023).

Feltételeztük, hogy a különböző súlyosságú pikkelysömörös tünetmentes keratinocitáknak eltérhetnek a sejtbiológiai tulajdonságai az egészséges keratinocitákétól, melyeknek szerepe lehet a nem-léziós állapot fenntartásában. Ezért, munkánk során célul tűztük ki, hogy részletesen megvizsgáljuk az enyhe, súlyos és RES tünetmentes pikkelysömörös bőrből származó keratinocitákat, különös tekintettel azok morfológiai, molekuláris és funkcionális jellemzőire. A kutatás célja továbbá, hogy megvizsgáljuk, hogy a sejtek ezen, hogy a PS-TM keratinociták tényezőkkel hozzájárulhatnak-e a tünetmentes állapot fenntartásához.

A mikroszkópos vizsgálatok alapján az egészséges, enyhe és súlyos PS-TM, valamint RES PS-TM keratinociták morfológiai jellemzői különbözőek voltak az egészséges sejtekhez képest. Az elektronmikroszkópos képek feltárták, hogy ezek a különbségek főként abban nyilvánulnak meg, hogy a különböző sejtcsoportok eltérő számú filopódiummal és lamellipódiummal rendelkeznek, melyek a sejtek mozgásában és környezetérzékelésében kulcsszerepet játszanak (Wood és Martin 2002; Sadhu és mtsai 2023). A legtöbb ilyen citoplazmatikus függelék az enyhe és RES PS-TM mintákon volt megfigyelhető. Ez arra utal, hogy az enyhe és RES PS-TM sejteknek eltérőek lehetnek a sejt migrációs és sebgyógyulási tulajdonságai.

A proteomikai elemzések szintén jelentős különbségeket mutattak az egyes csoportok fehérjeprofiljában. Az enyhe, súlyos és RES PS-TM keratinociták fehérjeexpressziója eltért az

egészséges sejtekétől. A RES PS-TM minták kifejeződési mintázatát el leginkább az egészséges minták kifejezési mintázatától, ami arra utalhat, hogy a gyógyult állapot molekulárisan nem teljesen tér vissza az egészséges szintre.

Csoportunk korábbi irodalmi adatai arra utalnak, hogy sejtciklus gátló folyamatok (Bozó és mtsai. 2021a), és sejtproliferációt visszaszorító mechanizmus lehet jelen a PS-TM keratinocitákban (Bozó és mtsai. 2020). Proteomikai eredményeink alapján a szeneszenciával összefüggő jelátviteli útvonalak fehérjeexpressziójának növekedése, valamint a mitotikus sejtciklusban részt vevő fehérjék csökkent expressziója mindhárom csoportban arra utal, hogy a sejtek öregedésével és proliferációjának csökkenésével kapcsolatos folyamatok fokozottan jelen lehetnek a pikkelysömör súlyosságától függetlenül.

A sebgyógyulási kísérletek során, ahol a CytoSmart mikroszkóp segítségével követtük nyomon a sejtek viselkedését, azt tapasztaltuk, hogy a RES PS-TM keratinociták sebzáródása lassabb, mint az egészséges sejteké. Emellett a sebgyógyulási folyamatokban résztvevő fehérjék kifejeződése is a RES PS-TM sejtekben különbözött leginkább az egészséges sejtekétől. Csoportunk korábbi eredményei is arra utalnak, hogy a bazális membrán sérülések által kiváltott sebgyógyulási mechanizmus lehet jelen a PS-TM és a RES PS-TM bőrben (Flink és mtsai. 2023). A fenti eredmények alapján RES PS-TM keratinociták a gyógyulási folyamat során nem teljes mértékben térnek vissza az egészséges állapotukhoz. Emellett, a sejtleletképességet mérő MTT esszé eredményei alapján bár nem volt megfigyelhető szignifikáns különbség, de egy enyhe csökkenési tendencia látható az egészséges keratinocitákhoz képest a RES PS-TM minták irányába. Ez arra utalhat, hogy a gyógyult sejtek metabolikus aktivitása némileg alacsonyabb, ami az életképességük és regenerációs képességük csökkenésében nyilvánulhat meg.

Összességében a kutatásunk eredményei egyrészt arra engednek következtetni, hogy a RES PS-TM keratinociták nem teljesen térnek vissza az egészséges állapotba, proteomikai profiljuk és viselkedési mintázatuk alapján egy „köztes” állapotot képviselnek. A szeneszenciához kapcsolódó fehérjék fokozott jelenléte és a mitotikus folyamatok potenciális csökkenése arra utal, hogy a PS-TM keratinocitákban ezek az elváltozások hozzájárulhatnak ezen pikkelysömörös sejtek nem-hiperproliferatív állapotának fenntartásához. Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a pikkelysömörös bőr kezelése után is megmaradhatnak olyan molekuláris sajátosságok, amelyek elősegíthetik a betegség fellángolását.

6 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Bozó Renátának a kísérletek gyakorlati megvalósításában nyújtott segítségét, és a munka elkészítése során nyújtott szakmai tanácsokat.

Köszönöm Prof. Dr. Gyulai Rollandnak és Prof. Dr. Kemény Lajosnak, hogy biztosították, hogy a Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikáján végezhettem a TDK munkát. Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsannának pedig köszönöm, hogy az általa vezetett Sejtbiológia Laboratóriumban végezhettem a kutatásomhoz szükséges kísérleteket.

Dr. Flink Lili Borbálának és Kohajda Mónikának köszönöm a laborban nyújtott segítséget, Klinikánk Pikkelysömör Ambulanciájának Munkatársainak pedig a donoroktól történő mintavételeket.

HUN-REN-SZBK Proteomikai Kutatócsoport, Dr. Darula Zsuzsanna és Dr. Hunyadi-Gulyás Éva fehérvérjék tömegspektrometriás azonosításáért, és a HCEMM-USZ Functional Cell Biology and Immunology Advanced Core Facility, Dr. Ferhan Ayaydin és Farkas Attila pásztázó elektronminkorszkópos vizsgálatok biztosításáért ezúton is szeretnénk hálás köszönetet mondani.

Kutatásaink a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal OTKA PD138837, a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj és a Kulturális és Innovációs Minisztérium Egyetemi Kutatói Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült (EKÖP-24-2-SZTE-473 és EKÖP-24-4-SZTE-370)

7 Irodalomjegyzék

- Armstrong, A. W., Puig, L., Joshi, A., Skup, M., Williams, D., Li, J., Betts, K. A., & Augustin, M. (2020). Comparison of Biologics and Oral Treatments for Plaque Psoriasis: A Meta-analysis. *JAMA dermatology*, 156(3), 258–269. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2019.4029>
- Armstrong, A. W., & Read, C. (2020). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA*, 323(19), 1945–1960. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4006>
- Ashcroft, D. M., Li Wan Po, A., Williams, H. C., & Griffiths, C. E. (1998). Quality of life measures in psoriasis: a critical appraisal of their quality. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 23(5), 391–398. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.1998.00181.x>
- Augustin, M., Reich, K., Blome, C., Schäfer, I., Laass, A., & Radtke, M. A. (2010). Nail psoriasis in Germany: epidemiology and burden of disease. *The British journal of dermatology*, 163(3), 580–585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09831.x>
- Baker, B. S., Swain, A. F., Fry, L., & Valdimarsson, H. (1984). Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis. *The British journal of dermatology*, 110(5), 555–564. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1984.tb04678.x>
- Bozó, R., Szél, E., Danis, J., Gubán, B., Bata-Csörgő, Z., Szabó, K., Kemény, L., & Groma, G. (2020). Cartilage Oligomeric Matrix Protein Negatively Influences Keratinocyte Proliferation via $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin: Potential Relevance of Altered Cartilage Oligomeric Matrix Protein Expression in Psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*, 140(9), 1733–1742.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.12.037>
- Bozó, R., Danis, J., Flink, L. B., Vidács, D. L., Kemény, L., & Bata-Csörgő, Z. (2021a). Stress-Related Regulation Is Abnormal in the Psoriatic Uninvolved Skin A. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(7), 599. <https://doi.org/10.3390/life11070599>
- Bozó, R., Flink, L. B., Belső, N., Gubán, B., Széll, M., Kemény, L., & Bata-Csörgő, Z. (2021b). Could basement membrane alterations, resembling micro-wounds at the dermo-epidermal junction in psoriatic non-lesional skin, make the skin susceptible to lesion formation? *B. Experimental dermatology*, 30(6), 765–772. <https://doi.org/10.1111/exd.14267>
- Cheuk, S., Wikén, M., Blomqvist, L., Nylén, S., Talme, T., Ståhle, M., & Eidsmo, L. (2014). Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(7), 3111–3120. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302313>
- Di Meglio, P., Perera, G. K., & Nestle, F. O. (2011). The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity*, 35(6), 857–869. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.003>
- Dupire, G., Droitcourt, C., Hughes, C., & Le Cleach, L. (2019). Antistreptococcal interventions for guttate and chronic plaque psoriasis. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3(3), CD011571. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011571.pub2>

- Flink, L. B., Ghaffarinia, A., Papp, B. T., Varga, Á., Vigh, A. I., Vidács, D. L., Kui, R., Kemény, L., Bata-Csörgő, Z., & Bozó, R. (2023). Abnormal basement membrane results in increased keratinocyte-derived periostin expression in psoriasis similar to wound healing. *Scientific reports*, 13(1), 16386. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43396-0>
- Ghaffarinia, A., Ayaydin, F., Póliska, S., Manczinger, M., Bolla, B. S., Flink, L. B., Balogh, F., Veréb, Z., Bozó, R., Szabó, K., Bata-Csörgő, Z., & Kemény, L. (2023). Psoriatic Resolved Skin Epidermal Keratinocytes Retain Disease-Residual Transcriptomic and Epigenomic Profiles. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4556. <https://doi.org/10.3390/ijms24054556>
- Gold, L. S., Lebwohl, M. G., Sugarman, J. L., Pariser, D. M., Lin, T., Martin, G., Pillai, R., Israel, R., & Ramakrishna, T. (2018). Safety and efficacy of a fixed combination of halobetasol and tazarotene in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: Results of 2 phase 3 randomized controlled trials. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 79(2), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.040>
- Griffiths, C. E. M., Armstrong, A. W., Gudjonsson, J. E., & Barker, J. N. W. N. (2021). Psoriasis. *Lancet (London, England)*, 397(10281), 1301–1315. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32549-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32549-6)
- Gubán, B., Vas, K., Balog, Z., Manczinger, M., Bebes, A., Groma, G., Széll, M., Kemény, L., & Bata-Csörgő, Z. (2016). Abnormal regulation of fibronectin production by fibroblasts in psoriasis. *The British journal of dermatology*, 174(3), 533–541. <https://doi.org/10.1111/bjd.14219>
- Hatta, N., Takata, M., Kawara, S., Hirone, T., & Takehara, K. (1997). Tape stripping induces marked epidermal proliferation and altered TGF- α expression in non-lesional psoriatic skin. *Journal of dermatological science*, 14(2), 154–161. [https://doi.org/10.1016/s0923-1811\(96\)00567-1](https://doi.org/10.1016/s0923-1811(96)00567-1)
- Krueger, G. G., Feldman, S. R., Camisa, C., Duvic, M., Elder, J. T., Gottlieb, A. B., Koo, J., Krueger, J. G., Lebwohl, M., Lowe, N., Menter, A., Morison, W. L., Prystowsky, J. H., Shupack, J. L., Taylor, J. R., Weinstein, G. D., Barton, T. L., Rolstad, T., & Day, R. M. (2000). Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: what defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis?. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(2 Pt 1), 281–285. <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.106374>
- Lowes, M. A., Suárez-Fariñas, M., & Krueger, J. G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annual review of immunology*, 32, 227–255. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120225>
- Martin, B. A., Chalmers, R. J., & Telfer, N. R. (1996). How great is the risk of further psoriasis following a single episode of acute guttate psoriasis?. *Archives of dermatology*, 132(6), 717–718. <https://doi.org/10.1001/archderm.1996.03890300147032>
- Mckenna, K. E., & Stern, R. S. (1996). The outcomes movement and new measures of the severity of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(3), 534–538. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(96\)90469-7](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(96)90469-7)

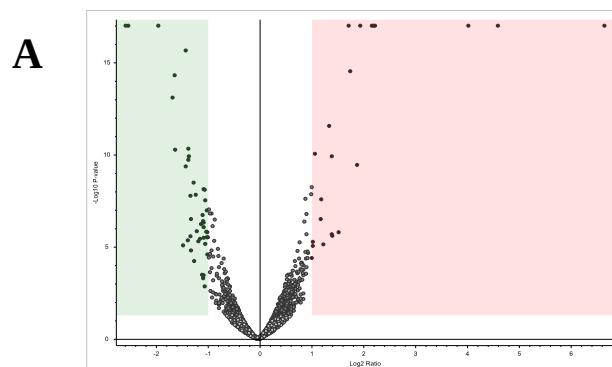
- Menter, A., Thaçi, D., Wu, J. J., Abramovits, W., Kerdel, F., Arian, D., Guo, D., Ganguli, A., Bereswill, M., Camez, A., & Valdecantos, W. C. (2017). Long-Term Safety and Effectiveness of Adalimumab for Moderate to Severe Psoriasis: Results from 7-Year Interim Analysis of the ESPRIT Registry. *Dermatology and therapy*, 7(3), 365–381. <https://doi.org/10.1007/s13555-017-0198-x>
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H., & Barker, J. (2009). Psoriasis. *The New England journal of medicine*, 361(5), 496–509. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804595>
- Nosbaum, A., Dahel, K., Goujon, C., Nicolas, J. F., Mengeaud, V., & Vocanson, M. (2021). Psoriasis is a disease of the entire skin: non-lesional skin displays a prepsoriasis phenotype. *European journal of dermatology : EJD*, 31(2), 143–154. <https://doi.org/10.1684/ejd.2021.4015>
- Placek, W., Haftek, M., & Thivolet, J. (1988). Sequence of changes in psoriatic epidermis. Immunocompetent cell redistribution precedes altered expression of keratinocyte differentiation markers. *Acta dermato-venereologica*, 68(5), 369–377.
- Prens, E. P., Benne, K., van Joost, T., & Benner, R. (1991). The autologous mixed epidermal cell-T lymphocyte reaction is elevated in psoriasis: a crucial role for epidermal HLA-DR+/CD1a- antigen-presenting cells. *The Journal of investigative dermatology*, 96(6), 880–887. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12475275>
- Qiao, P., Guo, W., Ke, Y., Fang, H., Zhuang, Y., Jiang, M., Zhang, J., Shen, S., Qiao, H., Dang, E., & Wang, G. (2019). Mechanical Stretch Exacerbates Psoriasis by Stimulating Keratinocyte Proliferation and Cytokine Production. *The Journal of investigative dermatology*, 139(7), 1470–1479. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.12.019>
- Rapp, S. R., Feldman, S. R., Exum, M. L., Fleischer, A. B., Jr, & Reboussin, D. M. (1999). Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41(3 Pt 1), 401–407. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(99\)70112-x](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(99)70112-x)
- Ryan, C., Sadlier, M., De Vol, E., Patel, M., Lloyd, A. A., Day, A., Lally, A., Kirby, B., & Menter, A. (2015). Genital psoriasis is associated with significant impairment in quality of life and sexual functioning. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 72(6), 978–983. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.02.1127>
- Sadhu, R. K., Iglič, A., & Gov, N. S. (2023). A minimal cell model for lamellipodia-based cellular dynamics and migration. *Journal of cell science*, 136(14), jcs260744. <https://doi.org/10.1242/jcs.260744>
- Singh, J. A., Guyatt, G., Ogdie, A., Gladman, D. D., Deal, C., Deodhar, A., Dubreuil, M., Dunham, J., Husni, M. E., Kenny, S., Kwan-Morley, J., Lin, J., Marchetta, P., Mease, P. J., Merola, J. F., Miner, J., Ritchlin, C. T., Siaton, B., Smith, B. J., Van Voorhees, A. S., ... Reston, J. (2019). Special Article: 2018 American College of Rheumatology/National Psoriasis Foundation Guideline for the Treatment of Psoriatic Arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 71(1), 5–32. <https://doi.org/10.1002/art.40726>

- Singh, S., Taylor, C., Kornmehl, H., & Armstrong, A. W. (2017). Psoriasis and suicidality: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 77(3), 425–440.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.05.019>
- Sonkoly, E., Bata-Csorgo, Z., Pivarcsi, A., Polyanka, H., Kenderessy-Szabo, A., Molnar, G., Szentpali, K., Bari, L., Megyeri, K., Mandi, Y., Dobozy, A., Kemeny, L., & Szell, M. (2005). Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. *The Journal of biological chemistry*, 280(25), 24159–24167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501704200>
- Stern, R. S., & PUVA Follow-Up Study (2012). The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(4), 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.04.004>
- Szél, E., Bozó, R., Hunyadi-Gulyás, É., Manczinger, M., Szabó, K., Kemény, L., Bata-Csörgő, Z., & Groma, G. (2019). Comprehensive Proteomic Analysis Reveals Intermediate Stage of Non-Lesional Psoriatic Skin and Points out the Importance of Proteins Outside this Trend. *Scientific reports*, 9(1), 11382. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47774-5>
- Uyemura, K., Yamamura, M., Fivenson, D. F., Modlin, R. L., & Nickoloff, B. J. (1993). The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *The Journal of investigative dermatology*, 101(5), 701–705. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371679>
- Weinstein, G. D., Krueger, G. G., Lowe, N. J., Duvic, M., Friedman, D. J., Jegasothy, B. V., Jorizzo, J. L., Shmunis, E., Tschien, E. H., Lew-Kaya, D. A., Lue, J. C., Sefton, J., Gibson, J. R., & Chandraratna, R. A. (1997). Tazarotene gel, a new retinoid, for topical therapy of psoriasis: vehicle-controlled study of safety, efficacy, and duration of therapeutic effect. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 37(1), 85–92. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(97\)70216-0](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(97)70216-0)
- Weiss, G., Shemer, A., & Trau, H. (2002). The Koebner phenomenon: review of the literature. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 16(3), 241–248. <https://doi.org/10.1046/j.1473-2165.2002.00406.x>
- Winterfield, L. S., Menter, A., Gordon, K., & Gottlieb, A. (2005). Psoriasis treatment: current and emerging directed therapies. *Annals of the rheumatic diseases*, 64 Suppl 2(Suppl 2), ii87–ii92. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.032276>
- Wood, W., & Martin, P. (2002). Structures in focus--filopodia. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(7), 726–730. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(01\)00172-8](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00172-8)
- Xie, S., Chen, Z., Wang, Q., Song, X., & Zhang, L. (2014). Comparisons of gene expression in normal, lesional, and non-lesional psoriatic skin using DNA microarray techniques. *International journal of dermatology*, 53(10), 1213–1220. <https://doi.org/10.1111/ijd.12476>
- Zhou, X., Krueger, J. G., Kao, M. C., Lee, E., Du, F., Menter, A., Wong, W. H., & Bowcock, A. M. (2003). Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by

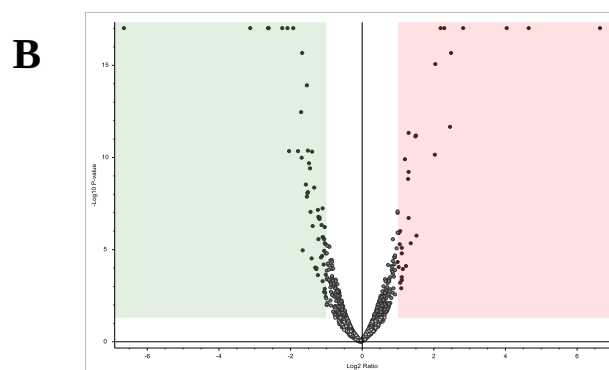
profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiological genomics*, 13(1), 69–78. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00157.2002>

8 Függelék

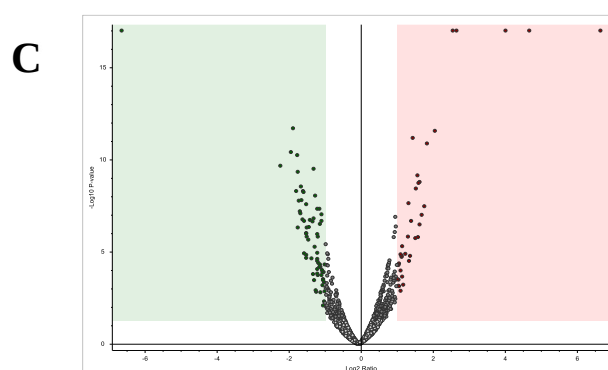
8.1 Függelék A



Egészséges/Enyhe PS-TM



Egészséges/Súlyos PS-TM



Egészséges/RES PS-TM

Függelék A: Az egészséges és a pikkelysömörös tünetmentes (PS-TM) keratinociták proteomikai eredményeinek összehasonlítása vulkán diagram segítségével. **(A)** Egészséges/Enyhe PS-TM. **(B)** Egészséges/Súlyos PS-TM. **(C)** Egészséges/RES PS-TM. X tengelyen log2 fold change értékek, Y tengelyen $-\log_{10}$ p-értékek vannak ábrázolva. Az elemzéshez background t-tesztet alkalmaztunk. $p < 0,05$

9 Tételes szerzői hozzájárulás

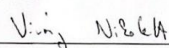
A 37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK 2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Virág Nikolett** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **Különböző pikkelysömörös tünetmentes bőrtípusokból tenyésztett keratinociták eltérő proteomikai összetétellel rendelkeznek** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt¹:

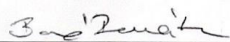
Részfeladat ²	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán [#] jellemezve)
<i>Keratinocita sejtek tenyésztése</i>	3
<i>Keratinociták fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálata</i>	4
<i>Páztázó elektronmikroszkópos eredmények kiértékelése</i>	5
<i>Proteomikai mintavétel és a proteomikai adatok elemzése</i>	4
<i>CytoSmart mikroszkópos sebgyógyulás vizsgálat kivitelezésében</i>	3
<i>Sebgyógyulási vizsgálat eredményeinek kiértékelése</i>	5
<i>MTT esszé kivitelezése és kiértékelése</i>	5

Kelt: Szeged, 2024.11.08.



Virág Nikolett

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Bozó Renáta, SZTE SZAOK Bőrgyógyászati és
Allergológiai Klinika

¹ A kutatási projekt azon részfeladatait, amelyekben egyáltalán nem vett részt, ne tüntesse fel a listában.

² Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható, bővíthető.