

„Rola białka Hsp90 w atopowym zapaleniu skóry”

mgr Krzysztof Sitko

Białka szoku termicznego (HSP, ang. *Heat Shock Proteins*) to grupa wysoce ewolucyjnie konserwowanych białek opiekuńczych (ang. *chaperones*) oraz proteaz, występujących we wszystkich poznanych organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Białka HSP klasyfikuje się według masy cząsteczkowej wyrażonej w kilodaltonach (kDa) do rodzin: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 oraz sHSP (małych białek szoku termicznego). Ich aktywność, zarówno ATP-niezależna, jak i zależna od ATP, wspomaga procesy dojrzewania białek, ponownego fałdowania białek zdenaturowanych, stabilizacji ich natywnej struktury, degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek oraz transportu polipeptydów. Na początku lat dziewięćdziesiątych minionego wieku N-końcowa domena HSP90 (NTD, ang. *N-terminal domain*) została rozpoznana jako potencjalny cel molekularny w terapii nowotworów. Najnowsze badania wskazują również na udział HSP90 w rozwoju nieinfekcyjnych chorób zapalnych i autoimmunologicznych. HSP90 odpowiada za regulację aktywności ponad 300 substratów białkowych, w tym kinaz, ligaz ubikwitynowych, receptorów steroidowych, cyklin i czynników transkrypcyjnych, które uczestniczą w podstawowych procesach komórkowych, takich jak przeżycie, wzrost, różnicowanie i apoptoza. U ssaków wyróżnia się cztery główne izoformy HSP90: GRP94 (zlokalizowaną w retikulum endoplazmatycznym), TRAP-1 (obecną w mitochondriach) oraz izoformy cytoplazmatyczne – HSP90 α i HSP90 β . HSP90 β ulega konstytutywnej ekspresji, natomiast ekspresja HSP90 α może być indukowana przez różnego rodzaju stresory komórkowe, takie jak stres oksydacyjny, promieniowanie UV czy hipertermia. HSP90 α może być także wydzielana do środowiska zewnątrzkomórkowego (eHSP90 α), gdzie pełni funkcje sygnalizacyjne i immunomodulacyjne, m.in. uczestniczy w procesach gojenia ran, angiogenezy i metastazy. Co istotne, eHSP90 α może indukować odpowiedź humoralną prowadzącą do wytwarzania przeciwciał anti-HSP90, których podwyższone stężenie obserwowano w niektórych chorobach autoimmunologicznych. Inhibitory aktywności chaperonowej HSP90, takie jak 17-AAG i STA-9090, wiążą się z domeną NTD z większym powinowactwem niż ATP, co prowadzi do proteasomalnej degradacji białek zależnych od HSP90. Uważa się, że immunosupresyjny efekt tego typu inhibicji może wynikać m.in. z aktywacji czynnika transkrypcyjnego HSF-1, który reguluje ekspresję genów immunoregulacyjnych, takich jak HSP70 i IL-10; ekspansji immunosupresyjnych

populacji limfocytów T i B regulatorowych; inaktywacji prozapalnych czynników zależnych od NF- κ B; oraz blokowania szlaków sygnalizacyjnych, takich jak JAK-STAT i MAPK.

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest jedną z najczęstszych przewlekłych chorób zapalnych skóry, o globalnej częstości występowania do 15-30% u dzieci i 2-10% u dorosłych. Jest to schorzenie o podłożu alergicznym, charakteryzujące się intensywnym neurogennym świądem oraz nawracającymi zmianami skórnymi w postaci rumienia, przesuszenia i nadżerek. Patogeneza AZS nie jest w pełni poznana, choć kluczowe znaczenie przypisuje się zaburzeniom ciągłości bariery skórnej. AZS wiąże się z mutacjami genu kodującego filagrynę – kluczowe białko barierowe – co prowadzi do zwiększonej aktywacji układu odpornościowego. Zaburzenia immunologiczne wywołują stan zapalny, który wtórnie uszkadza barierę skórną, zaburza mikrobiom i ułatwia penetrację alergenów. W patogenezie AZS udział biorą różne populacje komórkowe, w tym subpopulacje limfocytów pomocniczych Th1, Th2 i Th17, których nadmierna aktywacja prowadzi do nasilonej produkcji cytokin prozapalnych. Aktywacja limfocytów T sprzyja również proliferacji, migracji i aktywacji eozynofili. Istotną rolę odgrywają także keratynocyty, fibroblasty i komórki dendrytyczne, które wydzielają liczne cytokiny, mediatory, chemokiny i alarminy. U około 80% pacjentów z AZS stwierdza się podwyższone stężenie krążących IgE, które mogą aktywować komórki tuczne. Leczenie AZS ma charakter indywidualny i ukierunkowane jest na odbudowę bariery naskórkowej, redukcję stanu zapalnego oraz łagodzenie świądu. Obejmuje ono stosowanie emolientów, miejscowych kortykosteroidów lub inhibitorów kalcyneuryny, a w cięższych przypadkach ogólnoustrojową immunosupresję lub leczenie biologiczne. Mimo skuteczności leczenia objawowego, żadna z obecnych terapii nie prowadzi do trwałego wyleczenia, a ich stosowanie wiąże się z ryzykiem działań niepożądanych.

Celem niniejszej rozprawy było zbadanie roli HSP90 w rozwoju AZS oraz ocena wpływu inhibicji HSP90 za pomocą STA-9090 i 17-AAG, na procesy zapalne charakterystyczne dla AZS, zarówno *in vitro*, jak i w mysim modelu choroby.

W toku badań wykazano istotnie wyższe stężenie eHSP90α oraz przeciwciał IgE anti-HSP90α w surowicy pacjentów z AZS w porównaniu do dopasowanej grupy kontrolnej. Zaobserwowano również dodatnią korelację pomiędzy poziomem eHSP90α a nasileniem objawów choroby ocenianych w skali SCORAD (ang. *Scoring Atopic Dermatitis*). Swoistość eHSP90α jako biomarkera AZS potwierdzono poprzez analizę porównawczą z opryszczkowatym zapaleniem skóry (DH, łac. *Dermatitis herpetiformis*, choroba Duhringa), co może mieć znaczenie w diagnostyce różnicowej. W tym badaniu 83,9% (26/31) pacjentów z AZS miało podwyższone stężenie HSP90α, w porównaniu do 0% (0/26) pacjentów z DH. Kolejnym etapem badań zmierzających do określenia roli Hsp90 w patogenezie AZS były eksperymenty prowadzone w mysim modelu AZS, indukowanym przez naskórną aplikację 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (DNCB). Dootrzewnowe podanie STA-9090 prowadziło do istotnego zmniejszenia aktywności choroby (w ocenie skali SCORAD), redukcji hiperplazji naskórka, mniejszej infiltracji leukocytów oraz łagodzenia świądu. Również aplikacja miejscowa STA-9090 obniżała aktywność choroby, zmniejszała poziom IgE w surowicy i zwiększała ekspresję filagryny w skórze. Obie formy terapii były dobrze tolerowane i nie wywoływały skutków ubocznych. Z uwagi na większą skuteczność oraz potencjał aplikacyjny, dalsze badania przedkliniczne skoncentrowano na miejscowej inhibicji HSP90 za pomocą 17-AAG. Terapia ta zmniejszała aktywność choroby, redukowała hiperplazję naskórka oraz obniżała ekspresję TSLP, IL-5, IL-6 oraz aktywność NF-κB w skórze. Obserwowano również spadek liczby eozynofili we krwi oraz obniżenie aktywności peroksydazy eozynofilowej (EPX) w skórze. Immunosupresyjny efekt 17-AAG na ograniczenie produkcji alarmin, cytokin charakterystycznych dla odpowiedzi typu Th oraz reaktywnych form tlenu został dodatkowo rozwinięty w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich hodowli keratynocytów, limfocytów T CD4+ oraz eozynofili stymulowanych odpowiednimi czynnikami zapalnymi. Co istotne, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) wykazało, że miejscowa terapia 17-AAG częściowo przywraca równowagę mikrobiomu jelitowego u myszy z AZS. Ponadto wykazano, że 17-AAG zmniejsza zdolność *Staphylococcus aureus* do produkcji biofilmu – patogenu oportunistycznego uznawanego za istotny w patogenezie AZS ze względu na jego rolę jako źródła superantygenów oraz czynnika zaostrzającego przebieg choroby. Zaobserwowano również zwiększoną aktywność (=deacetylację) HSP90 oraz wzrost aktywności EPX w leukocytach izolowanych od pacjentów z AZS. Dodatkowo, badania *in vitro* wykazały,

że inhibicja aktywności chaperonowej HSP90 prowadzi do zwiększonej acetylacji HSP90 α , co może częściowo wyjaśniać obserwowane efekty immunomodulujące i terapeutyczne u zwierząt.

Uzyskane w ramach rozprawy wyniki po raz pierwszy wskazują na istotną rolę HSP90 w patogenezie atopowego zapalenia skóry. Co szczególnie ważne, wykazano potencjał diagnostyczny eHSP90 α jako biomarkera AZS oraz potencjał terapeutyczny inhibicji HSP90 - zwłaszcza w formie terapii miejscowej - w łagodzeniu objawów choroby. Otwiera to nowe perspektywy dla opracowania bardziej skutecznych, ukierunkowanych terapii oraz narzędzi diagnostycznych w leczeniu AZS.