

**„Badanie immunomodulacyjnych właściwości zewnątrzkomórkowych
białek szoku termicznego w kontekście rozwoju i terapii wybranych
chorób autoimmunologicznych”
mgr Jagoda Mantej**

Choroby autoimmunologiczne dotyczą 5-8% światowej populacji, stanowiąc globalny problem społeczno-ekonomiczny. Obecnie scharakteryzowano około 80 chorób autoimmunologicznych, od ogólnoustrojowych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), po narządowo-specyficzne, takie jak łuszczyca oraz autoimmunologiczne choroby pęcherzowe skóry. Choroby autoimmunologiczne charakteryzują się utratą tolerancji immunologicznej na własne antygeny (autoantygeny) prowadząc do przewlekłego stanu zapalnego, w którym pośredniczą elementy pierwotnej i nabytej (wtórnej) odpowiedzi immunologicznej. Choroby te cechuje szczególnie zaburzona równowaga pomiędzy prozapalnymi limfocytami T pomocniczymi (Th) (np. Th1 lub Th17) a limfocytami T regulatorowymi (Treg) oraz obecność autoreaktywnych limfocytów T lub B (Sarhan i wsp. 2018; Rydzewska i wsp. 2018; Geng i wsp. 2020; Yan i wsp. 2020; Fugger i wsp. 2020). Ponieważ niewystarczająca aktywność lub liczba limfocytów Treg jest jedną z przyczyn utraty tolerancji immunologicznej (Long i Buckner, 2011), uzasadnione są strategie terapeutyczne mające na celu indukcję immunosupresyjnych komórek regulatorowych lub zapobieganie niekontrolowanej aktywacji komórek autoreaktywnych i efektorowych.

Chociaż poczyniono znaczne postępy w identyfikacji kluczowych komórek układu immunologicznego zaangażowanych w rozwój lub progresji licznych chorób autoimmunologicznych, ich terapię pozostają wyzwaniem i nadal bazują na konwencjonalnym leczeniu immunosupresyjnym polegającym na zastosowaniu kortykosteroidów, a także zaawansowanych terapii z wykorzystaniem leków biologicznych. Terapie te skupiają się głównie na wyciszeniu procesu zapalnego. Niestety, rzadko pozwalają na osiągnięcie trwałej immunotolerancji i równowagi między ochronnym działaniem układu immunologicznego (tj. przeciwko mikroorganizmom) a reakcją autoimmunologiczną. Ponadto nie każda terapia konwencjonalna jest skuteczna i może prowadzić do poważnych skutków ubocznych. Dlatego uzasadnione jest poszukiwanie nowszych, bezpieczniejszych i skuteczniejszych terapii chorób autoimmunologicznych.

Białka szoku termicznego (ang. *heat shock proteins*, Hsp) uważane są za potencjalne cele terapii wybranych chorób autoimmunologicznych. Wysoce zachowane w ewolucji białka Hsp są niezbędne do przeżycia komórek, dlatego znajdują się we wszystkich organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Białka Hsp wykazujące aktywność opiekuńczą

(chaperonową) odpowiedzialne są za fałdowanie wewnątrzkomórkowych polipeptydów, stabilizację i translokację białek natywnych. W oparciu o masę cząsteczkową i funkcje, Hsp podzielono na kilka rodzin, w tym Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 i małe Hsp. W tkankach objętych stanem zapalnym, niektóre z białek opiekuńczych ulegają silnej ekspresji lub są wydzielane do przestrzeni pozakomórkowej. W związku z powyższym, Hsp stały się przedmiotem zainteresowania naukowców w kontekście procesu zapalnego i autoimmunizacyjnego. Dokładna rola zewnątrzkomórkowych Hsp w przebiegu chorób autoimmunologicznych oraz zapalnych pozostaje jednak niewyjaśniona.

Niniejsza rozprawa doktorska miała na celu zbadanie immunomodulacyjnych właściwości zewnątrzkomórkowych białek Hsp w rozwoju i terapii RZS, łuszczycy i należącego do grupy autoimmunologicznych chorób pęcherzowych skóry, nabytego pęcherzowego oddzielania się naskórka (łac. *epidermolysis bullosa acquisita*, EBA). W przypadku łuszczycy i EBA wykorzystano dobrze poznane i opisane w literaturze eksperymentalne mysie modele tych schorzeń. Ponadto w związku z zaproponowanym (na podstawie badań *in silico*) rozwojem procesu autoimmunizacji poprzez występowanie podobieństw strukturalnych (teoria mimikry molekularnej) między białkami wirusa SARS-CoV-2 wywołującego COVID-19 a immunogennymi białkami Hsp (Marino Gammazza i wsp. 2020), postanowiono zweryfikować tę hipotezę eksperymentalnie.

Wyniki badań uzyskane w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czterech oryginalnych artykułach:

1. Wiele dowodów wskazuje na to, że Hsp mogą być aktywnie i pasywnie uwalniane odpowiednio z komórek żywych i nekrotycznych do przestrzeni pozakomórkowej. Wysoce immunogenne białka Hsp mogą aktywować odpowiedź immunologiczną i tym samym stymulować wytwarzanie autoprzeciwciał anty-Hsp. Stwierdzono, że poziomy tych autoprzeciwciał są podwyższone u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak celiakia lub opryszczkowe zapalenie skóry (Tukaj i Kamiński, 2019; Tukaj, 2020). Celem mojej pracy było zbadanie humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej na ludzkie białka Hsp60, Hsp70 i Hsp90 u pacjentów z RZS (n = 39). W porównaniu z osobami zdrowymi (n = 40), poziomy krążących autoprzeciwciał (IgG, IgM i IgA) anty-Hsp60, -Hsp70 i -Hsp90 były znacząco wyższe u pacjentów z RZS, co zmierzono za pomocą wcześniej opracowanego testu immunoenzymatycznego (ELISA). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych korelacji między immunoglobulinami anty-Hsp a aktywnością

lub progresją choroby. Z drugiej strony, wykazano dodatnie korelacje między poziomami surowiczych przeciwciał anti-Hsp90 IgG i prozapalnej cytokiny IFN- γ (Th1) u pacjentów z RZS. Ponadto stwierdzono odwrotną korelację między poziomami przeciwciał anti-Hsp70 IgM a prozapalną cytokiną TNF- α (Th1) u pacjentów. Wyniki te sugerują, że humoralna reakcja autoimmunologiczna anti-Hsp60, -Hsp70 i -Hsp90 u pacjentów z RZS nie jest bezpośrednio związana z aktywnością lub progresją choroby, ale może mieć potencjalny wpływ modulujący na mediatory stanu zapalnego (**Mantej i wsp. 2019**).

2. Wraz z rozwojem pandemii koronawirusa COVID-19, postawiono hipotezę, że wirus SARS-CoV-2 może potencjalnie wywoływać autoimmunizację poprzez podobieństwo molekularne pomiędzy immunogennymi białkami wirusa a ludzkimi zewnątrzkomórkowymi białkami Hsp (Marino Gammazza i wsp. 2020). Aby zweryfikować tę hipotezę, określono poziomy krążących autoprzeciwciał skierowanych przeciwko Hsp60, Hsp70 i Hsp90 u osób posiadających przeciwciała skierowane przeciwko wirusowi SARS-CoV-2 (seropozytywni) za pomocą testu ELISA. Do tego badania zostało włączonych 15 seropozytywnych osób po przebyciu COVID-19, 26 seropozytywnych zdrowych ochotników, którzy otrzymali dwie dawki szczepionki mRNA COVID-19 firmy Pfizer-BioNTech, oraz 51 zdrowych osób z ujemnym wynikiem na obecność przeciwciał anti-SARS-CoV-2 IgG. Stwierdzono, że poziomy surowiczych autoprzeciwciał anti-Hsp60, anti-Hsp70 i anti-Hsp90 klasy IgG, IgM lub IgA nie uległy zmianie u pacjentów immunizowanych szczepionką anti-COVID-19 oraz osób po przebytej chorobie (seropozytywni) w porównaniu ze zdrowymi osobami, u których nie potwierdzono obecności przeciwciał skierowanych przeciwko białkom wirusa. Obserwacje te przemawiają przeciwko związkowi między przebyłą infekcją lub szczepieniem przeciwko COVID-19 prowadzącą do wytworzenia przeciwciał anti-SARS-CoV-2 IgG a immunologiczną reakcją krzyżową z ludzkimi białkami Hsp (**Mantej i wsp. 2021**).
3. Z niektórych badań przedklinicznych wynika, że immunizacja białkami/peptydami Hsp70 może stać się potencjalnym celem terapii RZS poprzez m.in. indukcję limfocytów Treg. Ponadto, pierwsze testy kliniczne z wykorzystaniem białek Hsp w leczeniu pacjentów RZS i cukrzycy typu I wykazały ich potencjał terapeutyczny (van Herwijnen i wsp. 2012; Tukaj i Kamiński, 2019; Tukaj, 2020). W celu

rozwięcia poprzednich doniesień dotyczących immunosupresyjnych właściwości Hsp70, oceniono jego potencjał terapeutyczny w mysim modelu łuszczycy, aby dowiedzieć się, czy ta metoda leczenia jest skuteczna również w innych chorobach autoimmunologicznych. Łuszczycy jest jedną z najczęstszych organospecyficznych chorób autoimmunizacyjnych charakteryzujących się nadmierną proliferacją oraz nieprawidłowym różnicowaniem keratynocytów w naskórku oraz nadaktywnością m.in. subpopulacji komórek Th17 i niedostateczną aktywnością limfocytów Treg. W tej pracy, po raz pierwszy pokazano, że immunizacja myszy wysoce czystym, wolnym od substratów i endotoksyn bakteryjnych, rekombinowanym Hsp70, szczególnie pochodzenia roślinnego, chroniła zwierzęta przed klinicznymi i histologicznymi objawami łuszczycy indukowanej imikwimodem (IMQ). Towarzyszyła temu również indukcja dwóch populacji komórek Treg ($CD4^+CD25^+$ i $CD4^+FoxP3^+$) oraz wzrost stosunku populacji $CD4^+FoxP3^+$ do Th17. Podobnie, leczenie przeciwciałem anti-Hsp70 IgG skutkowało niższą aktywnością choroby i związane było ze spadkiem liczby prozapalnych komórek Th17 w śledzionie. Bezpośrednią stymulację komórek Treg przez roślinne Hsp70 i jego działanie antyproliferacyjne na keratynocyty potwierdzono w modelu *in vitro*. Te przedkliniczne obserwacje sugerują, że Hsp70 pochodzenia roślinnego może być w przyszłości obiecującym sposobem leczenia łuszczycy (Tukaj i wsp. 2021).

4. Na koniec oceniono rolę zewnątrzkomórkowego białka Hsp70 w rozwoju EBA, w którym pośredniczą autoprzeciwciała skierowane przeciwko kolagenowi typu VII. Rolę tego pozakomórkowego białka opiekuńczego zbadano w mysim modelu EBA wywołanym transferem przeciwciał anti-kolagen typu VII. Stwierdzono, że poziomy Hsp70 we krwi były znacznie podwyższone u myszy z EBA w porównaniu do zwierząt naiwnych. Ponadto myszy z EBA immunizowane Hsp70 wykazywały cięższą kliniczną postać choroby w porównaniu z myszami nietraktowanymi. Towarzyszył temu zwiększony poziom ekspresji skórnej metaloproteinazy 9 (MMP-9) i nadtlenku wodoru w osoczu. Prozapalną aktywność Hsp70 w EBA potwierdzono w teście uwalniania reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem kompleksów immunologicznych specyficznych dla tej choroby. Ponadto eksperymenty z użyciem ludzkich komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) pozyskanych od osób zdrowych stymulowanych przeciwciałami anti-CD3

ujawniły, że autologiczne Hsp70 stymuluje wydzielanie dwóch głównych cytokin prozapalnych IL-6 i IL-8. Praca ta sugeruje, że w przeciwieństwie do łuszczycy, zewnątrzkomórkowe białko Hsp70 bierze udział w rozwoju EBA stanowiąc potencjalny cel leczenia tej choroby (**Tukaj i wsp. 2022**).

Podsumowując, niniejsza praca doktorska poszerza wiedzę na temat roli zewnątrzkomórkowych białek Hsp w rozwoju RZS, łuszczycy i EBA. Moje badania sugerują, że zewnątrzkomórkowe białka Hsp mogą stanowić zarówno czynnik patofizjologiczny lub terapeutyczny w rozwoju chorób autoimmunologicznych.

Literatura

1. Fugger L, Jensen L.T, Rossjohn J. (2020) Challenges, Progress, and Prospects of Developing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *Cell* 2;181(1):63-80.
2. Gammazza A.M, Légaré S, Bosco G.L, Fucarino A, Angileri F, Conway E, Macario A.JL, Cappello F. (2020) Human molecular chaperones share with SARS-CoV-2 antigenic epitopes potentially capable of eliciting autoimmunity against endothelial cells: possible role of molecular mimicry in COVID-19. *Cell Stress and Chaperones* 25:737–741.
3. Geng L, Tang X, Wang S, Sun Y, Wang D, Tsao B.P, Feng X, Lingyun. (2020) Reduced Let-7f in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Triggers Treg/Th17 Imbalance in Patients With Systemic Lupus Erythematosus *Front Immunol.* 18;11:233.
4. Herwijnen MJ, Wieten L, Zee R. et al. (2012) Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:14134–14139.
5. Long S.A, Buckner J.H. (2011) CD4+FOXP3+ T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game. *J Immunol* 187:2061-2066.
6. **Mantej J*, Bednarek M*, Sitko K, Świętoń M, Tukaj S. (2021) Autoantibodies to heat shock protein 60, 70, and 90 are not altered in the anti-SARS-CoV-2 IgG-seropositive humans without or with mild symptoms. *Cell Stress Chaperones* 26(4): 735–740.**
7. **Mantej J, Polasik K, Piotrowska E, Tukaj S. (2019) Autoantibodies to heat shock proteins 60, 70, and 90 in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Stress Chaperones* 24(1):283-287.**
8. Rydzewska M, Jaromin M, Pasierowska I.E, Stożek K, Bossowski A. (2018) Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Thyroid Res.* 11: 2.18
9. Sarhan D, Hippen K.L, Lemire A, Hying S, Luo X, Lenvik T, Curtsinger J, Davis Z, Zhang B, Cooley S, Cichocki F, Blazar B.R, Miller J.S. (2018) Adaptive NK Cells

Resist Regulatory T-cell Suppression Driven by IL37. *Cancer Immunol Res.* 6(7):766-775.

10. Tukaj S. (2020) Heat Shock Protein 70 as a Double Agent Acting Inside and Outside the Cell: Insights into Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 26;21(15):5298.
11. Tukaj S, Kaminski M. (2019) Heat shock proteins in the therapy of autoimmune diseases: too simple to be true? *Cell Stress Chaperones* 24(3):475-479.
- 12. Tukaj S*, Mantej J*, Sitko K, Bednarek M, Zillikens D, Ludwig R.J, Bieber K, Kasperkiewicz M. (2022) Evidence for a role of extracellular heat shock protein 70 in epidermolysis bullosa acquisita. *Exp Dermatol.* 31(4):528-534.2021.**
- 13. Tukaj S*, Mantej J*, Sobala M, Potrykus K, Tukaj Z, Zillikens D, Ludwig R.J, Bieber K, Kasperkiewicz M. (2021) Therapeutic Implications of Targeting Heat Shock Protein 70 by Immunization or Antibodies in Experimental Skin Inflammation. *Front Immunol.* 12: 614320.**
14. Yan J, Luo M, Chen Z, He B. (2020) The Function and Role of the Th17/Treg Cell Balance in Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res* 15;2020:8813558.

(*) autorzy równorzędni