

mgr Adrian Kobiela

Tytuł rozprawy: Rola małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez keratynocyty w interakcji z układem odpornościowym w atopowym zapaleniu skóry

Promotor: dr hab. Danuta Gutowska-Owsiak, prof. UG

Streszczenie

Keratynocyty są głównymi komórkami wchodzącymi w skład naskórka – najbardziej zewnętrznej warstwy skóry. **Atopowe zapalenie skóry (AZS) to przewlekła choroba zapalna skóry**, w której integralność naskórka jest naruszona w wyniku czynników genetycznych i stanu zapalnego. W efekcie patogeny, alergeny, promieniowanie UV i związki chemiczne, mające kontakt z naskórkiem, wnikają w głębsze warstwy skóry i aktywują odpowiedź układu odpornościowego oraz powodują uszkodzenia tkanki. W AZS dominuje odpowiedź immunologiczna typu 2, ale towarzyszą jej również czynniki prozapalne charakterystyczne dla odpowiedzi typu 17 i 22. **W AZS keratynocyty wpływają na aktywność komórek układu odpornościowego** i przyczyniają się do stanu zapalnego w skórze. **Skóra pacjentów z AZS jest podatna na infekcje patogenami**, takimi jak bakteria gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) czy grzyb *Candida albicans* (*C. albicans*), które zaostrzają stan zapalny. Gen *FLG* koduje profilagrynę, której ekspresja zachodzi prawie wyłącznie w keratynocytach obecnych w naskórku. Profilagryna jest niezbędna do prawidłowego różnicowania keratynocytów i utrzymania integralności naskórka. Ponadto badania wskazują, iż **profilagryna bierze udział w regulacji odpowiedzi odpornościowych. Mutacje utraty funkcji (LoF) genu *FLG* są największym genetycznym czynnikiem ryzyka wystąpienia AZS.** Mutacje te zwiększają również ryzyko występowania u pacjentów z AZS różnych chorób o podłożu alergicznym już po ustąpieniu objawów AZS. Zjawisko to jest znane jako „marsz alergiczny” i dotyczy też tkanek, w których nie występuje ekspresja genu *FLG*.

Egzosomy to małe, otoczone dwuwarstwą lipidową pęcherzyki wydzielane przez wszystkie komórki jądrzaste. Pośredniczą one w komunikacji między komórkami i tkankami zarówno sąsiadującymi ze sobą, jak i tymi, które są znacznie od siebie oddalone. Egzosomy mogą być izolowane z pożywki pochodzącej z hodowli komórek lub płynów ustrojowych i znajdują się we frakcji **małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (sEVs)**. Liczne badania wykazują,

że sEVs produkowane przez różne komórki/tkanki wpływają na odpowiedź immunologiczną, ale **rola sEVs wydzielanych przez keratynocyty (KC_{sEVs}) w AZS nie została jeszcze poznana.**

Celem badań, których wyniki zostały zaprezentowane w rozprawie, było poznanie czy **sEVs produkowane przez keratynocyty poddane czynnikom charakterystycznym dla AZS wykazują funkcje związane z regulacją układu odpornościowego.** W przeprowadzonych badaniach źródłem sEVs były ludzkie keratynocyty pierwotne, unieśmiertelnione linie ludzkich keratynocytów oraz ludzkie osocze.

Pierwsza część badań wykazała, iż poddanie keratynocytów działaniu prozapalnego środowiska charakterystycznego dla AZS i patogenu *C. albicans* zwiększa interakcje KC_{sEVs} z komórkami dendrytycznymi. Wynikało to ze wzbogacenia powierzchni KC_{sEVs} różnymi glikanami, również tymi zawierającymi kwasy sjałowe. Przeprowadzone zostały eksperymenty, w których blokowane były poszczególne receptory obecne na powierzchni komórek prezentujących antygen (APCs); wykazały one, że receptory Siglec-7 i Siglec-9, które wiążą kwas sjałowy i wyciszają odpowiedź immunologiczną biorą udział w interakcji KC_{sEVs} z APCs. Ekspresja enzymów α 2,6-sjałotransferaza-1 (ST6GAL1) i beta-1,3-galaktozylotransferaza rdzeniowa (C1GALT1) była zwiększona w keratynocytach stymulowanych cytokinami AZS, natomiast naskórek pacjentów z AZS charakteryzował się podwyższoną ekspresją ST6GAL1. Oba enzymy mogą więc przyczyniać się do zmienionego profilu glikozylacji powierzchni KC_{sEVs}, wywołanego stymulacją keratynocytów cytokinami AZS i *C. albicans*.

Eksperymenty wykonane w kolejnej części badań wykazały, że KC_{sEVs} są źródłem lipidowych ligandów dla białka CD1a. Ligandy te musiały jednak zostać wcześniej uwolnione z błon KC_{sEVs} przez enzym fosfolipazę A2. Po uwolnieniu, ligandy białka CD1a regulowały aktywność CD1a-zależnych limfocytów T. Wyciszenie genu *FLG* w keratynocytach (shFLG) skutkowało zmienioną zdolnością KC_{sEVs} do regulacji tej aktywności. Objawiało się to wzmocnieniem odpowiedzi odpornościowej typu 2 i zahamowaniem odpowiedzi typu 1. Wspomniane różnice wynikały ze zmniejszonej ilości lipidowych ligandów białka CD1a stymulujących limfocyty T i jednocześnie zwiększonej zawartości tych, które je hamują w sEVs produkowanych przez komórki shFLG. Na zmiany w składzie lipidomu KC_{sEVs} po wyciszeniu genu *FLG* wpływ miała zmniejszona w keratynocytach ekspresja enzymów odpowiadających za metabolizm lipidów. Jeden z nich, syntetaza acyloCoA 3 (ACSL3), odpowiada za włączanie długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do fosfolipidów znajdujących

się w błonach biologicznych. W skórze pacjentów z AZS zmniejszona była również ekspresja innych izoform ACSL. Skóra pacjentów charakteryzowała się też spadkiem ekspresji enzymów należących do rodziny elongaz kwasów tłuszczowych o bardzo długim łańcuchu (ELOVL), których funkcją jest wydłużanie łańcuchów kwasów tłuszczowych.

Jedną z obserwacji ostatniej części badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej była obecność produktów pochodnych profilagryny w KC_{sEVs}. sEVs pochodzące z osocza zarówno pacjentów z AZS jak i zdrowych osób również zawierały taki ładunek. Stymulacja keratynocytów bakterią *S. aureus* spowodowała zwiększenie ilości produktów pochodnych profilagryny w sEVs wytwarzanych przez te komórki. Efekt ten był zależny od stymulacji receptora Toll-podobnego TLR2. TLR2 jest obecny w keratynocytach i rozpoznaje *S. aureus*. Bakteria ta spowodowała również rozregulowanie produkcji sEVs przez keratynocyty. Objawiało się to zwiększonym wydzielaniem sEVs o charakterze egzosomalnym, jak również małych mikropęcherzyków (sMV).

Podsumowując, wyniki opisane w rozprawie doktorskiej wskazują istotną rolę KC_{sEVs} w odpowiedzi odpornościowej w AZS. Pęcherzyki te mogą zostać wykorzystane przez patogeny w celach ochronnych; *C. albicans* zwiększa interakcje między KC_{sEVs} i wyciszającymi odpowiedź immunologiczną receptorami Siglec, co może utrudniać eliminację tego patogenu. *S. aureus*, natomiast zwiększa ładowanie produktów cięcia profilagryny do KC_{sEVs}, dzięki czemu eliminuje je z keratynocytów i unika ich mikrobójczych właściwości. Co więcej, wzmożone usuwanie produktów pochodnych filagryny zmniejsza jej ilość w naskórku, przyczyniając się do pogorszenia stanu bariery skórnej. sEVs produkowane przez komórki shFLG zastrzają charakterystyczną dla AZS odpowiedź odpornościową typu 2. Co za tym idzie, mogą one przyczyniać się do stymulowania tego rodzaju stanów zapalnych nie tylko w skórze, ale również w innych tkankach, do których dostarczane byłyby przez krwiobieg. Wszystkie opisane mechanizmy mogą nasilać stan zapalny w AZS poprzez przyczynianie się do naruszenia integralności bariery naskórka oraz zwiększenia ilości czynników prozapalnych w skórze. Można przypuszczać, że mechanizmy te mogłyby też wpływać na inne, dotknięte przez choroby „marszu alergicznego” tkanki i organy.