

Katarzyna Juczyńska

**Ekspresja białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT
w wybranych autoimmunologicznych podnaskórkowych
chorobach pęcherzowych**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych
Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor: dr hab. med. Agnieszka Żebrowska

Łódź 2018

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Pemfigoid pęcherzowy (BP) i opryszczkowate zapalenie skóry (DH) są autoimmunologicznymi chorobami pęcherzowymi. Patomechanizm powstawania pęcherzy w obu jednostkach chorobowych nie jest do końca wyjaśniony. W obu chorobach, po przyłączeniu przeciwciał do antygenów ma miejsce szereg procesów zapalnych, prowadzących do aktywacji eozynofików i/lub neutrofilów oraz uwolnienia enzymów proteolitycznych, przyczyniających się do powstania pęcherzy. Udowodniono, iż wszystkie te procesy zachodzą przy znaczącym udziale licznych cytokin, których podwyższone poziomy stwierdzono w surowicy i/lub płynie pęcherzowym pacjentów z BP i DH. Ponadto, stwierdzono iż poziomy niektórych cytokin korelują z aktywnością procesu chorobowego.

Kinazy Janus (JAK) oraz białka będące przetwornikami sygnału i aktywatorami transkrypcji (STAT) stanowią grupę protein tworzącą szlak sygnałowy obecny w komórkach zwierząt. Interakcje pomiędzy poszczególnymi elementami kaskady umożliwiają przekazywanie sygnału od zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych do ich docelowych obszarów DNA, powodując transkrypcję wybranych genów.

W organizmach ssaków rodzina STAT składa się z siedmiu białek: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, poznano również cztery kinazy tyrozynowe: JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2. Kaskada może być aktywowana przez liczne cząsteczki sygnałowe. Stymulacja ścieżki sygnałowej JAK/STAT umożliwia komunikację między komórkową oraz odgrywa znaczącą rolę w procesach komórkowych, takich jak proliferacja, wzrost, różnicowanie, migracja, apoptoza. Ścieżka JAK/STAT jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania między innymi układu immunologicznego. W szeregu chorób zapalnych i autoimmunologicznych stwierdzono zaburzone przekaźnictwo JAK/STAT.

Celem badania była ocena ekspresji białek: JAK1, JAK2, JAK3, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 i STAT6 w zmianach skórnych i skórze pozornie niezmienionej u pacjentów z pemfigoidem pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniem skóry.

Grupę badaną stanowiło 51 pacjentów: 20 z BP i 21 z DH. Wszyscy pacjenci byli w aktywnej fazie choroby, przed zastosowaniem leczenia (miejscowego i ogólnego). Grupa kontrola składała się z 10 zdrowych, niespokrewnionych ochotników, o podobnej strukturze wieku i płci.

Rozpoznanie pemfigoidu i opryszczkowatego zapalenia skóry było postawione na podstawie wywiadu, objawów klinicznych oraz badań immunofluorescencyjnych bezpośredniego i pośredniego.

Oznaczenia immunohistochemiczne wykorzystano do oceny ekspresji białek JAK3, STAT2, STAT4 i STAT6 zarówno w zmianach skórnych, jak i w okolicy zmian oraz porównano z próbkami zdrowej skóry. Ekspresja była oceniona półilościowo przez dwóch niezależnych badaczy. Metodę Western blot wykorzystano do oceny ekspresji JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, STAT5 w zmianach skórnych pacjentów BP i DH i porównano z grupą kontrolną. Przeciwciała przeciw STAT5 reagowały zarówno ze STAT5a jak i STAT5b. Uzyskane wyniki zostały wyrażone jako % gęstości optycznej powyżej tła.

Wszystkie wartości zostały przedstawione w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Rozkład danych i jednorodność wariancji były testowane przy wykorzystaniu ANOVA (WB), testu t-Studenta (immunohistochemia), a w uzasadnionych przypadkach użyto testu U Manna-Whitneya. Poziom istotności przyjęto dla $p < 0.05$.

Ekspresja JAK1 była oceniona jako jedna z najwyższych u pacjentów z DH (140.27 ± 0.15), BP (141.10 ± 1.50) i w grupie kontrolnej (141.10 ± 0.51). Aczkolwiek nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy ekspresją białka w grupie kontrolnej i grupie DH ($p > 0.05$) i pomiędzy grupą kontrolną i pacjentami BP. Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic pomiędzy pacjentami z BP a DH.

Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję JAK2 w zmianach chorobowych pacjentów z BP (133.48 ± 0.84) w porównaniu ze zmianami chorobowymi DH (130.21 ± 0.96 ; $p < 0.05$) i grupą kontrolną (130.42 ± 1.65 ; $p < 0.05$). Nie było istotnej statystycznie różnicy ($p > 0.05$) pomiędzy ekspresją JAK2 w zmianach DH i zdrową skórą.

Ekspresja STAT1 została oceniona jako wyższa w zmianach chorobowych BP (145.83 ± 0.25) i DH (143.85 ± 3.09) w porównaniu z grupą kontrolną (136.28 ± 2.84 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy pomiędzy ekspresją STAT1 w zmianach chorobowych DH i BP.

Ekspresja STAT3 była wyższa w zmianach BP (138.39 ± 0.84) i DH (141.2 ± 0.05) w porównaniu do skóry zdrowej (121.63 ± 1.75 ; $p < 0.05$). Stwierdzono również istotną statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją STAT3 w zmianach DH a BP, na korzyść zmian DH.

Ekspresja STAT5 była istotnie wyższa w zmianach BP (131.37 ± 2.55) i DH (129.34 ± 1.37) w porównaniu z grupą kontrolną (123.48 ± 1.13 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy ekspresją STAT5 w zmianach DH i BP.

W wycinkach skóry zdrowej stwierdzono ekspresję JAK3 w obrębie naskórka, z najsilniejszym wybarwieniem przez przeciwciała anty-JAK3 warstwy rogowej. Immunoreaktywność przeciwciał przeciw STAT2, STAT4 i STAT6 była bardziej zaznaczona

w ziarnistej warstwie naskórka. W warstwie rogowej nie stwierdzono wybarwienia przeciwciał przeciw STAT2, STAT4, STAT6.

Ekspresja JAK3 była wyższa w zmianach skórnych BP (18.19 ± 5.58) i zmianach DH (18.89 ± 4.67) w porównaniu z grupą kontrolną (10.73 ± 3.36 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą kontrolną a skórą z okolic zmian BP (12.54 ± 2.99 ; $p > 0.05$) i okolic zmian chorobowych DH (14.38 ± 3.61 ; $p > 0.05$).

Ekspresja STAT2 była wyższa w zmianach chorobowych w BP (17.32 ± 2.69) i w zmianach DH (17.15 ± 2.81) w porównaniu z grupą kontrolną (11.06 ± 5.34 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ekspresją STAT2 w grupie kontrolnej i skórze okolicy zmian BP (14.01 ± 2.38 ; $p > 0.05$), ale stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją STAT2 w grupie kontrolnej i skórze okolic zmian DH (15.79 ± 2.06 ; $p < 0.05$).

Ekspresja STAT4 była wyższa z zmianach chorobowych DH (29.08 ± 4.38) i w zmianach chorobowych BP (25.13 ± 3.56) w porównaniu z grupą kontrolną (18.59 ± 3.01 ; $p < 0.05$). Stwierdzono również statystycznie istotną różnicę pomiędzy ekspresją STAT4 w grupie kontrolnej i skórze okolic zmian DH (24.10 ± 3.40 ; $p < 0.05$), lecz nie stwierdzono znaczącej różnicy pomiędzy ekspresją STAT4 w zdrowej skórze i skórze okolic zmian BP (21.05 ± 2.91).

Średnia ekspresja STAT6 w zmianach skórnych BP (26.09 ± 4.45) i zmianach DH (27.85 ± 4.68) była wyższa w porównaniu z ekspresją białek w zdrowej skórze (11.56 ± 2.84 ; $p < 0.05$). Stwierdzono również istotne statystycznie różnice pomiędzy ekspresją STAT6 w grupie kontrolnej i skórze okolic zmian BP (17.46 ± 2.41 ; $p < 0.05$), podobnie jak pomiędzy skórą zdrową i skórą okolic zmian DH (18.21 ± 3.49 ; $p < 0.05$).

Przedstawione wyniki pozwoliły sformułować następujące wnioski:

1. Wykazana immunoekspresja białek ścieżki JAK/STAT w zdrowym naskórku sugeruje, iż pewien konstytutywny poziom aktywności białek JAK/STAT jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania tej tkanki. Zróżnicowana lokalizacja białek obejmująca poszczególne warstwy naskórka sugeruje funkcjonalną różnorodność białek JAK/STAT.
2. Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań wykazano wzmożoną aktywację białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w zmianach chorobowych w pemfigoidzie pęcherzowym i w opryszczkowatym zapaleniu skóry, co świadczy o ich udziale w patogenezie obu jednostek chorobowych.

3. Brak istotnych różnic w ekspresji białka JAK1 pomiędzy grupą kontrolną a zmianami chorobowymi BP i DH sugeruje, iż białko to nie przyczynia się do patogenezы obu chorób pęcherzowych.
4. Różnice pomiędzy ekspresją białek JAK/STAT w zmianach chorobowych w pemfigoidzie w stosunku do zmian w opryszczkowatym zapaleniu skóry (JAK2 wyższa ekspresja w BP; STAT3, STAT4 wyższa ekspresja w DH) mogą mieć związek z innym charakterem nacieków zapalnych w obu chorobach: eozynofilowo-neutrofilowym w BP i neutrofilowym w DH.
5. Większa aktywacja białek ścieżki JAK/STAT w zmianach chorobowych w obu dermatozach niż w otoczeniu zmian z obecnymi tylko złogami immunoglobulin, świadczy o udziale białek ścieżki JAK/STAT w powstawaniu zmian zapalnych.
6. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że ścieżka JAK/STAT może być punktem uchwytu dla leków anty-JAK i anty-STAT w pemfigoidzie i opryszczkowatym zapaleniu skóry.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Bullous pemphigoid (BP) and dermatitis herpetiformis (DH) are both autoimmune subepidermal bullous diseases. The pathomechanism of creating blisters in both diseases is not fully understood. In both diseases, after attachment of the antibodies to the antigens, various proinflammatory processes take place, leading to activation of eosinophils and/or neutrophils and release of proteolytic enzymes which contribute to blister formation. It was proven, that all those processes occur with the significant participation of numerous cytokines, which elevated levels were detected in the serum and/or blister fluid of patients with BP and DH. Moreover, levels of some of them were found correlating with activity of the diseases.

The Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT) are a group of proteins constituting signaling pathway present in cells of animals. Interaction between particular members of the cascade enables transmitting the signal from extracellular signaling molecules to their target DNA sites, resulting in genes transcription.

In mammals, the STAT family is comprised of seven members (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) and there are four tyrosine kinases identified (JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2). The cascade might be activated by numerous signaling molecules. Stimulation of the JAK/STAT pathway facilitates intercellular communication and plays significant role in cell processes such as proliferation, growth, differentiation, migration, apoptosis. The JAK/STAT pathway is essential to normal functioning of the immune system among others. There has been numerous inflammatory and autoimmune diseases identified where the JAK/STAT signaling is disrupted.

The aim of this study was to evaluate the expression of proteins: JAK1, JAK2, JAK3, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 and STAT6 in skin lesions and perilesional area in patients with BP and DH as well as in the control group.

The research group consisted of 51 patients: 20 with BP and 21 with DH. All patients were at an active stage of the disease, before administration of any (systemic or topical) treatment. The control group comprised 10 healthy, unrelated volunteers.

Diagnosis of BP was established based on medical history, clinical picture and, first of all, immunofluorescence findings (Direct Immunofluorescence test and Indirect Immunofluorescence test). DH was diagnosed based on medical history, clinical presentation and immunofluorescence examinations as well.

Immunohistochemical methods were used to evaluate expression of JAK3, STAT2, STAT4 and STAT6 in both lesional and perilesional skin, and compared with healthy control skin. Expression was evaluated semiquantitatively by two independent observers.

Western blot method was used to evaluate the expression of JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, STAT5 in skin lesions of DH and BP groups (and not perilesional skin) and compared with healthy control group. STAT5 antibody recognized both STAT5a and STAT5b. The obtained results were expressed as % optical density (OD) over the background. All values were expressed as the mean \pm SD (standard deviation). The data were analyzed using Statistica. The distribution of the data and the equality of variances were checked by Levene's test. Differences between groups were tested using ANOVA (WB), unpaired Student's t-test (immunohistochemistry) and The Mann-Whitney U test was used where appropriate. The level of significance was defined where $p < 0.05$.

Expression of JAK1 was evaluated as one of the highest in patients with DH (140.27 ± 0.15), BP (141.10 ± 1.50) and the control group (141.10 ± 0.51). However there were no statistical differences between expression of the protein in the control group and DH patients ($p > 0.05$) and between the control group and BP patients. No statistical difference in JAK1 expression was found between BP and DH patients as well.

The intensity of JAK2 expression was higher in BP patients (133.48 ± 0.84) as compared to patients with DH (130.21 ± 0.96 ; $p < 0.05$) and the control group (130.42 ± 1.65 ; $p < 0.05$). There was no statistical difference ($p > 0.05$) between JAK2 expression in DH lesions and healthy skin.

The expression of STAT1 was evaluated higher in BP patients (145.83 ± 0.25) and DH patients (143.85 ± 3.09) as compared to the control group (136.28 ± 2.84 ; $p < 0.05$). There was no significant difference between STAT1 expression in DH and BP patients.

The intensity of STAT3 expression was higher in BP patients (138.39 ± 0.84) and DH patients (141.2 ± 0.05) as compared to the control group (121.63 ± 1.75 ; $p < 0.05$). There was also statistical significance between expression on STAT3 in DH and BP patients, in favor of DH skin lesions.

Expression of STAT5 protein was significantly higher in BP patients (131.37 ± 2.55) and DH patients (129.34 ± 1.37) as compared to the control group (123.48 ± 1.13 ; $p < 0.05$). There was no statistical difference in expression of STAT5 in DH and BP patients. (Fig. 1-2)

Immunohistochemistry

In the healthy skin samples, expression of JAK3 was found throughout the epidermis with the horny layer being strongly stained by the antibody against JAK3. Immunoreactivity

of STAT2, STAT4, and STAT6 antibodies were more strongly detected in the granular layer than in lower layers of epidermis. The horny cells layer were not stained with the antibodies against STAT2, STAT4, and STAT6.

Expression of JAK3 was higher in BP skin lesions (18.19 ± 5.58) and DH skin lesions (18.89 ± 4.67) in comparison with the control group (10.73 ± 3.36 ; $p < 0.05$). There were no statistically significant differences between the control group and BP perilesional skin (12.54 ± 2.99 ; $p > 0.05$) and DH perilesional skin (14.38 ± 3.61 ; $p > 0.05$).

Expression of STAT2 was higher in BP patients skin lesions (17.32 ± 2.69) and DH patients skin lesions (17.15 ± 2.81) than in the control group (11.06 ± 5.34 ; $p < 0.05$). There was no significant difference between STAT2 expression in the control group and BP perilesional area (14.01 ± 2.38 ; $p > 0.05$), but there was significant difference between STAT2 expression in the control group and DH perilesional skin (15.79 ± 2.06 ; $p < 0.05$).

Expression of STAT4 was higher in DH skin lesions (29.08 ± 4.38) and BP lesions (25.13 ± 3.56) as compared to the control group (18.59 ± 3.01 ; $p < 0.05$). There was also significant difference between expression of STAT4 in the control group and DH perilesional skin (24.10 ± 3.40 ; $p < 0.05$), but there was no significant difference between STAT4 expression in healthy skin and BP perilesional area (21.05 ± 2.91).

The medium intensity of STAT6 expression was higher in BP skin lesions (26.09 ± 4.45) and DH skin lesions (27.85 ± 4.68) as compared to the control group (11.56 ± 2.84 ; $p < 0.05$). There were also significant differences between STAT6 expression in the control group and perilesional BP skin (17.46 ± 2.41 ; $p < 0.05$), as well as between healthy skin and DH perilesional skin (18.21 ± 3.49 ; $p < 0.05$).

On the basis of achieved results the conclusions were drawn as follows:

1. The proven expression of JAK/STAT proteins in healthy epidermis suggests, that some constitutive level of JAK/STAT activity is essential to normal functioning of the epidermis. The diverse localization of proteins in different epidermal layers suggest functional variety of JAK/STAT proteins.
2. Achieved results revealed increased activation of JAK/STAT signaling pathway proteins in BP and DH skin lesions, what indicates participation of the pathway in pathogenesis of both diseases.
3. Lack of significant differences between the expression of JAK1 in the control group and BP and DH skin lesions suggests that this protein does not participate in pathogenesis of both bullous diseases.

4. Differences between expression of JAK/STAT proteins in BP skin lesions and in DH skin lesions (higher expression of JAK2 in BP; more significant expression of STAT3, STAT4 in DH) may be related to distinct inflammatory infiltrations in both diseases: eosinophil-neutrophilic in BP and neutrophilic in DH.
5. Significantly greater expression of JAK/STAT proteins in skin lesions of both dermatoses than in perilesional skin indicates JAK/STAT pathway proteins participation in generating inflammatory lesions.
6. Achieved results allow to assume that JAK/STAT signaling pathway might be a target for anti-JAK and anti-STAT drugs in bullous pemphigoid and dermatitis herpetiformis.