

Lublin, 24.06.2022

Prof. dr hab. Anna Gumieniczek

OCENA  
pracy doktorskiej mgr Magdaleny Nizioł

pt. „The effect of extracellular prolidase on repair processes in experimental models of inflammation and mechanical damage in HaCaT keratinocytes”

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Praca doktorska mgr Magdaleny Nizioł została przygotowana w ramach grantu NCN OPUS nr 2017/25/B/NZ7/02650 oraz projektu UE nr PO WER.03.02.00-00-I051/16 (Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020). Poruszony w pracy problem badawczy dotyczy wpływu prolidazy zewnątrzkomórkowej na procesy gojenia w eksperymentalnym modelu zapalenia i uszkodzenia mechanicznego w keratynocytach linii HaCaT. Na ocenianą pracę doktorską składają się 3 artykuły naukowe: pierwszy o charakterze przeglądowym i dwa kolejne prezentujące wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Doktorantkę.

Prezentowana praca przeglądowa (P1) stanowi bardzo dobry wstęp do zaplanowanych przez Doktorantkę eksperymentów. Praca ta prezentuje skrupulatną analizę literatury na temat roli biologicznej prolidazy oraz możliwości wykorzystania szlaków związanych z prolidazą w terapii różnych chorób. Prolidaza hydrolizuje wiązania imidodipeptydów zawierających C-końcową prolinę lub hydroksyprolinę, a jej substratem fizjologicznym są peptydy pochodzące głównie z produktów degradacji białek zawierających prolinę, w tym kolagenu. Funkcja enzymatyczna prolidazy umożliwia więc dostarczanie proliny lub hydroksyproliny, które pełnią istotną rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej oraz procesach energetycznych, promując syntezę DNA i proliferację. Ponadto prolidaza posiada właściwości biologiczne niezależne od jej aktywności enzymatycznej i odgrywa ważną rolę regulacyjną w funkcji innych cząsteczek biologicznych. Jest między innymi ligandem receptorów EGFR i HER2 regulujących szlaki sygnałowe zależne od tych receptorów, takie jak PI3K/Akt/mTOR, ERK1/2 i JAK/STAT3. Prolidaza jest także regulatorem białka p53, które jest kluczowym białkiem supresorowym w komórkach nowotworowych. Wykazano bowiem, że prolidaza reguluje zarówno transkrypcyjne jak i nietranskrypcyjne funkcje p53. W związku z powyższymi doniesieniami, badania nad rolą i funkcjami prolidazy mogą być istotne

w opracowaniu nowych podejść terapeutycznych w wielu chorobach, m.in. niedoborze prolidazy, niektórych nowotworach, zaburzeniach metabolicznych oraz infekcjach wirusowych. Prolidaza pełni też funkcję regulacyjną w procesach regeneracji tkanek w stanie zapalnym lub przy ich uszkodzeniu, co może być wykorzystane, np. w medycynie regeneracyjnej.

Dwie oryginalne publikacje (P2 oraz P3) włączone do cyklu przedstawiają wyniki badań Doktorantki nad aktywnością prolidazy w modelach doświadczalnego gojenia się ran w stanie zapalnym indukowanym przez interleukinę 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i mechanicznego uszkodzenia w keratynocytach linii HaCaT. Proces gojenia się ran zaczyna się od hemostazy, następnie zapalenia, po którym następuje proliferacja i przebudowa tkanek. W mikrośrodowisku uszkodzonej tkanki, w proces ten zaangażowanych jest wiele czynników biologicznych i wiele typów komórek. Są to m.in. keratynocyty, które proliferują pod wpływem czynników wzrostu i migrują do obszaru „zranionego”. W proliferacji komórek, ich migracji oraz biosyntezie kolagenu znaczącą rolę odgrywa prolidaza, co wykazano w wielu modelach eksperymentalnych. Regulacja tych procesów zachodzi m.in. na poziomie szlaku sygnałowego indukowanego przez receptor  $\beta$ 1-integrynowy, a także insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1), najsilniejszy stymulator biosyntezy kolagenu. Piśmiennictwo obejmuje także prace potwierdzające, że prolidaza jest ligandem receptora EGFR, który odpowiada za aktywację pro-przeżyciowych ścieżek sygnałowych.

Celem badań eksperymentalnych przeprowadzonych przez Doktorantkę było wyjaśnienie molekularnego mechanizmu działania prolidazy w procesach regeneracyjnych w hodowli keratynocytów w oparciu o eksperymentalny model zapalenia oraz mechanicznego uszkodzenia komórek. Efekty biologiczne wpływu prolidazy na komórki skóry ocenione zostały w odniesieniu do potencjalnego wykorzystania w procesie gojenia ran oraz w chorobie spowodowanej niedoborem prolidazy i opracowania ewentualnej terapii tych schorzeń. Oceniono wpływ prolidazy na proliferację komórek, cykl komórkowy, biosyntezę kolagenu oraz białka szlaków sygnałowych, w których uczestniczy prolidaza. W prowadzonych eksperymentach zastosowano techniki RT-qPCR, Western immunoblot oraz techniki immunocytochemiczne z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Aby ocenić wpływ zewnątrzkomórkowej prolidazy na metabolizm aminokwasów w keratynocytach dokonano również analizy chromatograficznej i metabolomicznej. W celu realizacji projektu wykorzystana została rekombinowana prolidaza oraz jej zmutowane formy otrzymane przy użyciu metod biotechnologicznych.

W przeprowadzonych badaniach Doktorantka stwierdziła, że prolidaza w obecności IL-1 $\beta$  znacząco zwiększa proliferację keratynocytów poprzez sygnalizację EGFR. Dzięki zastosowaniu inhibitora EGFR, gefitynibu, udowodniono, że prolidaza wiąże się z EGFR na powierzchni keratynocytów oraz, że aktywacja EGFR przez prolidazę jest kluczowa w ich migracji. Analizując ekspresję wybranych białek Doktorantka potwierdziła zależny od prolidazy wzrost ekspresji receptorów integryny  $\beta$ 1 i IGF-1R, a jednocześnie spadek ekspresji czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B, który jest inhibitorem ekspresji podjednostek  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 kolagenu typu I. Zatem otrzymane wyniki wskazują na znaczącą rolę prolidazy w proliferacji komórek, ich migracji i biosyntezie kolagenu. W omówieniu wyników Doktorantka jednoznacznie stwierdziła, że jest to pierwsze doniesienie na temat zależności między prolidazą i IL-1 $\beta$  w proliferacji keratynocytów, procesie, który może mieć istotne znaczenie w gojeniu się ran. Patrząc w przyszłość, może to pomóc chorym, u których występuje niedobór prolidazy i związane z tym problemy dermatologiczne. Zaprezentowane wyniki wnoszą więc nowe informacje do nauki i stanowią cenny wkład w rozwój badań przedklinicznych zmierzających do opracowania nowych terapii dla pacjentów z niedoborami prolidazy, co potwierdza celowość podjętych przez Doktorantkę badań.

Nadesłana do oceny praca doktorska liczy 118 stron. Zawiera autoreferat przygotowany w języku angielskim (streszczenie również w języku polskim) oraz 3 artykuły naukowe opublikowane w języku angielskim. Artykuły pochodzą z uznanych czasopism o wysokim współczynniku wpływu wynoszącym sumarycznie 17,092 i sumie punktów MEiN równej 420. Całkowity dorobek naukowy Doktorantki obejmuje natomiast 27 artykułów naukowych o łącznej wartości współczynnika IF 73,484 i 1867 punktów MEiN, a także 22 doniesienia na konferencjach naukowych.

Tekst autoreferatu został podzielony w sposób typowy dla prac naukowych na rozdziały, a następnie na podrozdziały, co porządkuje przedstawiane treści i ułatwia ich lekturę. Na wstępie Autorka opisuje najważniejsze funkcje prolidazy, w tym jej udział w regulacji różnych szlaków sygnałowych, a szczególnie tych związanych z EGFR oraz ich implikacje kliniczne. Następnie omawia główny cel pracy oraz 4 cele szczegółowe. Cały wstęp jest napisany czytelnie i przejrzysto, w sposób ukierunkowany na główny temat pracy. Całość jest spójna i zrozumiała, cel pracy sformułowany jasno i czytelnie, a przedstawione etapy jego realizacji są logicznie zaplanowane. W kolejnej części Doktorantka omawia użyte materiały oraz zastosowane metody, w tym użyte przeciwciała, procedury otrzymania rekombinowanej prolidazy, prowadzenia hodowli keratynocytów linii HaCaT, oceny żywotności i proliferacji keratynocytów, użyte techniki immunocytochemiczne, mikroskopowe i statystyczne.



W kolejnych częściach: wyniki, dyskusja oraz wnioski Autorka omawia wyniki przeprowadzonych eksperymentów, rozszerzając zakres informacji przedstawionych w poprzednich rozdziałach autoreferatu. Opis jest poprawny, czytelny i przemyślany. Wnioski bezpośrednio wynikają z wyników uzyskanych podczas przeprowadzonych doświadczeń, są czytelnie sformułowane i wnoszą element nowości zarówno do nauki, jak i do praktyki. Następna część pracy zawiera wydruki 3 prac będących podstawą pracy doktorskiej (P1-P3) oraz streszczenia w języku angielskim oraz języku polskim, które zawierają najważniejsze informacje dotyczące przeprowadzonych badań. Bibliografia zawiera 106 pozycji artykułów naukowych ułożonych w kolejności ich cytowania w autoreferacie, z czego połowa ukazała się w ciągu ostatnich 10 lat.

Udział Doktorantki w powstaniu prezentowanych prac jest wiodący, we wszystkich trzech pracach jest pierwszym autorem, a jej procentowy udział wynosi od 65% do 85%. Pierwsze 2 artykuły powstały przy wsparciu jednego promotora, a trzeci przy wsparciu obydwu promotorów. Kolejno zamieszczono stosowne oświadczenia Autorki i Współautorów zamieszczonych prac wchodzących w skład dysertacji, spełniające kryteria włączenia publikacji wieloautorskich do cyklu przedstawionego jako rozprawa doktorska.

Podsumowując pragnę podkreślić, że oceniana dysertacja wywiera bardzo pozytywne wrażenie. Doktorantka wykazała się niezbędnymi kompetencjami do przeprowadzenia opisanych badań, tj. umiejętnością planowania i przeprowadzania doświadczeń, posługiwania się nowoczesnymi i zaawansowanymi metodami biochemicznymi oraz prezentowania wyników swoich badań w formie publikacji naukowych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest oparta o publikacje w czasopismach o wysokim czynnikiem wpływu i wnosi istotne elementy nowości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Stwierdzam, że prezentowana praca spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r., poz. 478), a zatem może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne. W związku z powyższym przedstawiam Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Nizioł do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

Lublin, 24.06.2022

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Chemii Leków  
*Prof. dr hab. Anna Gumieniczek*