



**Wydział Farmaceutyczny  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Weronika Maria Baszanowska**

*Wpływ pozakomórkowej prolidazy na procesy regeneracyjne  
w eksperymentalnym modelu gojenia ran oraz zapalenia  
indukowanego IL-1 $\beta$  w fibroblastach skóry ludzkiej.*

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
*w dyscyplinie nauki farmaceutyczne*

**Promotor**

Prof. dr hab. n. farm. Jerzy Pałka  
Zakład Chemii Leków  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok 2023

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania **prof. dr hab. Jerzemu Palce** oraz **dr hab. Ilonie Ościłowskiej** za wiarę w moje możliwości, przekazaną wiedzę i wyrozumiałość, a także wsparcie merytoryczne na każdym etapie przygotowania niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję również pracownikom i doktorantom Zakładu Chemii Leków i Zakładu Analizy i Bioanalizy Leków za obecność, nieocenioną pomoc i życzliwość podczas mojej naukowej podróży.*

## Spis treści

<b>Rozdział 1.</b>	<b>Finansowanie .....</b>	<b>5</b>
<b>Rozdział 2.</b>	<b>Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej.....</b>	<b>6</b>
<b>Rozdział 3.</b>	<b>Wprowadzenie .....</b>	<b>7</b>
3.1.	Gen prolidazy .....	9
3.2.	Budowa i właściwości prolidazy .....	11
3.3.	Enzymatyczna funkcja prolidazy .....	12
3.4.	Nieenzymatyczna funkcja prolidazy .....	17
3.4.1.	Prolidaza jako ligand ErbB1/EGFR .....	18
3.4.2.	Prolidaza jako ligand ErbB2/HER2.....	19
3.4.3.	Prolidaza jako regulator aktywności p53 .....	20
3.4.4.	Prolidaza jako regulator receptora interferonu $\alpha/\beta$ .....	21
<b>Rozdział 4.</b>	<b>Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej .....</b>	<b>22</b>
<b>Rozdział 5.</b>	<b>Materiały i metody badawcze.....</b>	<b>24</b>
<b>Rozdział 6.</b>	<b>Wyniki .....</b>	<b>26</b>
6.1.	Ocena wpływu prolidazy (PEPD) zwierzęcej na procesy regenreacyjne w eksperymentalnym modelu uszkodzonych mechanicznie fibroblastów skóry ludzkiej.....	26
6.2.	Ocena wpływu rekombinowanej ludzkiej prolidazy (rhPEPD) na procesy regeneracyjne w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$ w fibroblastach skóry ludzkiej. ....	34
<b>Rozdział 7.</b>	<b>Podsumowanie i dyskusja.....</b>	<b>44</b>
<b>Rozdział 8.</b>	<b>Wnioski.....</b>	<b>51</b>
<b>Rozdział 9.</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>52</b>
<b>Rozdział 10.</b>	<b>Streszczenie w języku polskim .....</b>	<b>63</b>
	<b>Streszczenie w języku angielskim .....</b>	<b>65</b>
<b>Rozdział 11.</b>	<b>Kopie publikacji składających się na rozprawę doktorską .....</b>	<b>67</b>
11.1.	<b>Publikacja I.</b> „Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR, $\beta$ 1-integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts” .....	67

11.2.	<b>Material uzupełniający - publikacja I</b> .....	81
11.3.	<b>Publikacja II.</b> „Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts” .....	98
11.4.	<b>Material uzupełniający – publikacja II</b> .....	117
<b>Rozdział 12.</b>	<b>Zgoda Komisji Bioetycznej</b> .....	<b>140</b>
<b>Rozdział 13.</b>	<b>Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej</b> .....	<b>141</b>
<b>Rozdział 14.</b>	<b>Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej</b> .....	<b>142</b>
<b>Rozdział 15.</b>	<b>Dorobek naukowy:</b> .....	<b>147</b>
15.1.	Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską .....	147
15.2.	Wykaz innych publikacji naukowych .....	147
15.3.	Wykaz doniesień zjazdowych .....	149
15.4.	Wykaz innych aktywności naukowych .....	151

## **Rozdział 1. Finansowanie**

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych w ramach grantu OPUS, numer projektu: 2017/25/B/NZ7/02650 pt. „Prolidaza jako czynnik pobudzający gojenie ran w eksperymentalnych modelach komórek skóry”.

## **Rozdział 2. Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej**

1. **Praca oryginalna**: Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Miltyk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>. **IF: 6.208, MEiN: 140 punktów.**
2. **Praca oryginalna**: Baszanowska, W.; Nizioł, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horczak, J.; Miltyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. *Molecules* 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>. **IF: 4.927, MEiN: 140 punktów.**

**Łączna wartość Impact Factor dla cyklu publikacji: 11.135**

**Łączna liczba punktów MEiN dla cyklu publikacji: 280**

### Rozdział 3. Wprowadzenie

Problem trudno gojących się ran, zwłaszcza ran przewlekłych jest stałym wyzwaniem dla współczesnej medycyny i systemu opieki zdrowotnej. Szacuje się, że problem ran przewlekłych dotyczy ok. 3% populacji powyżej 60 roku życia, zatem wiąże się z postępującym procesem starzenia społeczeństwa [1]. Do występowania ran przewlekłych predysponują takie choroby jak cukrzyca, miażdżyca czy otyłość [2,3]. Najczęstszą postacią są owrzodzenia żyłne, zespół stopy cukrzycowej oraz odleżyny. Obecność drobnoustrojów w ranie potęguje problem i zwykle prowadzi do rozwoju zakażenia, zakłócając proces gojenia. Czynnikiem leżącym u podłoża trudno gojących się ran jest między innymi mikroangiopatia, czyli powikłania mikronaczyniowe w następstwie np. uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, stresu oksydacyjnego, hipoksji i innych [2-4]. Szczególnie dotkliwy problem trudno gojących się ran dotyczy osób z niedoborem prolidazy, cytoplazmatycznego enzymu, który w ostatniej dekadzie przykuł uwagę wielu badaczy. Enzymowi temu poświęcę większą część wstępu do niniejszej rozprawy doktorskiej, bowiem badania ostatnich lat przyniosły wiele odkryć sugerujących udział prolidazy w procesie gojenia ran.

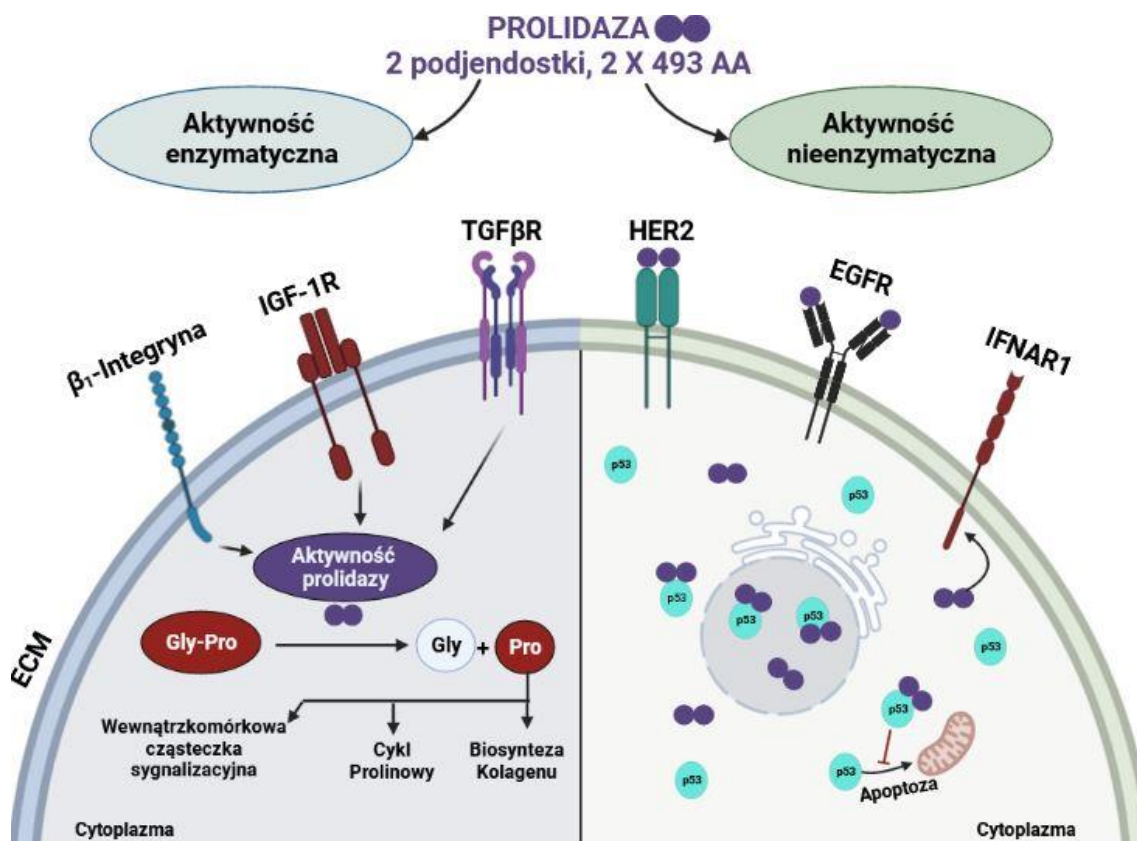
Gojenie ran to wielofazowy proces mający na celu przywrócenie integralności tkanki. Proces naprawczy w uszkodzonej tkance składa się z czterech wzajemnie powiązanych etapów: homeostazy, stanu zapalnego, proliferacji i przebudowy [4-6]. Faza homeostazy charakteryzuje się wytworzeniem skrzepu oraz aktywacją trombocytów (płytek krwi). Trombocyty stymulują produkcję neutrofilii i makrofagów uczestniczących w degradacji składników macierzy pozakomórkowej (ECM), w której zakotwiczone są czynniki wzrostowe. Efektem ich działania jest uwolnienie czynników wzrostowych, które uczestniczą w procesach naprawczych. W fazie zapalnej indukują one czynniki transkrypcyjne, które ulegają translokacji do jądra, prowadząc do produkcji cytokin prozapalnych, takich jak: czynnik martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-8 (IL-8) i interleukina-6 (IL-6) [7]. Fibroblasty stymulowane czynnikami wzrostu są głównym rodzajem komórek tkanki łącznej uczestniczącym w proliferacyjnej fazie gojenia ran oraz produkcji kolagenu na etapie przebudowy ECM [4,8,9].

Jednym z niedawno poznanych czynników uczestniczących w procesach naprawczych jest prolidaza (PEPD). PEPD [EC.3.4.13.9] jest enzymem o podwójnym mechanizmie aktywności biologicznej (Rycina 1). W cytoplazmie PEPD jest niezbędna do proteolizy di- i tripeptydów zawierających prolinę lub hydroksyprolinę w pozycji

C-końcowej [10,11]. Uwolniona prolina uczestniczy w resyntezie kolagenu [12], działa jako cząsteczka sygnalizacyjna oraz substrat dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej w mitochondrialnym cyklu prolinowym, generującym ATP lub reaktywne formy tlenu (RFT) [13]. Wewnątrzkomórkowa funkcja prolidazy ma ogromne znaczenie w skórze właściwej, tkance bogatej w kolagen. Aktywność prolidazy w skórze właściwej znajduje odzwierciedlenie w jej aktywności w komórkach skóry, głównie fibroblastach i keratynocytach. Utarta bądź zmniejszenie katalitycznych właściwości PEPD zaburza metabolizm tkanek wskutek między innymi deficytu proliny niezbędnej do syntezy kolagenu [14-20].

Oprócz funkcji enzymatycznej PEPD działa pozakomórkowo jako ligand receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) i receptora naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) [21-25]. Ponadto PEPD moduluje aktywność transkrypcyjną białka p53 [26] oraz ekspresję receptora interferonu  $\alpha/\beta$  [27]. PEPD-zależna stymulacja szlaków sygnałowych EGFR prowadzi do zwiększenia proliferacji i wzrostu komórek [21], co stanowi obiecujące odkrycie dla doskonalenia terapii regeneracyjnej chorób objawiających się przewlekłymi zaburzeniami metabolizmu tkanki łącznej, zwłaszcza skóry jak np. owrzodzenia, stany zapalne czy odleżyny.





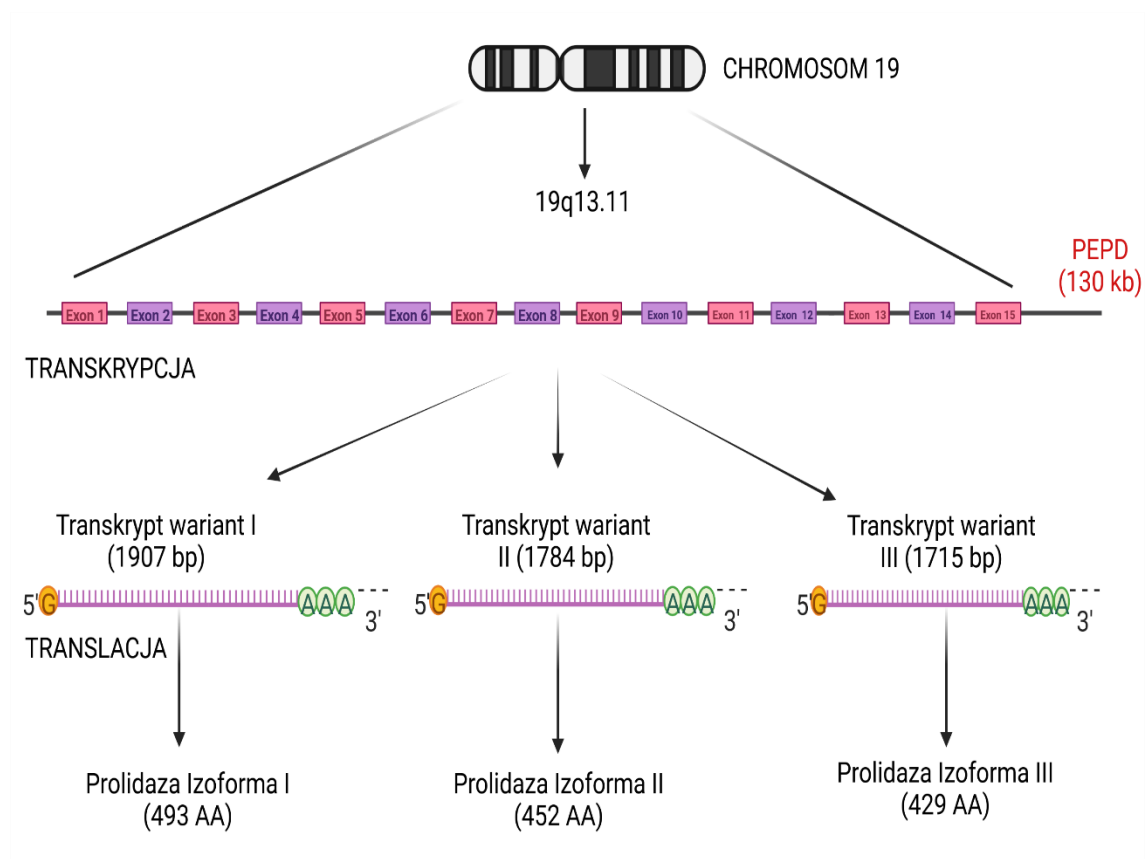
**Rycina 1.** Podwójny mechanizm aktywności biologicznej prolidazy. Utworzono za pomocą BioRender.com.

### 3.1. Gen prolidazy

Prolidaza jest kodowana przez gen PEPD zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 19 w locus 13.11. Struktura genu składa się z 15 egzonów [28]. Odkryto 29 mutacji punktowych w genie PEPD, które powodują brak lub obniżenie aktywności katalitycznej prolidazy, prowadząc do choroby genetycznej znanej jako niedobór prolidazy (PD) [29]. PD dziedziczony jest w sposób autosomalny recesywny. Objawy kliniczne PD charakteryzują się podwyższonym stężeniem imidodipeptydów zawierających prolinę (Pro) bądź hydroksyprolinę (Hyp) we krwi [30]. W cytoplazmie PEPD uwalnia z dipeptydów zawierających Pro/Hyp wolne aminokwasy, które zużytkowane są do biosyntezy kolagenu i innych białek lub ulegają dalszym przemianom [31]. Wydajność recyklingu proliny z dipeptydów do kolagenu u osób zdrowych wynosi około 90-95% [11]. Prolidaza jest zatem niezbędna w obrocie i syntezie kolagenu, a defekty prolidazy prowadzą do zaburzenia jego metabolizmu z powodu zmniejszonej puli dostępnej proliny [32]. Ze względu na istotną rolę kolagenu podczas gojenia ran,

większość pacjentów z PD cierpi z powodu rozległych owrzodzeń, które nie mogą się prawidłowo goić [15,33,34]. Do objawów związanych z PD zalicza się również nawracające infekcje [32,35,36]. Innym objawem PD jest niedobór odporności, spowodowany upośledzeniem składowej dopełniacza C1q, który w swojej strukturze zawiera wiele powtórzeń Gly-Pro [37] oraz upośledzenie umysłowe [38].

Prolidaza może występować w trzech izoformach (Rycina 2). Izoforma 1 jest produktem najdłuższego transkryptu, podczas gdy izoforma 2 prolidazy jest skrócona o segment wewnętrzny od 184 do 224 nukleotydu. Z powodu alternatywnego splicingu, izoforma 3 jest pozbawiona fragmentu nukleotydowego od 68 do 131 nukleotydu [39].



**Rycina 2.** Schematyczna ilustracja organizacji genu prolidazy. Utworzono za pomocą BioRender.com.

Dotychczas wykazano, że ludzkie białko prolidazy występuje w dwóch izoformach; I i II [40]. Najpowszechniej występująca forma I prolidazy ma wyższe powinowactwo do dipeptydów gly-pro i ala-pro. Dla porównania prolidaza II ma wyższe powinowactwo do met-pro i bardzo niskie do gly-pro [40-42]. W ludzkim osoczu dominuje Prolidaza I [43]. Funkcja prolidazy II jest niejasna. Dotychczasowe badania wskazują, że pacjenci

z niedoborem prolidazy mają niedobór prolidazy I, ponieważ zaburzona jest degradacja dipeptydów gly-pro, podczas gdy inne dipeptydy zawierające C-końcówką proline są degradowane [40].

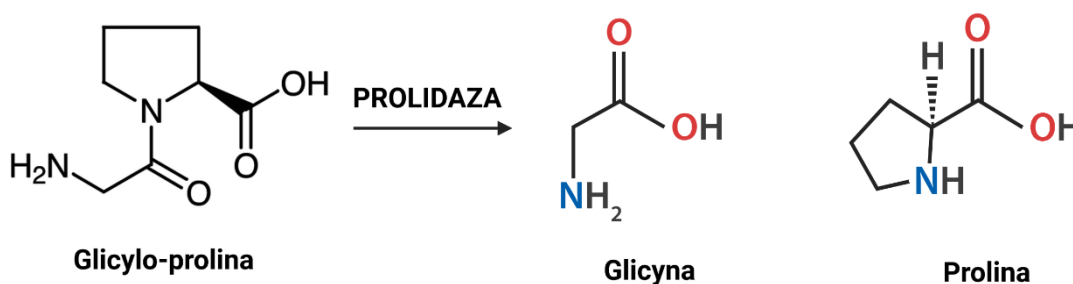
### 3.2. Budowa i właściwości prolidazy

Prolidaza znana jako dipeptydaza X-Pro, dipeptydaza prolinowa, imidodipeptydaza i peptydaza D należy do rodziny metalopeptydaz zależnych od kationów dwuwartościowych, które umożliwiają jej aktywność katalityczną [44,45]. Strukturalnie ludzka prolidaza (izofорма I) jest homodimerem składającym się z dwóch podjednostek zawierających po 493 aminokwasy (AA) każda [45]. Masa cząsteczkowa jednej podjednostki wynosi 58 kDa [40]. Obie podjednostki składają się z domeny N- i C-końcowej. Domena na końcu karboksylowym (185–493 AA) ma taką samą strukturę jak peptydazy z rodziny „chleb pita” (np. aminopeptydaza P, aminopeptydaza metioninowa i kreatynaza) [46]. W obszarze tym występuje centrum aktywne, które wymaga jonów  $Mn^{2+}$  do pełnej aktywności enzymatycznej PEPD. Substrat (Gly-Pro) wiąże się z centrum aktywnym w domenie C-końcowej, podczas gdy domena N-końcowa (1–185 AA) pozostaje luźno związana z substratem. Kationy dwuwartościowe, np.  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  mogą być również obecne jako kofaktory enzymu warunkujące aktywność katalityczną PEPD [46,47].

Ekspresja prolidazy wykazuje zróżnicowanie tkankowe. Najwyższy poziom ekspresji mRNA prolidazy obserwuje się w nerkach, jelicie cienkim i dwunastnicy [48], wysoką aktywność PEPD odnotowano także w erytrocytach, fibroblastach [49] oraz osoczu bogatopłytkowym [50].

U eukariota prolidaza ulega modyfikacjom potranslacyjnym: glikozylacji i fosforylacji [51]. Pośrednio wykazano, że glikozylacja nie wpływa na aktywność katalityczną enzymu [52]. N-glikozylacja może zachodzić w miejscach N13 i N172, a O-glikozylacja w pozycji T458 łańcucha aminokwasowego [49]. W zakresie fosforylacji PEPD pojawiło się kilka doniesień [53,54] potwierdzających, że modyfikacja potranslacyjna zwiększa aktywność katalityczną PEPD. Fosforylacja prolidazy została zidentyfikowana jako potencjalny mechanizm regulacji jej aktywności enzymatycznej. Miejsca fosforylacji obejmują Ser109, Ser134, Ser198, Ser236, Thr86, Tyr117 i Tyr124 [54].

Prolidaza należy do grupy hydrolaz, w związku z tym reakcja enzymatyczna katalizowana przez PEPD wymaga obecności H<sub>2</sub>O. Prolidaza wykazuje najwyższą aktywność enzymatyczną wobec Gly-Pro (Rycina 3) [52,55], aczkolwiek hydrolizuje również inne dipeptydy zawierające C-końcową prolinę, takie jak: Ala-Pro, Met-Pro, Val-Pro i Leu-Pro [50,55]. Kluczowym źródłem substratu (Gly-Pro) są białka bogate w sekwencje aminokwasowe zawierające glicynę, prolinę lub hydroksyprolinę, np. kolagen [55], białka dietetyczne [56] oraz wiele biocząsteczek, takich jak substancja P, plazminogen, oksytocyna, wazopresyna i angiotensyna [23].



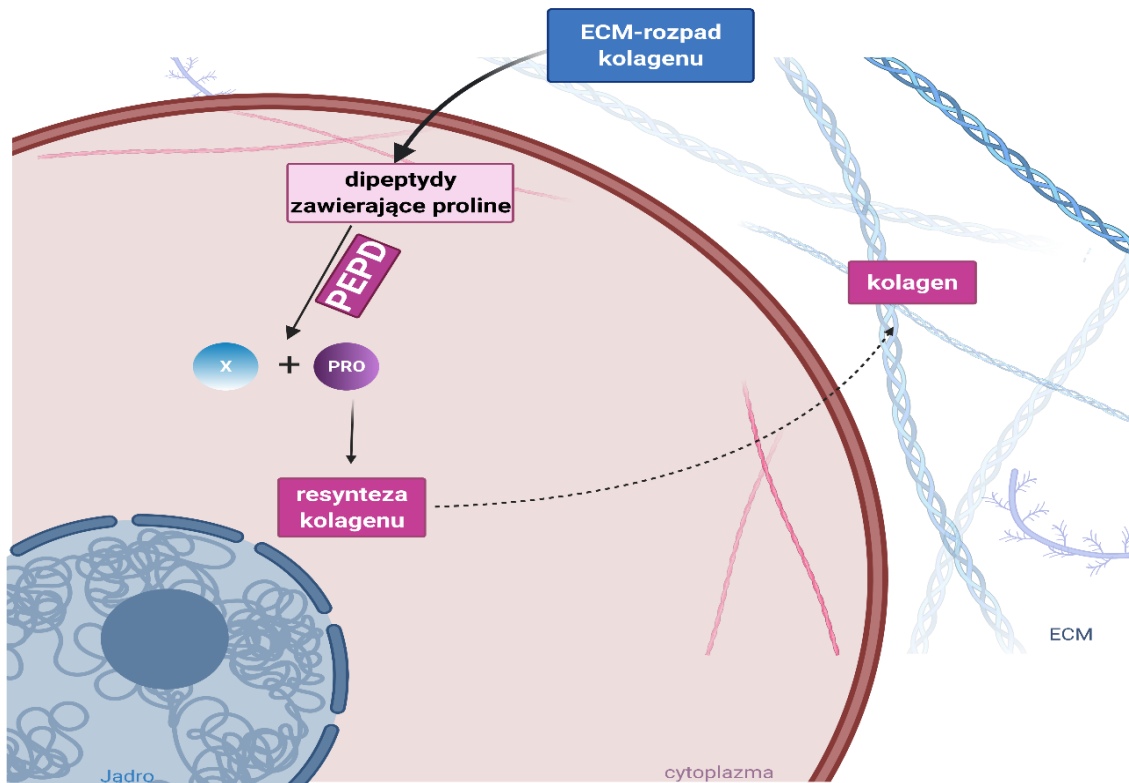
**Rycina 3.** Przykład reakcji katalizowanej przez prolidazę. Hydroliza dipeptydów zawierających C-końcową prolinę/hydroksyprolinę (np. glicylo-prolinę) do wolnych aminokwasów. Utworzono za pomocą BioRender.com.

### 3.3. Enzymatyczna funkcja prolidazy

PEPD odgrywa kluczową rolę w metabolizmie kolagenu poprzez udział w jego degradacji i resyntezie (Rycina 4) [12]. Obrót kolagenu (degradacja i resynteza) warunkuje homeostazę w tkankach. Z tego względu prolidaza odgrywa ważną rolę w procesie gojenia ran, zapaleniu, angiogenezie, proliferacji komórek czy karcynogenezie. Kolagen jest białkiem strukturalnym ECM bogatym w sekwencje Gly-Pro. Jego cząsteczka zawiera trzy łańcuchy polipeptydowe, w których często powtarza się tryplet Gly-X-Y. Miejsca X i Y są zajęte odpowiednio przez prolinę i hydroksyprolinę [57]. Degradacja kolagenu jest inicjowana zewnątrzkomórkowo przez metaloproteinazy [58]. Następnie wewnątrzkomórkowo, w lizosomach zachodzi proteoliza produktów rozpadu kolagenu przy udziale peptydaz lizosomalnych. Nie rozkładają one jednak di- i tripeptydów zawierających C-końcową Pro lub Hyp, dlatego dalsza degradacja peptydów kolagenowych zachodzi w cytoplazmie przez PEPD.

Enzymatyczna aktywność PEPD jest niezbędna w końcowym etapie wewnątrzkomórkowej degradacji kolagenu [10-12,59],

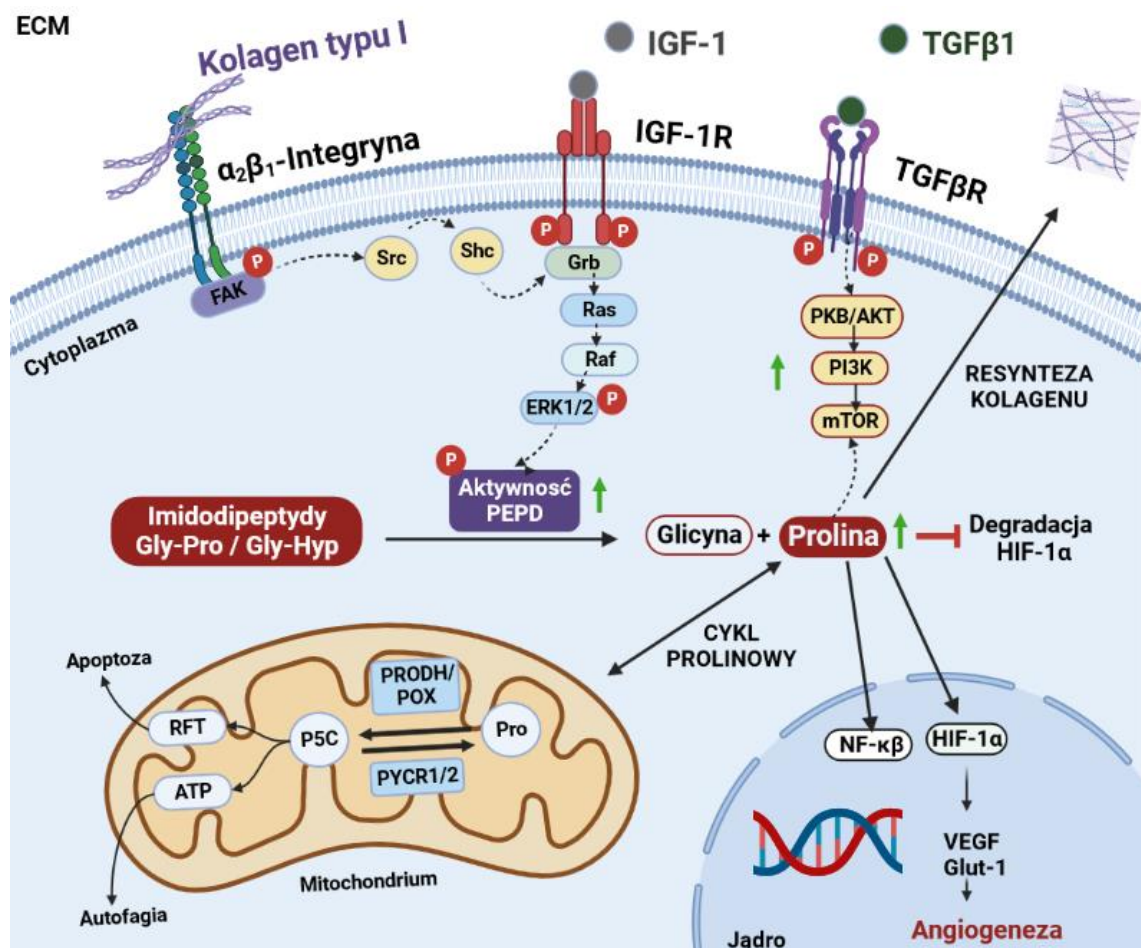
Aktywność prolidazy jest regulowana przez interakcje między białkami ECM (np. kolagenem) a receptorami adhezyjnymi (np. receptorami integrynowymi). Wzrost gęstości komórek w hodowli nasila interakcje pomiędzy kolagenem i receptorem integrynowym  $\beta 1$  przyczyniając się do wzrostu aktywności prolidazy [59].



**Rycina 4.** Rola prolidazy w recyklingu kolagenu. Utworzono za pomocą BioRender.com.

Czynniki zaangażowane w regulację biosyntezy kolagenu mogą również regulować aktywność PEPD. Prawdopodobnie wzrost ilości kolagenu zewnątrzkomórkowego aktywuje receptory integrynowe indukujące szlaki sygnałowe, których efektem jest wzrost aktywności prolidazy. Powiązanie aktywności prolidazy z procesem biosyntezy kolagenu wykazano w wielu modelach komórkowych i zwierzęcych, jak np. w procesie gojenia ran, starzenia [9,12], zwłóknieniu tkanek [60] oraz wrodzonej łamliwości kości [61]. Mechanizmy regulujące aktywność prolidazy, obejmują aktywację receptora integrynowego  $\beta 1$  [59,62], receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R) [63] i receptora transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF $\beta$ R) [64]. Stymulacja tych receptorów przez ich ligandy, odpowiednio kolagen typu

I, IGF1 i TGF- $\beta$ 1, wpływa na aktywność prolidazy i dalsze procesy związane z proliferacją i wzrostem komórki. Prolidaza do pełnej aktywności katalitycznej wymaga fosforylacji niektórych reszt aminokwasowych [54]. Wykazano, że fosforylacja prolidazy za pośrednictwem tlenku azotu (NO) zwiększa aktywność enzymu, podczas gdy hamowanie fosforylacji powoduje spadek aktywności katalitycznej PEPD [53]. Produkty aktywności prolidazy - prolina i hydroksyprolina stymulują biosyntezę kolagenu, stabilizują HIF-1 $\alpha$  poprzez hamowanie jego degradacji i pobudzają szlaki sygnałowe generowane przez receptor TGF $\beta$ R [65-67]. Ponadto uwolniona prolina może odgrywać ważną rolę w metabolizmie energetycznym komórki [13]. Zjawiska te, zilustrowane na Rycinie 5 opisane są w dalszej części niniejszego rozdziału.



**Rycina 5.** Schemat przedstawiający funkcje prolidazy w regulacji niektórych szlaków metabolicznych komórki. Utworzono za pomocą BioRender.com.

Pierwszym doniesieniem o mechanizmie regulacji aktywności prolidazy było wykazanie wpływu interakcji kolagenu z receptorem integrynowym  $\beta$ 1 na aktywność

tego enzymu [59]. Receptory integrynowe są niezbędne do przekazywania (integracji) sygnałów między ECM, a cytoplazmą. Są to heterodimeryczne receptory transbłonowe złożone z podjednostki  $\alpha$  i podjednostki  $\beta$  [62]. Aktualnie znanych jest 18 genetycznie różnych podjednostek  $\alpha$  i 8 różnych podjednostek  $\beta$ . Różne kombinacje tych podjednostek tworzą receptory dla białek ECM np. kolagenów różnych typów, fibronektyny, lamininy, trombospondyny, różnych glikoaminoglikanów i wielu innych. Najbardziej charakterystyczny jest receptor integrynowy  $\beta 1$ . Warto zauważyć, że specyficznym ligandem receptora integrynowego  $\beta 1$  jest kolagen typu I. Głównym efektem pobudzenia receptora integrynowego  $\beta 1$  jest wzrost biosyntezy kolagenu [59,68]. Mechanizm tego zjawiska polega na pobudzeniu czynników transkrypcyjnych indukujących ekspresję genów kolagenu i wielu innych białek zaangażowanych w regulację proliferacji, różnicowania i metabolizm komórkowy. Badania Surażyńskiego i wsp. dowiodły, że integryna  $\beta 1$  pobudza szlak Ras-Raf-MEK-ERK, zwiększając aktywność katalityczną PEPD. Co więcej inhibitory integryny  $\beta 1$  hamują szlak Ras-Raf-MEK-ERK z równoczesnym obniżeniem aktywności PEPD, co wskazuje na ważną funkcję tego receptora w regulacji aktywności PEPD [69].

Innym przykładem czynnika, który stymuluje biosyntezę kolagenu i reguluje aktywność prolidazy, jest insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF1). IGF1 jako ligand receptora IGF1R, stymuluje biosyntezę kolagenu, prowadząc do wzrostu aktywności prolidazy w fibroblastach skóry ludzkiej [63,70]. Na aktywność prolidazy wpływa również indukcja stresu oksydacyjnego, który oddziałuje na sygnalizację receptora IGF1 [71].

TGF- $\beta 1$  jest cytokiną, która odgrywa kluczową rolę w gojeniu ran, proliferacji i różnicowaniu komórek. Powiązano ją z rozwojem zwłóknienia tkanek ze względu na jej zdolność do stymulowania biosyntezy kolagenu [64]. TGF- $\beta 1$  może powodować zwłóknienie poprzez indukowanie produkcji inhibitora proteaz, co zapobiega enzymatycznemu rozkładowi białek ECM, szczególnie kolagenu [66]. Wykazano, że inhibitory prolidazy obniżają ekspresję TGF- $\beta 1$  i jego receptora w fibroblastach [67]. Powoduje to upośledzenie białek szlaków sygnałowych stymulowanych przez receptor TGF $\beta$ , takich jak kinaza białkowa B (PKB lub AKT), 3-kinaza fosfatydyloinozytydu (PI3K) i kinaza mTOR (tzw. ssaczy cel rapamycyny). Istnieje przypuszczenie, że produkty aktywności prolidazy, a nie tylko białko PEPD, mogą wpływać na regulację sygnału w szlakach zależnych od TGF $\beta$ R [67].

Wykazano, że prolina i hydroksypolina, produkty aktywności enzymu prolidazy, hamują degradację jądrowego czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF-1 $\alpha$ ) [65]. HIF-1 $\alpha$  związany jest z gojeniem ran, ponieważ aktywują geny związane ze stanem zapalnym, angiogenezą i zwłóknieniem. Jako czynnik transkrypcyjny stymuluje między innymi ekspresję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), transportera glukozy-1 (GLUT-1) i transformującego czynnika wzrostu - TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2. Nadekspresja prolidazy powoduje wzrost poziomu HIF-1 $\alpha$ , co prowadzi do podwyższenia poziomu produktów zależnych od HIF-1 $\alpha$  [72]. Podobnie na poziomie transkrypcyjnym prolina bądź hydroksypolina modulują jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$ B) [73]. NF- $\kappa$ B pełni znaczącą rolę w procesach odpornościowych i zapalnych. Zdolność NF- $\kappa$ B do hamowania apoptozy, indukcji proliferacji oraz nasilania procesu angiogenezy sugeruje, że NF- $\kappa$ B może być istotnym czynnikiem w procesie onkogenezy i progresji nowotworu. Wysokiej aktywności PEPD towarzyszy niska ekspresja NF- $\kappa$ B, prawdopodobnie z powodu zwiększonego poziomu Pro lub Hyp [73].

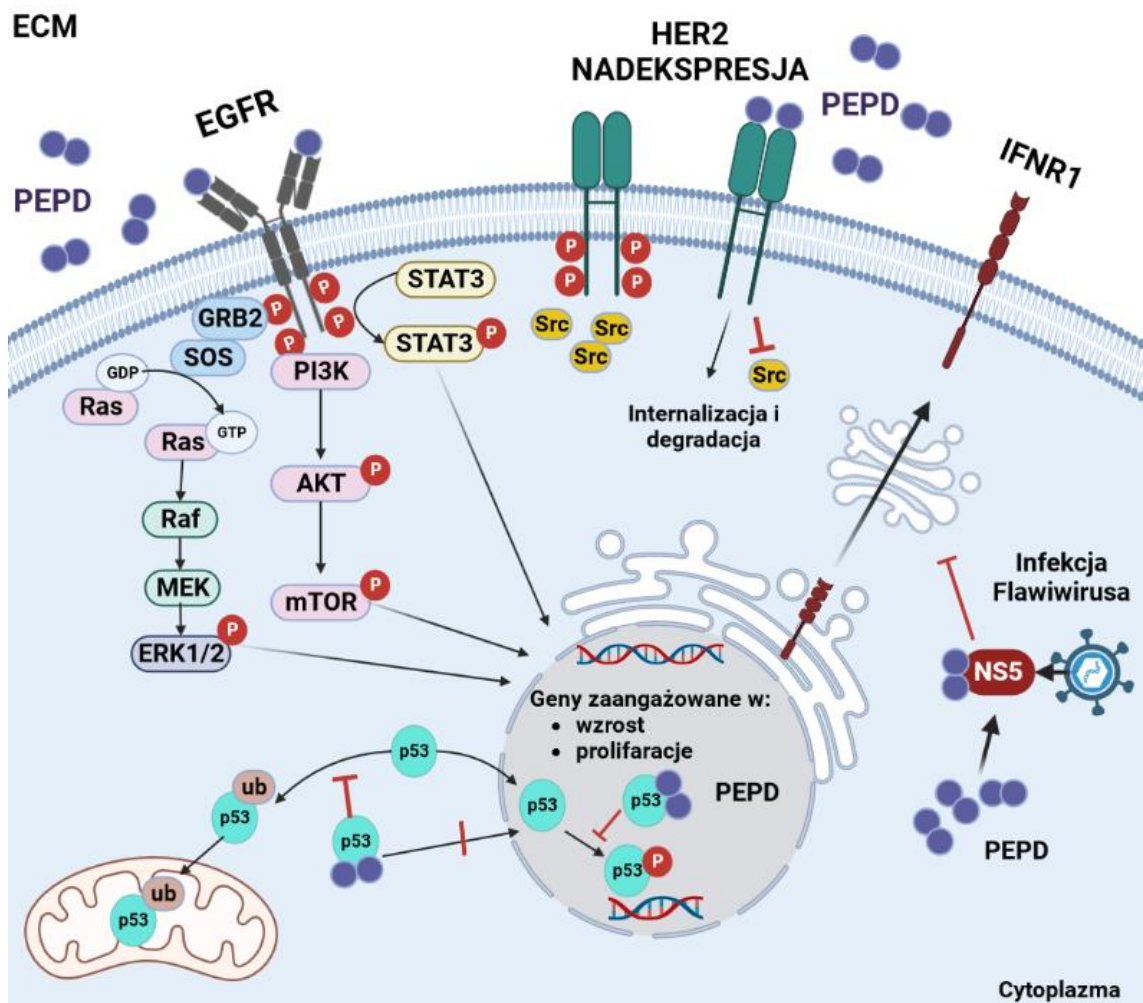
Ponadto prolina odgrywa istotną rolę w metabolizmie energetycznym komórki i równowadze redoks [13]. W cyklu prolinowym, prolina ulega konwersji enzymatycznej do kwasu pirolino-5-karboksylowego (P5C) pod wpływem enzymu mitochondrialnego – dehydrogenazy/oksydazy prolinowej (PRODH/POX) [74]. Podczas tego procesu elektrony są transportowane do łańcucha oddechowego w błonie mitochondrium gdzie dochodzi do wytworzenia cząsteczki ATP lub w przypadku kiedy elektrony są bezpośrednio wychwytywane przez tlen dochodzi do powstania reaktywnych form tlenu (RFT) [75]. Generowana cząsteczka ATP uzupełnia niedobory energetyczne komórki (zwłaszcza w sytuacji głodu energetycznego) sprzyjając jednocześnie jej przeżyciu. Powstające w komórce RFT sprzyjają natomiast indukcji apoptozy bądź pro-przeżyciowej autofagii [76-77].

P5C powstający z proliny przy udziale PRODH/POX jest krótkotrwałym metabolitem bowiem ulega szybko redukcji przez reduktazę P5C (PYCR) do proliny. Konwersja proliny w P5C i P5C w prolinę zwana jest cyklem prolinowym. P5C może zatem służyć jako prekursor i produkt konwersji proliny. P5C może także pochodzić z glutaminianu lub ornityny przy udziale syntazy P5C (P5CS) [77,78] lub aminotransferazy ornitynowej (OAT) [79], łącząc metabolizm proliny z cyklem Krebsa i cyklem mocznikowym [13]. Sugeruje to kluczową rolę proliny w regulacji metabolizmu cukrów, lipidów i białek.



### 3.4. Nieenzymatyczna funkcja prolidazy

Yang i in. [21] zapoczątkowali nową erę badań nad prolidazą. Autorzy wykazali, że PEPD jest ligandem receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (ErbB1/EGFR i ErbB2/HER2), która do tej funkcji nie wymaga aktywności katalitycznej. Ponadto reguluje aktywność białka p53 [26] i dojrzewanie IFNAR1 [27]. Te odkrycia rzuciły nowe światło na funkcje PEPD i wskazały na nowy obszar badań nad rolą PEPD w procesie gojenia ran. Poniższe akapity w tym rozdziale opisują nowo odkryte funkcje PEPD jako regulatora wielu procesów metabolicznych komórki (Rycina 6).



**Rycina 6.** Schemat przedstawiający nieenzymatyczną funkcję prolidazy w regulacji niektórych szlaków metabolicznych komórki. Utworzono za pomocą BioRender.com.

### 3.4.1. Prolidaza jako ligand ErbB1/EGFR

Pierwsze badanie prezentujące nową funkcję prolidazy opublikowali Yang et al. [21] w 2013r. Badacze dowiedli, że prolidaza zlokalizowana pozakomórkowo może bezpośrednio wiązać się z EGFR [21]. PEPD-zależna aktywacja szlaków sygnałowych EGFR nie wymaga jej aktywności enzymatycznej, co sugeruje nową rolę PEPD w metabolizmie komórkowym. Strukturalnie EGFR jest receptorem transbłonowym składającym się z: domeny wewnątrzkomórkowej na końcu karboksylowym, wykazującej aktywność kinazy białkowej oraz domeny zewnątrzkomórkowej, która wiąże się z ligandem [80].

PEPD jako nowy ligand EGFR odbiega strukturalnie od dotychczas poznanych ligandów EGFR, np. naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), wiążącego heparynę czynnika wzrostu podobnego do EGF (HB-EGF), transformującego czynnika wzrostu (TGF), amfireguliny, epireguliny czy neureguliny [81]. Nadal nie wiadomo, która domena lub region PEPD wiąże się z zewnątrzkomórkową domeną EGFR. Wiązanie prolidazy z zewnątrzkomórkową domeną EGFR skutkuje indukcją szlaków pro-wzrostowych i pro-proliferacyjnych. W rezultacie domena wewnątrzkomórkowa o aktywności kinazy białkowej przekazuje sygnał do dalszych białek tego szlaku, m.in. kinazy 3-fosfoinozytydowej (PI3K)/ kinazy białkowej B (Akt)/ oraz kinazy mTOR (tzw. ssaczy cel rapamycyny). Sygnał pozakomórkowy reguluje także szlaki z udziałem kinazy (ERK) 1/2, kinazy Janusa (JAK)/ oraz konwertora sygnału i aktywatora transkrypcji 3 (STAT3) [82] (Rycina 6). W przypadku nadekspresji EGFR prolidaza wycisza szlaki Akt, ERK1/2 i STAT3, po czym następuje internalizacja i degradacja receptora [24,83]. Porównując powinowactwo EGF i PEPD do zewnątrzkomórkowej domeny EGFR, EGF jest silniejszym ligandem niż prolidaza około 350 razy. Wiadomo, że zewnątrzkomórkowy fragment EGFR zawiera cztery domeny. Prolidaza wiąże się z domeną 2 w przeciwieństwie do EGF, który wiąże się z domenami 1 i 3 EGFR. Prolidaza jest związana z EGFR tylko na powierzchni komórki jako homodimer, ostatecznie tworząc tetramer (dimer EGFR + dimer PEPD) [24]. EGF, jako silniejszy ligand EGFR, wypiera PEPD z wiązania z EGFR. Obrazy konfokalne wykazały, że PEPD i EGFR kolokalizują błonę komórkową, co potwierdza hipotezę, że PEPD wiąże się z EGFR w postaci relacji ligand-receptor. PEPD może aktywować EGFR poprzez fosforylację tyrozyny w pozycjach 1068 i 1173, a następnie indukuje białka Akt, STAT3 i ERK1/2) [24]. EGF aktywuje sygnalizację zależną od EGFR szybciej niż PEPD.

Zastosowanie inhibitora EGFR powoduje całkowitą blokadę fosforylacji białek szlaków EGFR-zależnych indukowanych przez PEPD. PEPD pobudza ścieżki sygnałowe zależne od EGFR prowadząc do zwiększonej syntezy DNA w sposób zależny od dawki [24,84]. Odkrycia te wydają się obiecujące dla doskonalenia terapii regeneracyjnej, mającej na celu promowanie proliferacji i wzrostu komórek.

Ponieważ wewnątrzkomórkowy PEPD nie może aktywować EGFR jako ligand, istotne jest znalezienie odpowiedzi na pytanie o źródło prolidazy zewnątrzkomórkowej stymulującej EGFR. Ważnym źródłem prolidazy są uszkodzone komórki po urazie. Badania *in vitro* wykazały, że wystarczy 2,7 nM PEPD do aktywacji EGFR [21], podczas gdy w eksperymentach *in vivo* stężenie PEPD osiągnęło 3 nM w krwiobiegu po chemicznym uszkodzeniu komórek wątroby. To odkrycie pociąga za sobą nowe pytanie: czy prolidaza ulega pozakomórkowej degradacji zapobiegając stymulacji EGFR? Niedawne badanie przeprowadzone przez Yang i in. [85] dowiodło, że proteazy serynowe obecne w osoczu, inaktywują PEPD poprzez białka kaskady krzepnięcia krwi. Wykazali, że obecna w krwiobiegu prolidaza jest szybko wiązana z bogatą w prolinę domeną czynnika XII. Kaskada krzepnięcia krwi wyzwala także aktywację czynnika VII. Aktywowany czynnik VII inaktywuje krążącą w krwiobiegu prolidazę. Ten mechanizm inaktywacji PEPD pozostaje niewyjaśniony. Kolejne pytanie dotyczące eksportu prolidazy z komórki pozostaje bez odpowiedzi, a mianowicie, w jaki sposób cytoplazmatyczna prolidaza może być wydzielana do przestrzeni pozakomórkowej.

### **3.4.2. Prolidaza jako ligand ErbB2/HER2**

Po odkryciu zależnej od PEPD aktywacji EGFR autorzy dokonali odkrycia, że PEPD działa jako ligand HER2 [22], innego receptora z rodziny EGFR. Homodimerski PEPD wiąże się z HER2 w 3 domenie zewnątrzkomórkowej. Jeśli HER2 jest formą monomeru, PEPD aktywuje HER2 poprzez dimeryzację i fosforylację, ale dzieje się to powoli. Z kolei, jeśli HER2 jest dimerem, aktywacja receptora przez PEPD następuje szybciej. Wykazano, że PEPD nie wiąże się z domeną transbłonową HER2 ani regionem wewnątrzkomórkowym. HER2, podobnie jak EGFR, jest aktywowany niezależnie od funkcji enzymatycznej prolidazy. Ponadto wewnątrzkomórkowa prolidaza nie wpływa na dalsze szlaki HER2. PEPD wycisza sygnały HER2-zależne przy nadekspresji HER2, co jest kolejnym podobieństwem do receptora EGF. Nadekspresja szlaków zależnych od HER2 jest zniesiona przez

przerwanie kompleksu HER2-Src. W rezultacie inwazyjny fenotyp komórek nowotworowych z nadekspresją HER2 po związaniu z PEPD jest znacząco hamowany [65]. Efekty PEPD związane z nadekspresyjną sygnalizacją zależną od HER2 obejmują hamowanie fenotypu pro-proliferacyjnego poprzez defosforylację receptora i defosforylację dalszych kinaz, takich jak Src, Akt, ERK1/2 i STAT3. Funkcja hamująca PEPD jako ligand HER2 obejmują również aktywację białkowych markerów apoptozy, takich jak: Bax i kaspaza-3, -8 i -9 [23]. To odkrycie wskazuje na nową strategię terapeutyczną w leczeniu raków HER-dodatnich. Korzystny efekt przeciwnowotworowy PEPD związany jest ze zwiększoną wrażliwością komórek nowotworowych na leczenie farmakologiczne, co daje podstawę do opracowania nowych opcji terapeutycznych dla tej grupy nowotworów.

### **3.4.3. Prolidaza jako regulator aktywności p53**

W ostatnich latach odkryto nową funkcję prolidazy w regulacji białka p53 [26]. Białko p53 jako strażnik genomu, pełni ważną rolę w kontrolowaniu funkcji komórkowych związanych z cyklem komórkowym, naprawą DNA, apoptozą i metabolizmem komórkowym. Chroni komórki przed niekontrolowanym podziałem komórkowym, który może prowadzić do proliferacji zmutowanych komórek i sprzyjać progresji nowotworu [57]. Istnieje kilka mechanizmów regulujących działanie p53, między innymi poprzez jego modyfikacje potranslacyjne [86]. Wśród tych mechanizmów prolidaza wykazuje funkcję regulacyjną na p53 poprzez ograniczanie transportu subkomórkowego p53 i hamowanie fosforylacji p53 [26].

Zaobserwowano, że aktywacja p53 jest związana z wyciszeniem PEPD. Prolidaza zapobiega translokacji p53 do mitochondriów, gdzie inicjowana jest apoptoza. PEPD może również hamować aktywność transkrypcyjną p53 poprzez hamowanie fosforylacji białka w jego domenie transaktywacyjnej. W warunkach wyciszenia PEPD promowana jest fosforylacja p53 w pozycjach Ser6 i Ser15. Powyższe odkrycia dowodzą, że prolidaza reguluje zarówno zależne, jak i niezależne od transkrypcji funkcje p53 [26].

Yang i in. [26] dowiedli, że PEPD reguluje aktywność p53 poprzez bezpośrednie wiązanie z tym białkiem. Wykazali, że domena katalityczna PEPD jest powiązana z bogatą w prolinę domeną p53. Aktywność enzymatyczna prolidazy nie jest wymagana do regulacji funkcji p53. Stwierdzono, że około 6% cząsteczek prolidazy wiąże się z p53, podczas gdy ponad połowa cząsteczek p53 wiąże się z PEPD, co wskazuje,

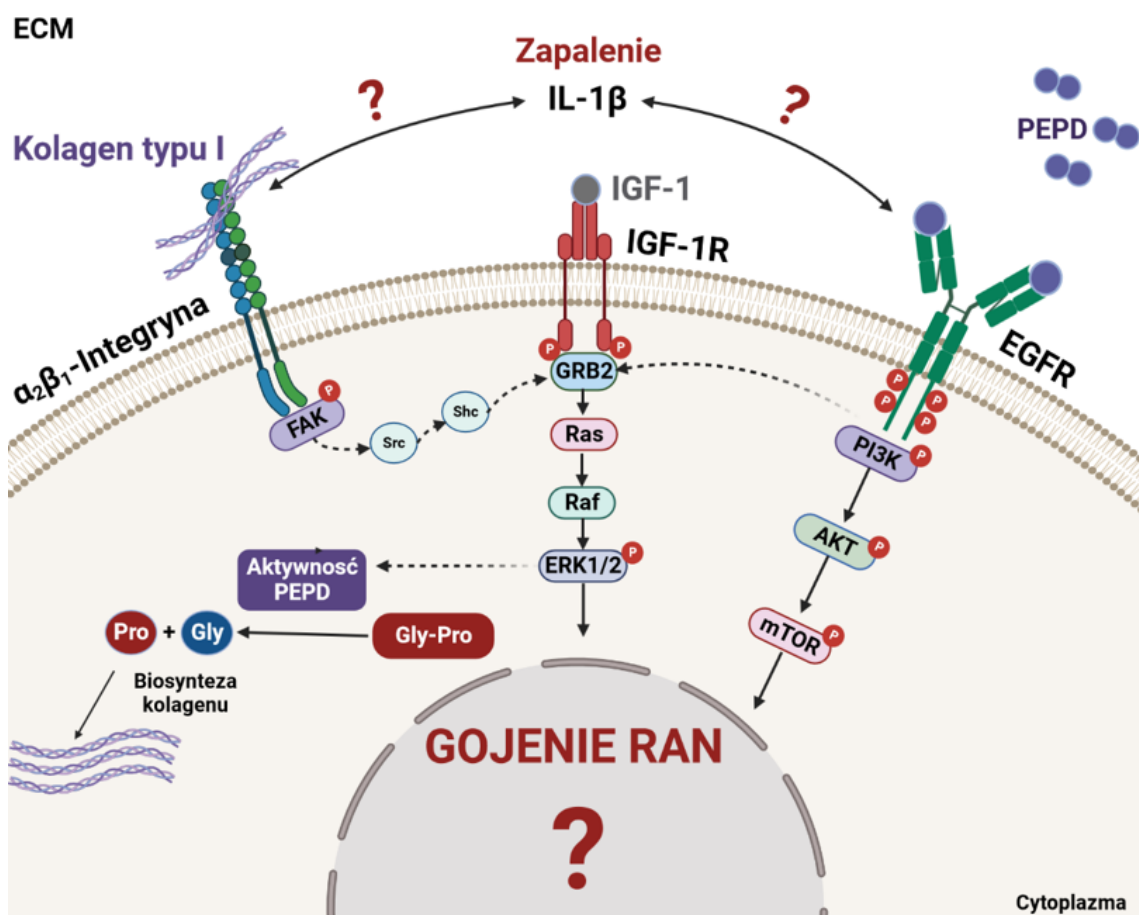
że prolidaza chroni p53 przed niekontrolowaną aktywacją. Pod wpływem stresu komórkowego kompleks PEPD-p53 dysocjuje, uwalniając i aktywując p53. Przykładem warunków stresowych na poziomie komórkowym jest stres oksydacyjny wywołany przez reaktywne formy tlenu. Przywrócenie równowagi redoks zapobiega dysocjacji PEPD-p53, a także późniejszemu hamowaniu wzrostu komórek i indukcji apoptozy. Ponadto kompleks PEPD-p53 zaobserwowano w jądrze i cytozolu. Zaburzona równowaga redoks prowadzi do dysocjacji kompleksu i pobudzenia aktywności p53 [26,87]. Ponieważ p53 determinuje los komórek, odkrycie to może przyczynić się do dalszych badań nad patomechanizmem wielu chorób, którym towarzyszy stres oksydacyjny.

#### **3.4.4. Prolidaza jako regulator receptora interferonu $\alpha/\beta$**

Lubick i in. [27] przedstawili nową fizjologiczną funkcję PEPD jako regulatora receptora interferonu  $\alpha/\beta$  (IFNAR1). Szlaki sygnałowe zależne od interferonu  $\alpha/\beta$  są zaangażowane w odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusom np. wirusowi kleszczowego zapalenia mózgu. Wyniki badań wskazały, że ekspresja IFNAR1 jest zmniejszona podczas infekcji wywołanej flawiwirusem. Wspólną cechą flawiwirusów jest wykorzystywanie niestrukturalnego białka 5 (NS5) jako antagonisty IFNAR1 [88,89], co prowadzi do tłumienia odpowiedzi immunologicznej. PEPD bierze udział w dojrzewaniu receptora interferonu  $\alpha/\beta$  uczestnicząc w potranslacyjnej glikolizacji tego białka. Z badań wynika, że działanie prolidazy jest blokowane przez wiązanie N-końcowej domeny PEPD z NS5, co prowadzi do zmniejszonej ekspresji receptora interferonu  $\alpha/\beta$  [27]. Podobnie jak w przypadku innych nieenzymatycznych właściwości prolidazy, PEPD reguluje funkcję IFNAR1 niezależnie od jej aktywności katalitycznej [27]. Niewłaściwe dojrzewanie IFNAR1 u pacjentów z niedoborem prolidazy może przyczynić się do problemów immunologicznych. Podsumowując, prolidaza – jako enzym cytoplazmatyczny – jest blokowana przez białko wirusowe, co prowadzi do zahamowania odpowiedzi immunologicznej zależnej od IFNAR1.

## Rozdział 4. Cel pracy z uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej

Biorąc pod uwagę fakt, że pozakomórkowa prolidaza jest ligandem EGFR i aktywuje EGFR-zależne szlaki sygnalizacyjne, postanowiłam sprawdzić czy PEPD w eksperymentalnych warunkach mechanicznego uszkodzenia komórek bądź zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  prowadzi do pobudzenia proliferacji, migracji i biosyntezy kolagenu w fibroblastach skóry ludzkiej ułatwiając proces gojenia ran. Na rycinie 7 przedstawiłam hipotezę mechanizmu tego procesu z udziałem aktywacji przez PEPD szlaków sygnałowych generowanych przez EGFR, integrynę  $\beta 1$  i IGF-1R.



**Rycina 7.** Ilustracja hipotezy udziału PEPD w procesie gojenia ran przy udziale szlaków sygnałowych zależnych od EGFR, integryny  $\beta 1$  i IGF-1R w eksperymentalnych warunkach mechanicznego uszkodzenia i zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  w fibroblastach skóry ludzkiej. Utworzono za pomocą BioRender.com.

**Celem moich badań była ocena:**

1. Wpływu prolidazy z nerek świni na żywotność, proliferację, migrację komórek, ekspresję wybranych białek szlaków sygnałowych zależnych od EGFR, integryny  $\beta 1$  i IGF-1R oraz biosyntezę kolagenu w eksperymentalnym modelu uszkodzonych mechanicznie fibroblastów skóry ludzkiej.
2. Wpływu rekombinowanej prolidazy ludzkiej na żywotność, proliferację, migrację komórek, ekspresję wybranych białek szlaków sygnałowych zależnych od EGFR i integryny  $\beta 1$  oraz biosyntezę kolagenu w eksperymentalnym modelu zapalnym indukowanym IL-1 $\beta$  w fibroblastach skóry ludzkiej.

## **Rozdział 5. Materiały i metody badawcze**

Badania przeprowadzono na lini komórkowej fibroblastów skóry ludzkiej (CRL-2072, ATCC, Manassas, VA, USA) w dwóch eksperymentalnych modelach badawczych (Rycina 8):

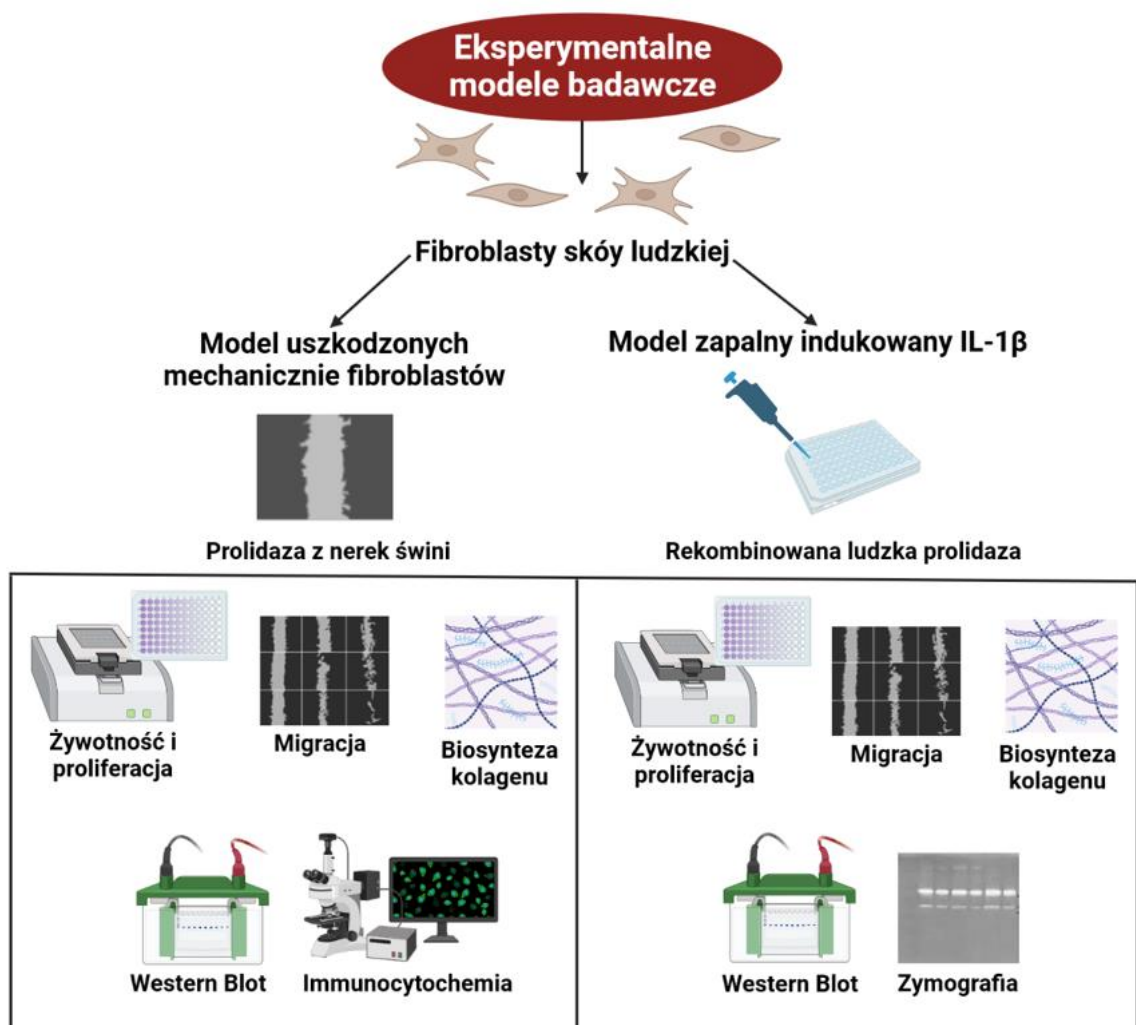
### **1. Eksperymentalnym modelu uszkodzonych mechanicznie fibroblastów in vitro.**

Fibroblasty w fazie inhibicji kontaktowej uszkodzono mechanicznie przy użyciu sterylnej końcówki pipety o objętości 200  $\mu$ l, przemyto trzykrotnie roztworem buforowym soli fizjologicznej (PBS) i inkubowano z prolidazą z nerki świni (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) w stężeniach 1-100 nM w pożywce hodowlanej DMEM pozbawionej płodowej surowicy bydlęcej (FBS).

### **2. Eksperymentalnym modelu zapalnym indukowanym interleukiną 1 $\beta$ .**

Fibroblasty w fazie inhibicji kontaktowej inkubowano z ludzką rekombinowaną IL-1 $\beta$  (10 ng/ml; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) i ludzką rekombinowaną prolidazą (rhPEPD) w stężeniach 1-100 nM w pożywce hodowlanej DMEM pozbawionej FBS.





**Rycina 8.** Schemat przedstawiający eksperymentalne modele i metody badawcze wykorzystane podczas pracy. Utworzono za pomocą BioRender.com.

#### Metody badawcze:

1. **Pomiar przeżywalności komórek**- metodą MTT i NRU
2. **Pomiar proliferacji komórek**- za pomocą CyQuant Proliferation Assay
3. **Test gojenia ran in vitro**- mechaniczne uszkodzenie fibroblastów
4. **Pomiar biosyntezy kolagenu**- metodą radiometryczną
5. **Analiza ekspresji białek**- za pomocą Western blot i immunocytochemii sprzężonej z mikroskopią konfokalną
6. **Analiza aktywności metaloproteinaz**- metodą zymografii

Wszystkie metody, prowadzenie hodowli komórkowych, a także analizę statystyczną opisano w artykułach badawczych zawartych w dysertacji.

## Rozdział 6. Wyniki

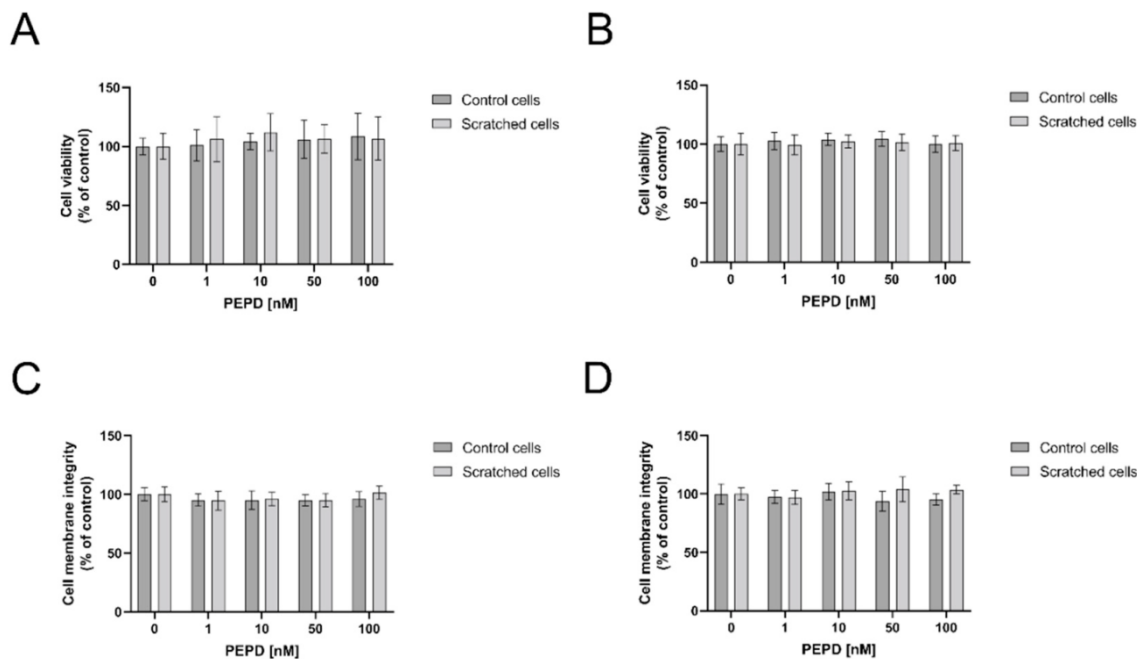
W niniejszym rozdziale przedstawiłam najważniejsze wyniki opublikowane w dwóch pracach oryginalnych załączonych do dysertacji.

**Publikacja 1.** „Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta$ 1-integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts”.

### 6.1. Ocena wpływu prolidazy (PEPD) zwierzęcej na procesy regeneracyjne w eksperymentalnym modelu uszkodzonych mechanicznie fibroblastów skóry ludzkiej.

#### Wpływ PEPD na żywotność fibroblastów

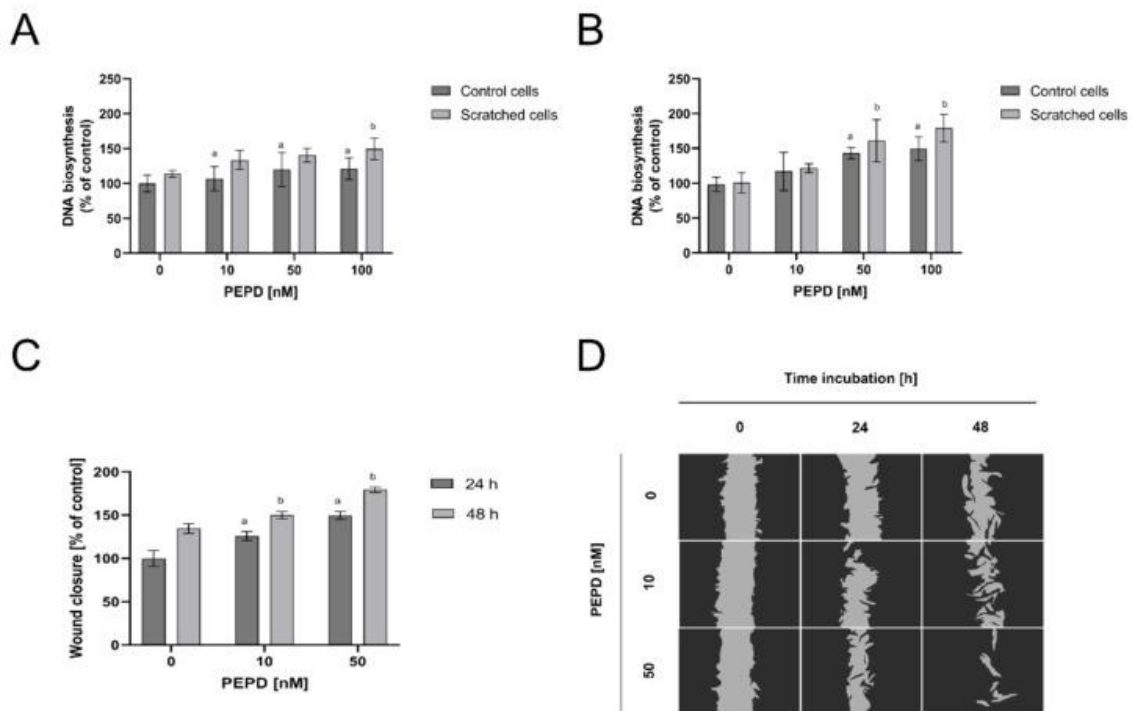
Wpływ PEPD na żywotność komórek oceniano testem MTT (Rycina 9A, B) i pomiarem integralności błon komórkowych (Rycina 9C, D). Traktowanie fibroblastów PEPD (1, 10, 50, 100 nM) nie wpłynęło na żywotność komórek ani integralność błon komórkowych w obu modelach komórkowych, kontrolnym i „uszkodzenia mechanicznego”, odpowiednio po 24 i 48 godzinach inkubacji.



**Rycina 9.** Żywotność komórek i integralność błon komórkowych w fibroblastach kontrolnych oraz fibroblastach uszkodzonych mechanicznie (scratched cells), inkubowanych z PEPD (1, 10, 50, 100 nM) przez 24 godziny (A, C) i 48 godzin (B, D). Przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SD z trzech doświadczeń przeprowadzonych w powtórzeniach. Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy  $P < 0,05$ .

### Wpływ PEPD na biosyntezę DNA i migrację fibroblastów

Wpływ PEPD na biosyntezę DNA (odzwierciedlającą proliferację fibroblastów) w komórkach uszkodzonych mechanicznie (scratched cells) zmierzono za pomocą testu fluorescencyjnego. Komórki inkubowano z PEPD w stężeniach (10, 50, 100 nM) przez 24 i 48 godzin. Jak pokazano na Rycinie 10A, PEPD pobudza biosyntezę DNA zarówno komórek kontrolnych, jak i „uszkodzonych mechanicznie”. Proces ten jest zależny od czasu inkubacji ponieważ po 48 godzinach (Rycina 10B) efekt działania PEPD był nasilony.



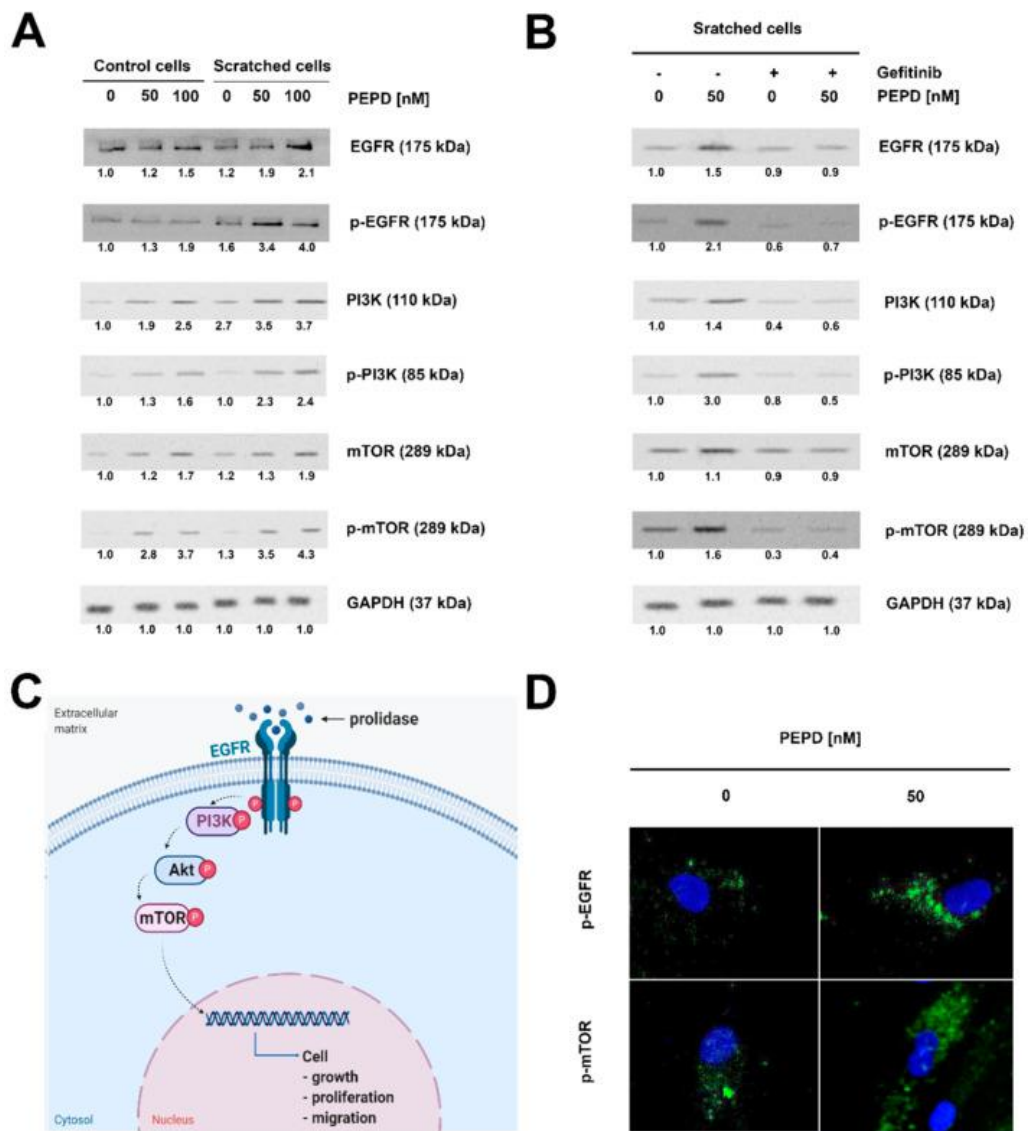
**Rycina 10.** Biosynteza DNA (A,B) i migracja fibroblastów (C,D) zależna od PEPD w modelu gojenia rany in vitro. (A, B) Komórki kontrolne jak również mechanicznie uszkodzone (scratched cells) traktowano PEPD (10, 50, 100 nM) przez 24 i 48 godzin. Proliferację komórek oceniano za pomocą testu CyQuant Proliferation. (C, D) Migrację fibroblastów stymulowanych PEPD w porównaniu z kontrolą obliczono przy użyciu

oprogramowania ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Komórki uszkodzone mechanicznie, traktowane PEPD monitorowano za pomocą mikroskopu (40-krotne powiększenie) po 0, 24 i 48 godzinach. Przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SD z trzech doświadczeń przeprowadzonych w powtórzeniach. Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy a, b  $P < 0,05$ , a wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD) dla 24 godzinnej inkubacji, b vs. kontrola (0 nM PEPD) dla 48 godzinnej inkubacji.

Podobnie, wpływ zewnątrzkomórkowej PEPD na migrację fibroblastów zbadano w teście gojenia rany (wound closure). Wyniki przedstawione na Rycinie 10C pokazują, że PEPD indukuje gojenie rany w sposób zależny od dawki PEPD i czasu inkubacji. Kwantyfikacja komórek zranionego obszaru wykazała, że fibroblasty traktowane PEPD migrowały szybciej do zranionego obszaru niż komórki kontrolne, zwłaszcza po 48 godzinach inkubacji. Wyniki te zostały potwierdzone przez wizualizację mikroskopową, jak pokazano na Rycinie 10D. W komórkach traktowanych PEPD przez 48 godzin doszło do niemal całkowitego zamknięcia rany, podczas gdy mechanicznie uszkodzony obszar komórek kontrolnych (bez traktowania PEPD) pozostawał bez zmian. Otrzymane wyniki wykazały, że gojenie ran indukowane przez PEPD jest zależne od dawki i czasu traktowania fibroblastów PEPD.

### **Wpływ PEPD na indukując szlaków sygnałowych zależnych od EGFR**

PEPD jest ligandem receptora naskórkowego czynnika wzrostowego (EGFR). Aby sprawdzić, czy pozakomórkowa PEPD może regulować funkcje zależne od EGFR, oceniano ekspresję niektórych białek sygnałowych EGFR-zależnych w fibroblastach traktowanych PEPD. Jak przedstawiono na Rycinie 11A, w komórkach traktowanych PEPD (50 i 100 nM) ekspresja fosforylowanych i całkowitych form EGFR, PI3K (p85) oraz białka mTOR była zwiększona w sposób zależny od dawki. Ekspresję fosfo-EGFR i fosfo-mTOR w modelu mechanicznie uszkodzonych komórek stymulowanych PEPD wykazano przy użyciu metody immunofluorescencyjnej (Rycina 11D).



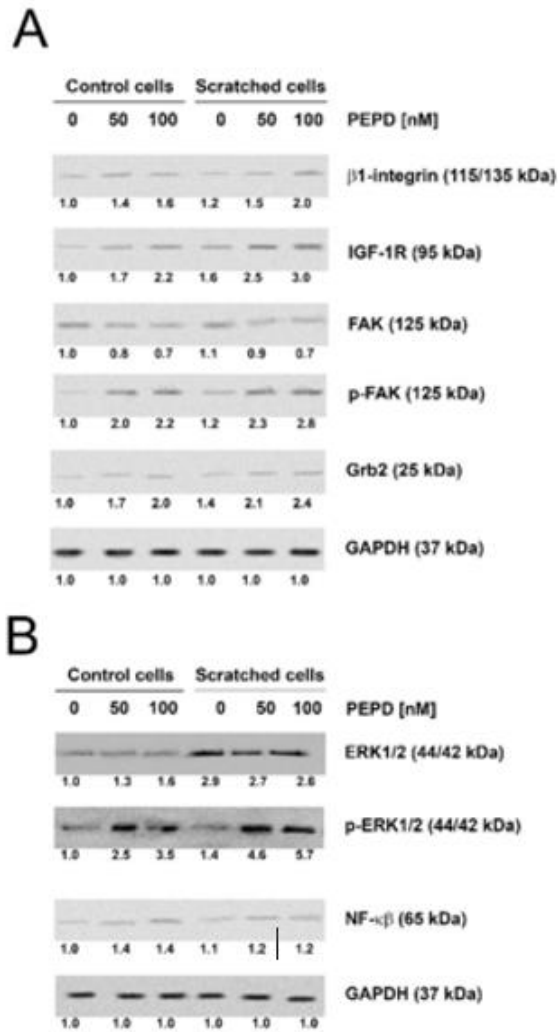
**Rycina 11.** PEPD-zależna indukcja ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). (A) Western blot dla EGFR-zależnych białek szlaku sygnałowego komórek kontrolnych i „mechanicznie uszkodzonych” traktowanych PEPD (50, 100 nM) przez 24 godziny lub (B) fibroblastów traktowanych PEPD (50 nM) z inhibitorem EGFR (komórki wstępnie traktowane gefitynibem przez 2 godziny, 45  $\mu$ M) przez 24 godziny. Przedstawiono reprezentatywne obrazy Western blotów (wartości analizy densytometrycznej prążków białkowych pokazano jako stosunek do kontroli; szczegółowa analiza w Suplemencie S1). GAPDH użyto jako białko referencyjne i kontrolę ilościową białka nanoszonego na żel do elektroforezy. (C) Ilustracja szlaku sygnałowego EGFR zależnego od PEPD. Utworzono za pomocą BioRender.com. (D) Przedstawiono reprezentatywne wyniki barwienia immunofluorescencyjnego p-EGFR i p-mTOR w fibroblastach stymulowanych PEPD (50 nM) przez 24 godziny; powiększenie 200 $\times$ .

Dowodem wpływu PEPD na aktywację sygnalizacji EGFR jest wykazanie, że inhibitor funkcji EGFR znosi efekty indukowane przez PEPD. Komórki traktowano wstępnie (2 godziny) znanym inhibitorem EGFR, gefitynibem (stężenie końcowe: 45  $\mu$ M). Zastosowano go w celu przeciwdziałania zależnej od PEPD stymulacji sygnalizacji EGFR. Gefitynib obniżył ekspresję całkowitego białka EGFR i zahamował fosforylację EGFR indukowaną przez PEPD (Rycina 11B). Rycina 11C ilustruje udział PEPD w aktywacji szlaku sygnałowego EGFR w fibroblastach.

### **Wpływ PEPD na ekspresję receptora integrynowego $\beta$ 1, IGF-1R oraz białek sygnałowych zależnych od tych receptorów**

Jak wynika z Ryciny 12A, PEPD pobudza ekspresję receptora integrynowego  $\beta$ 1 i IGF-1R, a także białek zależnych od tych receptorów: p-FAK i Grb2 zarówno w komórkach kontrolnych jak i poddanych mechanicznemu uszkodzeniu. Wiadomo bowiem, że obydwie receptory uczestniczą w aktywacji szlaku sygnałowego Ras/Raf/ERK. Stwierdzono jednak, że stymulujący wpływ PEPD na ekspresję tych białek jest silniejszy w komórkach mechanicznie uszkodzonych niż kontrolnych. Jakkolwiek mechanizm pobudzającego działania PEPD na ekspresję omawianych receptorów i białek przekaźnikowych nie jest znany, zachodzi przypuszczenie, że PEPD za pośrednictwem EGFR wzmacnia sygnał Ras/Raf/ERK poprzez aktywację białka Grb2.

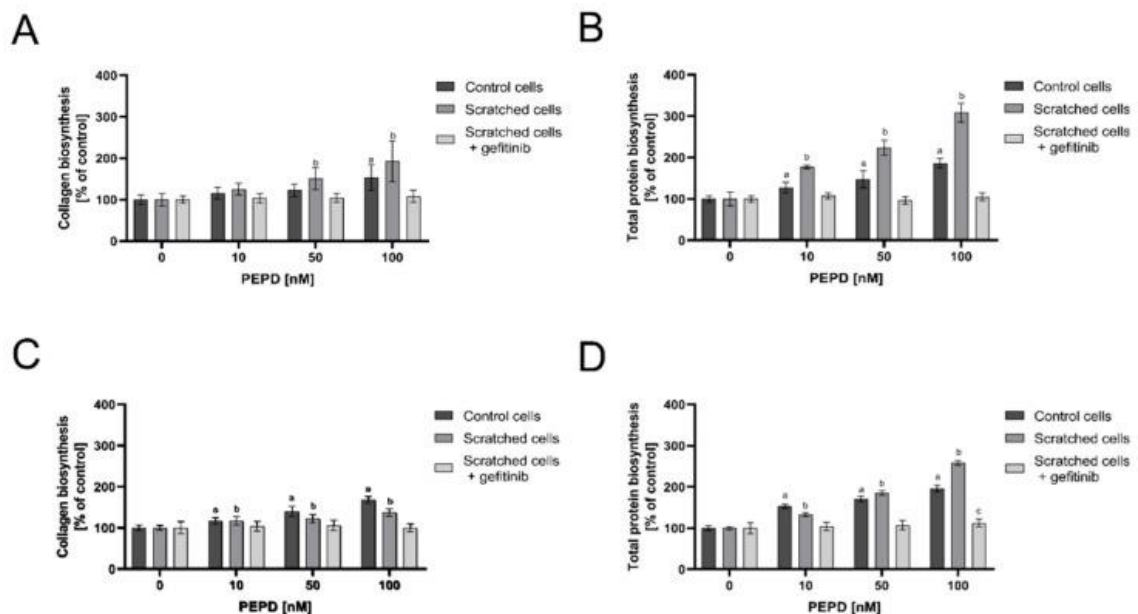
Dowodem pobudzającego działania PEPD na szlak Ras/Raf/ERK jest silna stymulacja przez PEPD ekspresji p-ERK1/2, zarówno w komórkach kontrolnych jak i mechanicznie uszkodzonych. Interesującą obserwacją jest także pobudzające działanie PEPD na ekspresję NF- $\kappa$ B (inhibitora ekspresji genu kolagenu typu I). Korelacja ekspresji p-ERK1/2 oraz NF- $\kappa$ B w obydwu modelach komórkowych wskazuje, że PEPD silniej pobudza ekspresję ERK1/2 w mechanicznie uszkodzonych komórkach niż w kontrolnych podczas gdy ekspresja NF- $\kappa$ B była silniej stymulowana w komórkach kontrolnych niż w mechanicznie uszkodzonych odpowiednikach (Rycina 12B).



**Rycina 12.** Ekspresja receptora integrynowego  $\beta$ 1, IGF-1R i głównych białek sygnałowych tych receptorów, indukowana przez PEPD w fibroblastach kontrolnych i mechanicznie uszkodzonych. (A) Ekspresja receptora integrynowego  $\beta$ 1, IGF-1R oraz białek FAK, Grb2 oraz (B) ekspresja NF- $\kappa$ B i ERK1/2 w fibroblastach traktowanych PEPD (50 i 100 nM) przez 24 godziny. Przedstawiono reprezentatywne obrazy Western blotów. Wartości analizy densytometrycznej prążków białkowych pokazano jako stosunek do kontroli; szczegółowa analiza w Suplemencie S1). GAPDH użyto jako białko referencyjne i kontrolę ilościową białka nanoszonego na żel do elektroforezy.

## Wpływ PEPD na biosyntezę kolagenu w mechanicznie uszkodzonych fibroblastach

Wpływ PEPD na biosyntezę kolagenu i całkowitą biosyntezę białka zmierzono za pomocą testu radiometrycznego w komórkach kontrolnych i mechanicznie uszkodzonych. Komórki traktowano PEPD w stężeniach 10, 50 i 100 nM przez 24 godziny i 48 godzin. Jak pokazano na Rycinie 13A i C, PEPD stymuluje biosyntezę kolagenu zarówno w komórkach kontrolnych, jak i mechanicznie uszkodzonych w sposób zależny od zastosowanych dawek i czasu inkubacji. Stwierdzono podobny wpływ PEPD na całkowitą syntezę białek. Rycina 13B i D pokazuje zależny od dawki i czasu inkubacji stymulujący wpływ PEPD na całkowitą biosyntezę białka w obu modelach komórkowych. Stwierdzono jednak, że stymulujący wpływ PEPD na biosyntezę białek i biosyntezę kolagenu jest silniejszy w komórkach mechanicznie uszkodzonych niż komórkach kontrolnych. Inhibitor EGFR (Gefitynib) zniósł zależną od PEPD stymulację biosyntezy kolagenu (Rycina 13A, C) i całkowitą biosyntezę białek (Rycina 13B, D) w badanych modelach komórkowych. Wyniki tych badań sugerują, że dominująca część białek syntetyzowanych w wyniku działania PEPD jest reprezentowana przez kolagen.



**Rycina 13.** Biosynteza kolagenu (A,C) i całkowita biosynteza białek (B,D) w komórkach mechanicznie uszkodzonych i kontrolnych inkubowanych przez 24 i 48 godzin w obecności różnych stężeń PEPD (10, 50, 100 nM) w obecności i nieobecności



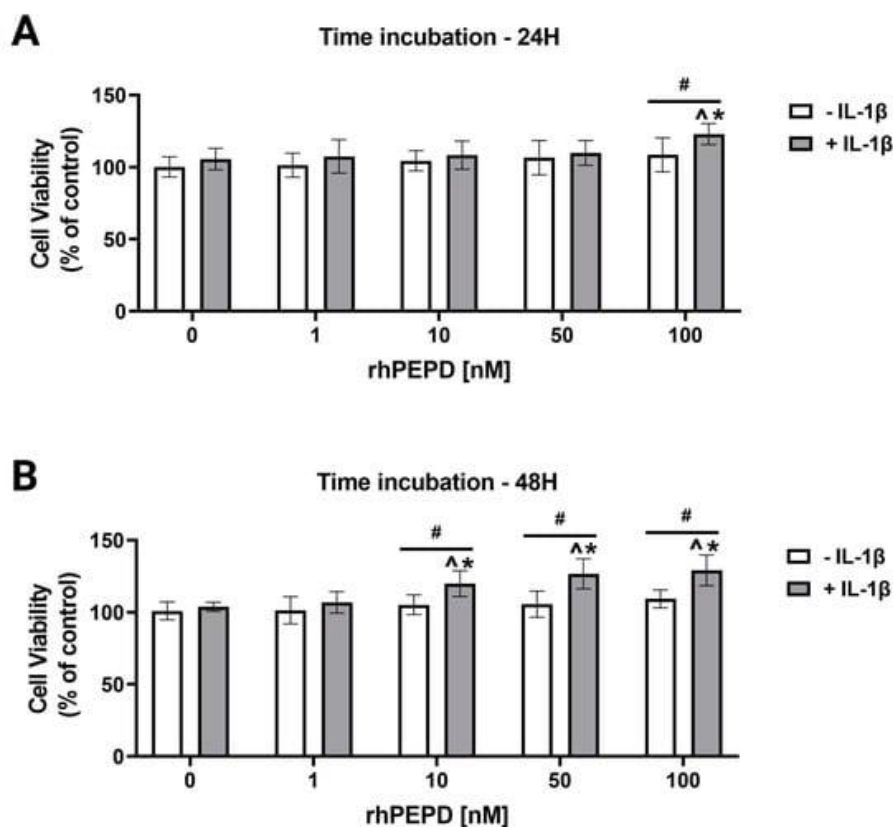
inhibitora EGFR (komórki wstępnie traktowane gefitynibem 45  $\mu$ M przez 2 h). Wartości przedstawiono jako procent komórek kontrolnych (0 nM PEPD). Przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SD z trzech eksperymentów przeprowadzonych w powtórzeniach. Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy a, b, c  $P < 0,05$ ; a wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD) dla komórek kontrolnych, b vs. kontrola (0 nM PEPD) dla komórek mechanicznie uszkodzonych oraz c vs. kontrola (0 nM PEPD) dla komórek mechanicznie uszkodzonych poddanych działaniu gefitynibu.

**Publikacja 2.** „Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts”.

## **6.2. Ocena wpływu rekombinowanej ludzkiej prolidazy (rhPEPD) na procesy regeneracyjne w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$ w fibroblastach skóry ludzkiej.**

### **Wpływ rhPEPD na żywotność fibroblastów**

Wpływ rhPEPD na żywotność komórek zbadano w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  w fibroblastach. Traktowanie komórek prozapalną cytokiną IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) jest powszechnie akceptowanym doświadczalnym modelem zapalenia [90-93]. Żywotność komórek oceniano za pomocą testu MTT. Stwierdzono, że rhPEPD w badanych stężeniach (1,10,50 i 100 nM) nie wpływa na żywotność komórek po 24 i 48 godzin inkubacji (Rycina 14A, B). Jednak w obecności IL-1 $\beta$  przy stężeniu 100 nM rhPEPD nastąpił istotny wzrost żywotności komórek podczas 24 godzin inkubacji (Rycina 14A) oraz przy stężeniach 10, 50 i 100 nM podczas 48 godzin inkubacji (Rycina 14B).

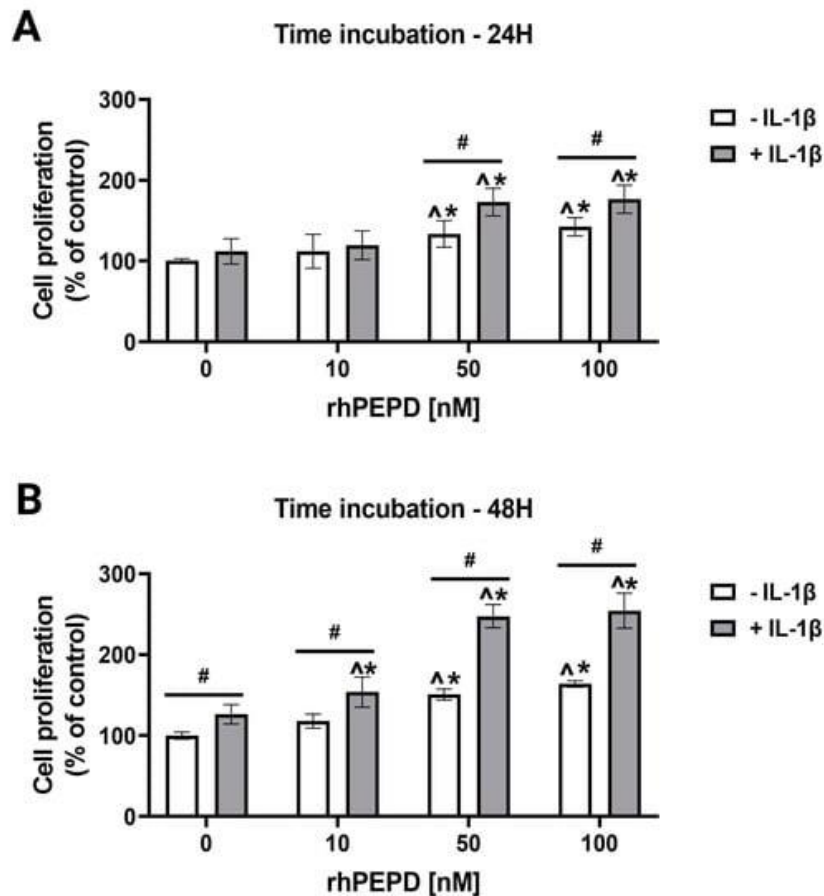


**Rycina 14.** Żywotność komórek poddanych działaniu różnych stężeń rhPEPD w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$  w fibroblastach. Komórki traktowano różnymi stężeniami rhPEPD w nieobecności lub w obecności IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) przez 24 godziny (A) i 48 godzin (B), a następnie przeprowadzono test MTT. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD z trzech eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy  $P < 0,05$ . ^ wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD bez IL-1 $\beta$ ), \* wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD z IL-1 $\beta$ ), # wskazuje istotność między wartościami uzyskanymi w komórkach inkubowanych z IL-1 $\beta$  i bez IL-1 $\beta$ .

### Wpływ rhPEPD na proliferację fibroblastów

Wpływ rhPEPD na proliferację komórek w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  zmierzono spektrofotometrycznie. Fibroblasty traktowano różnymi stężeniami rhPEPD (0, 10, 50, 100 nM) w obecności lub braku IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) przez 24 i 48 godzin. Traktowanie fibroblastów rhPEPD w stężeniach 50 i 100 nM znacząco pobudziło proliferację komórek po inkubacji zarówno 24 godzinnej (Rycina 15A), jak i 48 godzinnej (Rycina 15B) w porównaniu z komórkami

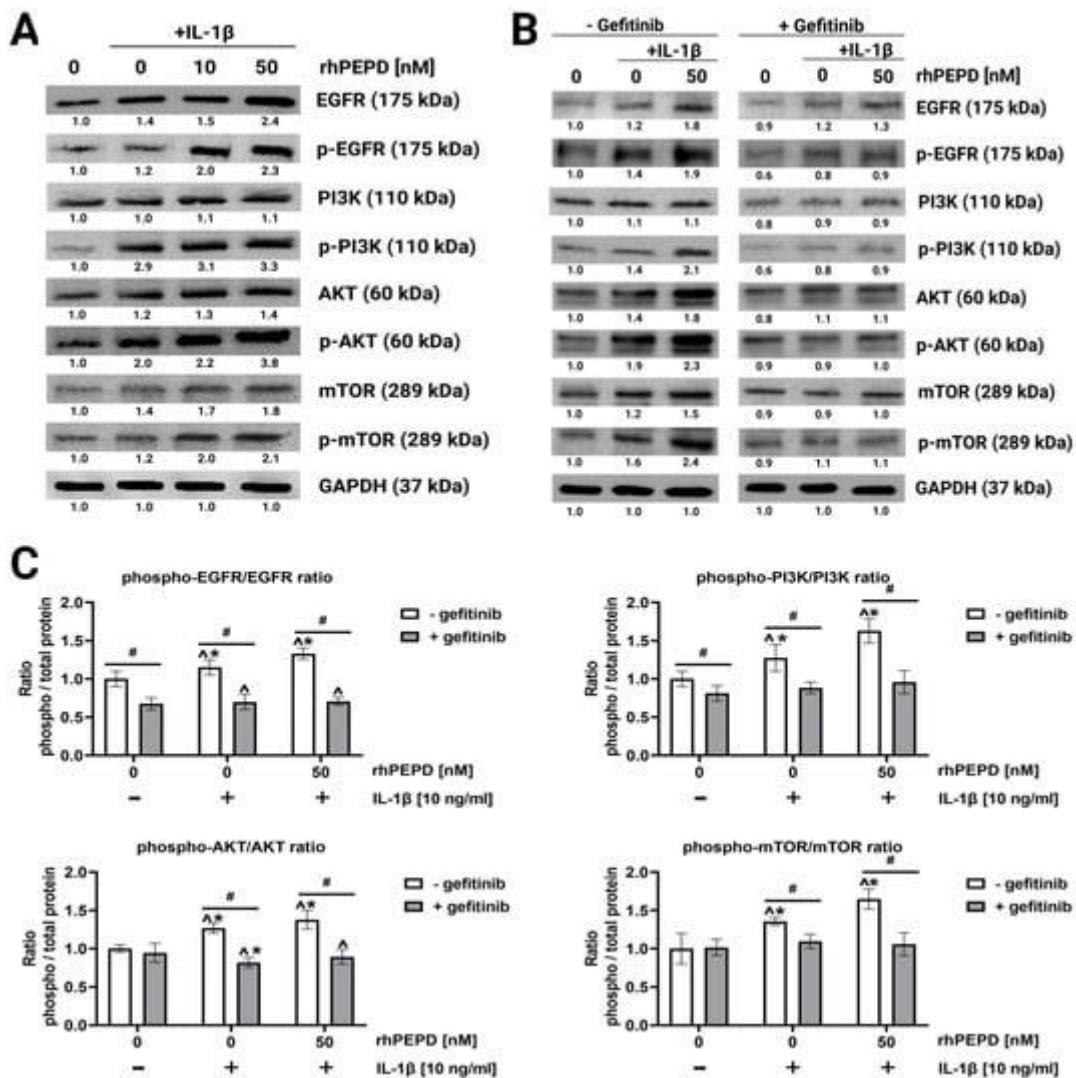
nietraktowanymi rhPEPD. W obecności IL-1 $\beta$ , pod wpływem rhPEPD nastąpiło istotne nasilenie proliferacji fibroblastów względem komórek kontrolnych w sposób zależny od stężenia i czasu inkubacji (Rycina 15A i B).



**Rycina 15.** Proliferacja fibroblastów pod wpływem rhPEPD w modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$ . Komórki traktowano różnymi stężeniami rhPEPD w nieobecności lub w obecności IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) przez 24 godziny (A) i 48 godzin (B). Proliferację oceniano za pomocą testu CyQuant Proliferation. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD z trzech eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Za istotne statystycznie przyjęto wartości przy  $P < 0,05$ ; ^ wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD bez IL-1 $\beta$ ), \* wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD z IL-1 $\beta$ ), a # wskazuje istotność między wartościami uzyskanymi w komórkach inkubowanych z IL-1 $\beta$  i bez IL-1 $\beta$ .

## Wpływ rhPEPD na szlak sygnałowy zależny od EGFR

Wpływ rhPEPD na szlak sygnałowy receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) zbadano w eksperymentalnym modelu zapalenia w fibroblastach (komórki traktowane IL-1 $\beta$ ). Aktywacja białek szlaku sygnałowego zachodzi poprzez fosforylację niektórych reszt aminokwasowych [94]. Szlak sygnałowy EGFR obejmuje między innymi aktywację takich białek jak: PI3K, AKT i mTOR. Stwierdzono, że rhPEPD (10 i 50 nM) w obecności IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) zwiększyła ekspresję wszystkich badanych białek sygnałowych zależnych od EGFR, zarówno form całkowitych jak i fosforylowanych. (Rycina 16A).



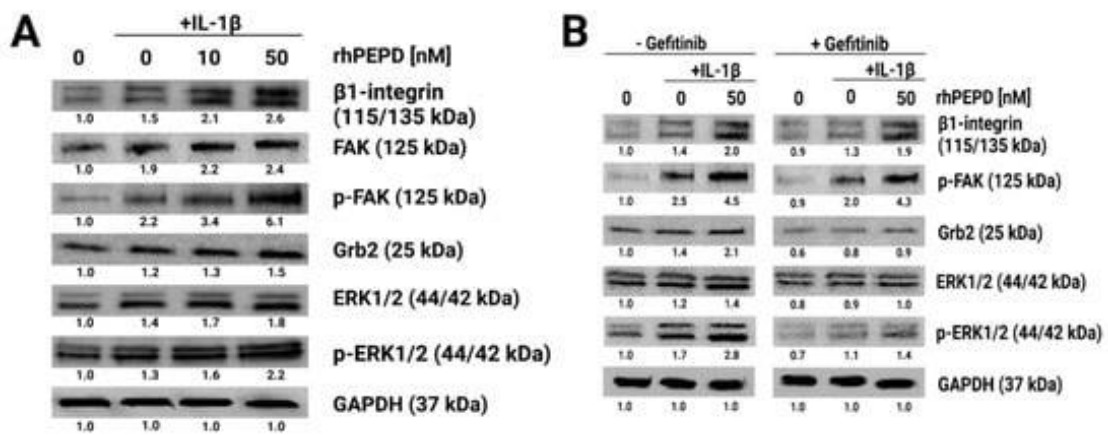
**Rycina 16.** Ekspresja białek szlaku sygnałowego zależnego od EGFR w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$  w fibroblastach inkubowanych z różnymi stężeniami rhPEPD. (A) Western blot dla białek szlaku

sygnałowego EGFR w fibroblastach traktowanych rhPEPD (10, 50 nM) w obecności lub braku IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) przez 24 godziny. Analizę białek fosforylowanych przeprowadzono po 40 minutach taktowania komórek rhPEPD. (B) Western blot dla białek szlaku sygnałowego EGFR w fibroblastach traktowanych rhPEPD (50 nM) wstępnie traktowanych inhibitorem EGFR (Gefitynib, 45  $\mu$ M przez 2 h) i hodowanych przez 24 godziny lub 40 min (dla form fosforylowanych) w obecności lub braku IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). GAPDH użyto jako białko referencyjne i kontrolę ilościową białka nanoszonego na żel do elektroforezy. Przedstawiono reprezentatywne obrazy Western blotów (wartości analizy densytometrycznej prążków białkowych pokazano jako stosunek do kontroli; szczegółowa analiza w materiałach uzupełniających S1-S18). (C) Stosunek białek ufosforylowanych/całkowitych w obecności lub braku gefitynibu (45  $\mu$ M). Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy  $\wedge$ , \* i #  $P < 0,05$ ;  $\wedge$  wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD bez gefitynibu i IL-1 $\beta$ ), \* vs. kontrola (0 nM PEPD z gefitynibem i bez IL-1 $\beta$ ) oraz # wskazuje istotność między grupami inkubowanymi w obecności lub braku gefitynibu.

Sygnalizacji EGFR zależna od rhPEPD została potwierdzona w eksperymencie pokazującym, że farmakologiczna blokada EGFR zniosła efekty zależne od rhPEPD (Rycina 16B). Gefitynib (45  $\mu$ M, 2 h), swoisty inhibitor EGFR, zastosowano do zniesienia sygnałów EGFR-zależnych (Rycina 16B). Inhibitor silnie zmniejsza indukowaną przez rhPEPD fosforylację białek: EGFR, PI3K, AKT i mTOR, co wskazuje, że w obecności IL-1 $\beta$  rhPEPD stymuluje procesy anaboliczne za pośrednictwem szlaku sygnałowego EGFR. Stosunek białek ufosforylowanych/całkowitych w obecności lub braku gefitynibu (45  $\mu$ M) (Rycina 16C) sugeruje, że rhPEPD w komórkach traktowanych IL-1 $\beta$  indukuje fosforylację badanych białek sygnałowych przez EGFR.

### **Wpływ rhPEPD na sygnalizację receptora integrynowego $\beta$ 1**

Fibroblasty traktowane rhPEPD i IL-1 $\beta$  wykazywały wzrost ekspresji receptora integrynowego  $\beta$ 1. Towarzyszyła temu aktywacja FAK, co skutkowało wzrostem ekspresji p-FAK, jak również dalszych białek, takich jak Grb2, Ras/Raf/ERK1/2 i p-ERK1/2 (Rycina 17A). W komórkach traktowanych gefitynibem, rhPEPD w obecności IL-1 $\beta$  nadal indukowała ekspresję integryny  $\beta$ 1 i p-FAK, jednakże hamowała ekspresję Grb2, ERK1/2 i p-ERK1/2 (Rycina 17B).

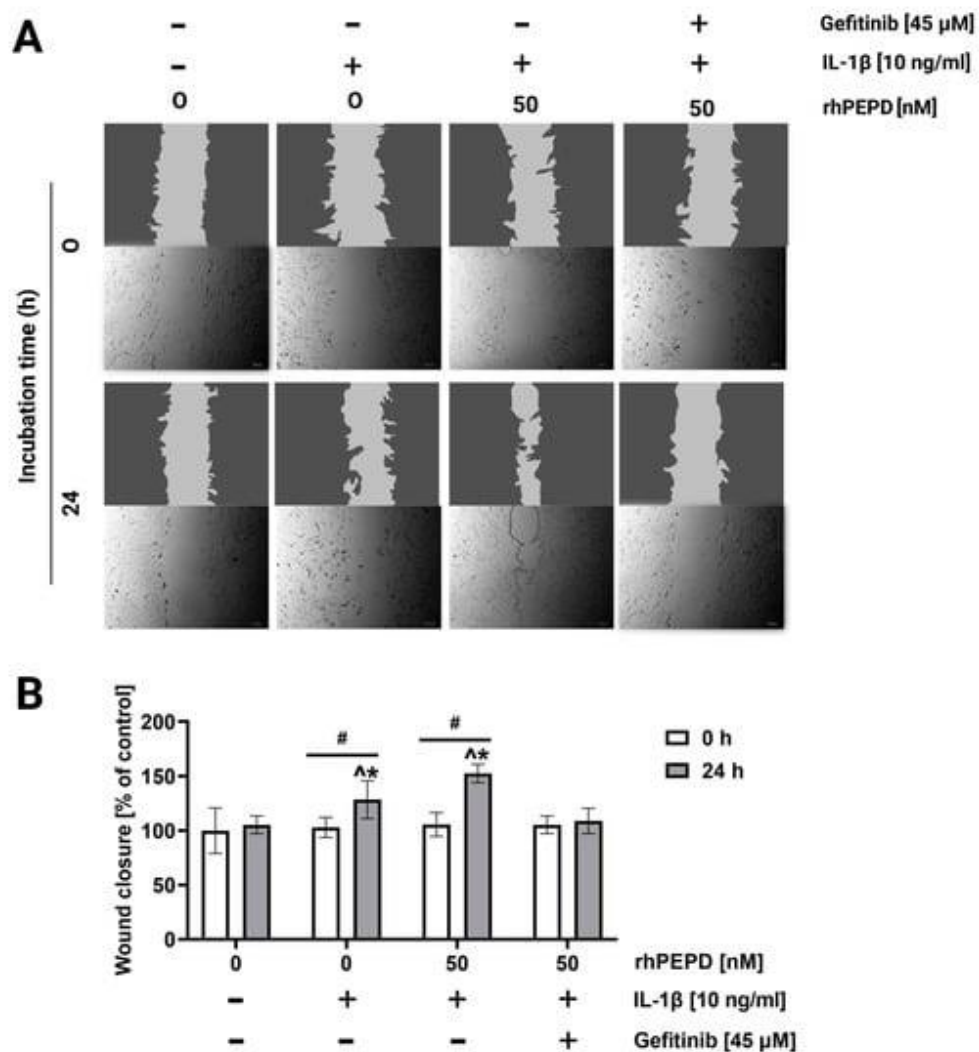


**Rycina 17.** Ekspresja receptora integrynowego  $\beta 1$  i białek sygnałowych pod wpływem rhPEPD w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  w fibroblastach. (A) Western blot dla białek szlaku sygnałowego receptora integrynowego  $\beta 1$ : FAK, Grb2 i ERK1/2 w fibroblastach inkubowanych z rhPEPD (10 i 50 nM) w obecności lub braku IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) przez 24 godziny. Analizę białek fosforylowanych przeprowadzono po 40 minutach taktowania komórek rhPEPD. (B) Western blot dla białek szlaku sygnałowego receptora integrynowego  $\beta 1$  w fibroblastach traktowanych rhPEPD (50 nM) wstępnie traktowanych inhibitorem EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M przez 2 h) hodowanych przez 24 godziny lub 40 min (dla form fosforylowanych) w obecności lub braku IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). GAPDH użyto jako białko referencyjne i kontrolę ilościową białka nanoszonego na żel do elektroforezy. Przedstawiono reprezentatywne obrazy Western blotów (wartości analizy densytometrycznej prążków białkowych pokazano jako stosunek do kontroli; szczegółowa analiza w materiałach uzupełniających S19-S29)

### Wpływ rhPEPD na migracje fibroblastów i aktywność MMP-2 i MMP-9

Podczas gojenia rany in vivo fibroblasty proliferują i migrują, zamykając ranę [6]. W celu oceny migracji fibroblastów w obecności rhPEPD, IL-1 $\beta$  i gefitynibu zastosowano test gojenia ran in vitro. Jak pokazano na Rycinie 18A i B, migracja komórek wzrasta po traktowaniu IL-1 $\beta$ ; jednak rhPEPD znacząco wzmacnia ten proces. Efektowi temu towarzyszy wzrost aktywności metaloproteiny-2 (MMP-2) i metaloproteiny-9 (MMP-9) w pożywkach hodowlanych, co zmierzono za pomocą zymografii. rhPEPD w obecności IL-1 $\beta$  indukuje aktywność MMP-2 i MMP-9 (Rycina

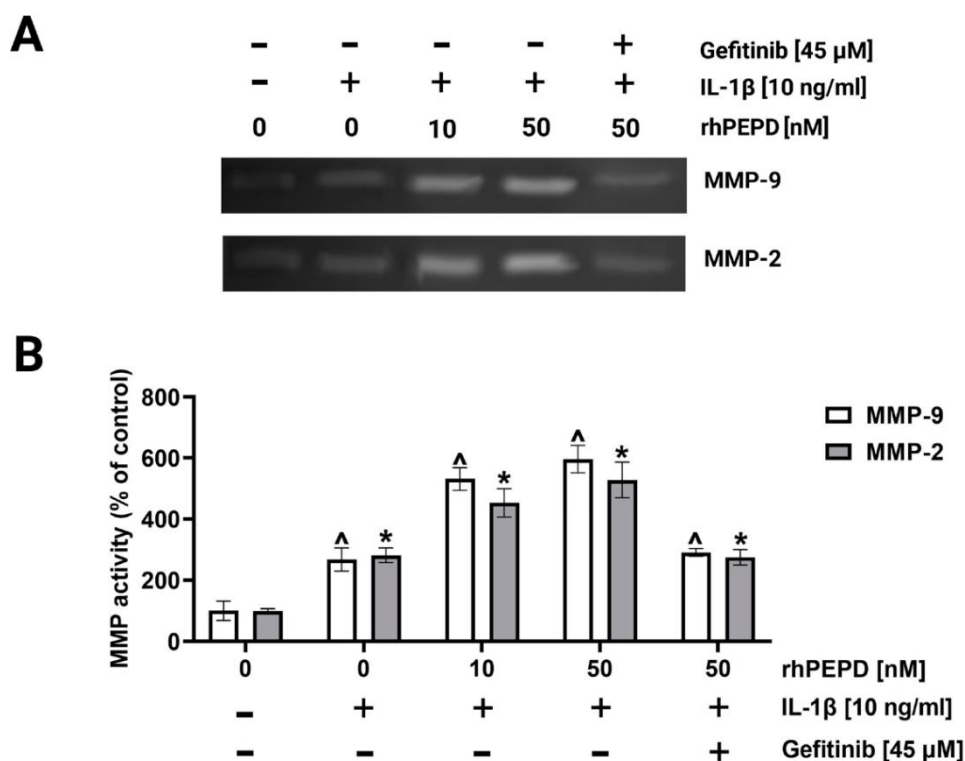
19A, B). Stwierdzono, że fibroblasty traktowane inhibitorem EGFR, a następnie inkubowane z rhPEPD (50 nM) zmniejszają zdolność do migracji (Rycina 18A, B) i ekspresji aktywności MMP (Rycina 19A, B).



**Rycina 18.** Migracja komórek pod wpływem rhPEPD w eksperymentalnym modelu mechanicznego uszkodzenia i zapalenia indukowanego IL-1β w fibroblastach. (A) Fibroblasty uszkodzone mechanicznie inkubowano z rhPEPD, IL-1β lub gefitynibem i migrację komórek monitorowano za pomocą mikroskopu po 0 i 24 godzinach. (B) Efektywność zamykania uszkodzonego obszaru fibroblastów oceniano za pomocą oprogramowania ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) w porównaniu z kontrolą (0 nM rhPEPD bez IL-1β). Przedstawiono średnie wartości ± SD wyników z trzech eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy ^, \* i # P<0,05; ^ wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD bez IL-1β i gefitynibu w komórkach przy 0 godzinnej inkubacji), \* vs. kontrola (0 nM PEPD



bez IL-1 $\beta$  i gefitynibu w komórkach przy 24 godzinnej inkubacji) oraz # wskazuje istotność między grupami inkubowanymi odpowiednio przez 0 i 24 godziny.

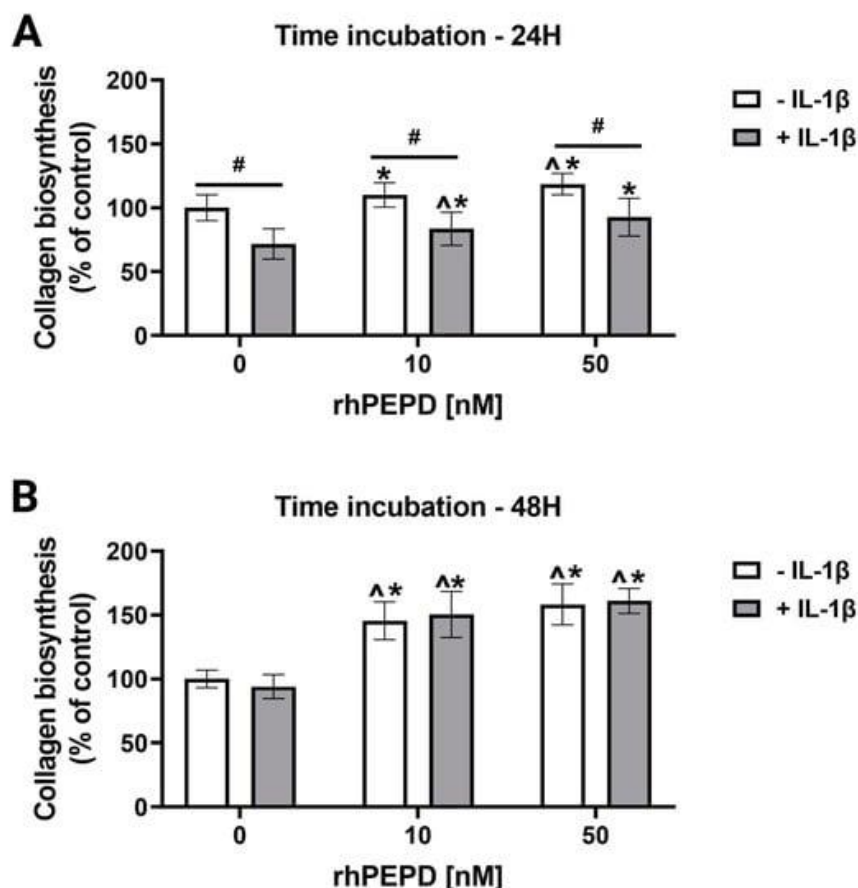


**Rycina 19.** Aktywność MMP-2 i MMP-9 w pożywkach hodowlanych fibroblastów traktowanych różnymi stężeniami rhPEPD (10, 50 nM), IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) i gefitynibem (45  $\mu$ M) przez 24 godziny (A) i odpowiednia analiza densytometryczna (B). Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD z trzech eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy ^, \* P<0,05; ^ wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD bez IL-1 $\beta$  dla MMP-9), a \* wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD bez IL-1 $\beta$  dla MMP-2).

### Wpływ rhPEPD na biosyntezę kolagenu w fibroblastach

Test wbudowywania radioaktywnej proliny (5-[ $^3$ H]-proliny) do kolagenu zastosowano do oceny wpływu rhPEPD (10 i 50 nM) na biosyntezę kolagenu w obecności lub braku IL-1 $\beta$ . Traktowanie fibroblastów rhPEPD w stężeniach 10 i 50 nM znacząco nasila biosyntezę kolagenu zarówno po 24 godzinach (Rycina 20A), jak i 48 godzinach inkubacji (Rycina 20B). Traktowanie fibroblastów IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) przez 24 godziny powoduje znaczące obniżenie biosyntezy kolagenu w stosunku do komórek kontrolnych, inkubowanych bez IL-1 $\beta$ . Efektu tego nie

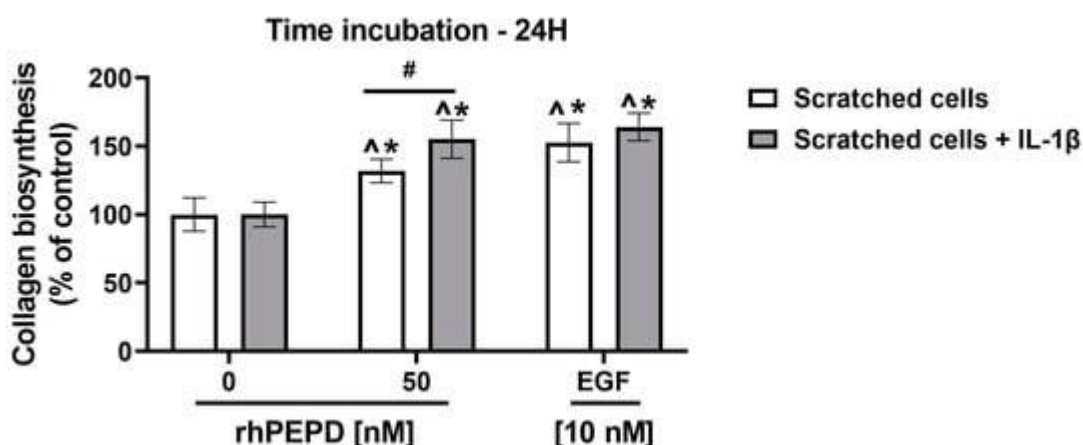
zaobserwowano w komórkach traktowanych IL-1 $\beta$  przez 48 godzin. Obecność rhPEPD częściowo przeciwdziałała zależnemu od IL-1 $\beta$  hamowaniu biosyntezy kolagenu po 24 godzinach inkubacji i nasiliła ten proces po 48 godzinach inkubacji w sposób zależny od dawki (Rycina 20A, B).



**Rycina 20.** Biosynteza kolagenu (mierzona przez ocenę wbudowywania 5-[ $^3$ H]-proliny do białek degradowanych przez kolagenazę bakteryjną) w fibroblastach traktowanych rhPEPD w obecności lub nieobecności IL-1 $\beta$ . Biosyntezę kolagenu mierzone w fibroblastach traktowanych rhPEPD (10, 50 nM) przez 24 (A) i 48 godzin (B). Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD z trzech eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy ^, \* i #  $P < 0,05$ ; ^ wskazuje istotność vs kontrola (0 nM PEPD bez IL-1 $\beta$ ), \* oznacza istotność vs. kontrola (0 nM PEPD z IL-1 $\beta$ ), a # wskazuje istotność między komórkami inkubowanymi w obecności lub bez obecności IL-1 $\beta$  w podłożu hodowlanym.

## Wpływ rhPEPD na biosyntezę kolagenu w fibroblastach traktowanych IL-1 $\beta$ w modelu gojenia ran

Ocenę stopnia wbudowywania 5-[<sup>3</sup>H]-proliny do kolagenu przeprowadzono w celu porównania wpływu rhPEPD i naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) na biosyntezę kolagenu w eksperymentalnym modelu gojenia rany (komórek uszkodzonych mechanicznie) w obecności lub braku IL-1 $\beta$  (Rycina 21). Komórki traktowano rhPEPD (50 nM) i EGF (10 nM) przez 24 godziny. Ponieważ EGFR jest aktywowany głównie przez EGF [8,95,96], zastosowano ten czynnik wzrostowy jako kontrolę pozytywną. Jak pokazano na Rycinie 21, rhPEPD stymuluje biosyntezę kolagenu, jednakże wykazuje mniejszą aktywność w tym względzie niż EGF. Ponadto w obecności IL-1 $\beta$  efekt działania rhPEPD na biosyntezę kolagenu w komórkach uszkodzonych mechanicznie został wzmocniony.



**Rycina 21.** Wpływ rhPEPD (50nM) i EGF (10 nM) na biosyntezę kolagenu w modelu gojenia ran, uszkodzonych mechanicznie fibroblastów (A) i uszkodzonych mechanicznie fibroblastów traktowanych IL-1 $\beta$  (B) przez 24 godziny. Przedstawiono średnie wartości  $\pm$  SD wyników z trzech eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach. Istotność statystyczną obliczono względem kontroli (0 nM rhPEPD bez IL-1 $\beta$ ). Za istotne statystyczne przyjęto wartości przy ^, \* i #  $P < 0,05$ ; ^ wskazuje istotność vs. Kontrola (0 nM PEPD, uszkodzonych komórek), \* wskazuje istotność vs. kontrola (0 nM PEPD, porysowane komórki + IL-1  $\beta$ ), a # wskazuje istotność między uszkodzonymi komórkami i uszkodzonymi komórkami + IL-1 $\beta$ .

## Rozdział 7. Podsumowanie i dyskusja

Upośledzone gojenie ran jest częstą dolegliwością towarzyszącą wielu chorobom metabolicznym, zarówno o przebiegu ostrym jak i przewlekłym [97]. Częstym przypadkiem zaburzonego gojenia ran jest utrzymujący się przewlekły stan zapalny dotkniętego urazem narządu. Z tego względu zrozumienie złożonych mechanizmów regulacji procesu naprawczego uszkodzonych tkanek w przebiegu zapalenia stanowi wyzwanie dla nauk medycznych i farmaceutycznych w poszukiwaniu nowych sposobów wspomagania fizjologicznego procesu regeneracji tkanek.

Uwagę moją zwróciła prolidaza (PEPD), enzym którego charakterystykę zamieściłam we „Wstępie” pracy. Podłożem zainteresowania prolidazą w kontekście poszukiwania czynników pobudzających proces gojenia ran było wykrycie zewnątrzkomórkowej funkcji prolidazy jako liganda EGFR [21]. Wiadomo bowiem, że sygnalizacja EGFR bierze udział w regulacji wzrostu, proliferacji i migracji komórek [98]. Postawiłam zatem hipotezę, że PEPD może stanowić czynnik stymulujący gojenie ran. Przeprowadziłam szereg badań *in vitro* mających na celu ocenę wpływu pozakomórkowego podania PEPD na procesy naprawcze w eksperymentalnym modelu mechanicznie uszkodzonych fibroblastów i modelu zapalenia indukowanego interleukiną-1 $\beta$ .

Wstęp zawarty w niniejszej rozprawie obejmuje aktualną wiedzę na temat regulacyjnej funkcji PEPD w metabolizmie komórkowym zależnym i niezależnym od jej właściwości katalitycznych. Wewnątrzkomórkowa aktywność katalityczna PEPD przyczynia się do regulacji dostępności proliny niezbędnej do syntezy kolagenu, a także mitochondrialnego enzymu, dehydrogenazy prolinowej/oksydazy prolinowej (PRODH/POX) generującego w tzw. cyklu prolinowym ATP lub RFT. Te funkcje prolidazy (synteza kolagenu, produkcja energii) mogą odgrywać ważną rolę w procesie gojenia ran. Opisano kilka mechanizmów pobudzania wewnątrzkomórkowej aktywności PEPD poprzez aktywację receptora integrynowego  $\beta$ 1, receptora IGF-1 [99] i receptora TGF- $\beta$ 1 [67]. PEPD natomiast oprócz udziału w regulacji syntezy kolagenu i funkcji PRODH/POX- zależnych inaktywuje p53 [26,87] i wpływa na dojrzewanie receptora interferonu- $\alpha/\beta$  [27]. Szczególnie interesująca jest jednak zewnątrzkomórkowa funkcja PEPD jako liganda EGFR [21] i receptora naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) [22]. Odkrycie zewnątrzkomórkowej funkcji PEPD jako induktora szlaku sygnałowego EGFR zapoczątkowało nowy obszar badań na jej rolę w regulacji proliferacji,

różnicowania i różnych procesów metabolicznych komórki prawidłowej i nowotworowej.

Przedmiotem moich badań była ocena wpływu zewnątrzkomórkowej PEPD otrzymanej z nerek świni na wzrost, proliferację i migrację fibroblastów w eksperymentalnym modelu gojenia ran. Wykazałam, że PEPD indukuje proliferację fibroblastów w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. Oryginalnym odkryciem było wykazanie szczególnego nasilenia PEPD-zależnej proliferacji w komórkach mechanicznie uszkodzonych, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zjawisku temu towarzyszyło pobudzenie migracji fibroblastów w eksperymentalnym modelu gojenia rany. Wykazałam, że mechanizm tego procesu związany jest z sygnalizacją EGFR. Nastęstwem aktywacji EGFR jest pobudzenie 3 szlaków sygnałowych: PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/ERK i JAK/STAT [21,81,100]. Przedstawiłam, że pozakomórkowa PEPD aktywowała białka szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR. Dowodem pobudzającego działania PEPD na szlak sygnałowy EGFR był eksperyment z zastosowaniem gefitinibu, inhibitora EGFR. Wykazałam, że gefitinib zahamował pobudzające działanie PEPD na szlak sygnałowy EGFR poprzez obniżenie stopnia fosforylacji białek PI3K, Akt i mTOR, a także ich całkowitych form. Funkcjonalne znaczenie tego procesu przedstawiłam w teście gojenia ran pozwalającym ocenić szybkość migracji fibroblastów. Wyniki tego eksperymentu wskazują, że PEPD-zależne pobudzenie migracji fibroblastów w modelu mechanicznie uszkodzonych komórek jest zniesione przez gefitynib, co potwierdza obserwację, że aktywacja EGFR przez PEPD jest kluczowym czynnikiem pobudzającym migrację fibroblastów. Dane te są poparte badaniami Lee i wsp. [101] wykazujące, że blokada szlaku PI3K/Akt/mTOR hamuje proliferację i migrację komórek.

Do osiągnięcia pełnej odpowiedzi biologicznej w procesie regeneracji tkanek konieczna jest komunikacja (cross-talk) między czynnikami wzrostowymi i receptorami adhezyjnymi. W omawianym przypadku oceniłam komunikację pomiędzy EGFR a receptorem integrynowym  $\beta 1$ . Wiadomo bowiem, że aktywność PEPD regulowana jest poprzez receptor integrynowy  $\beta 1$  i receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R). „Cross-talk” pomiędzy tymi receptorami ma ogromne znaczenie w gojeniu ran, ponieważ indukują one sygnał pobudzający biosyntezę kolagenu [56,59]. Proces ten ma kluczowe znaczenie w ostatnim etapie gojenia ran i powstawaniu blizn [50]. Wykazałam, że fibroblasty stymulowane PEPD pobudzają biosyntezę kolagenu za pośrednictwem szlaku sygnałowego generowanego przez pobudzone receptory integryny  $\beta 1$  i IGF-1R.

Indukują one kaskadę szlaku sygnałowego z udziałem białek FAK, Grb2 i kinaz ERK1/ERK2. Wiadomo, że ta kaskada sygnalizacyjna stymuluje biosyntezę różnych składników ECM, zwłaszcza kolagenu [56,59]. Interesującym odkryciem jest wykazanie obniżenia ekspresji NF- $\kappa$ B pod wpływem PEPD w fibroblastach. Ponieważ NF- $\kappa$ B jest znanym inhibitorem ekspresji genów podjednostek  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 kolagenu typu I [102-104], obniżenie ekspresji NF- $\kappa$ B ułatwia biosyntezę kolagenu. Zjawisko to zostało potwierdzone w wielu innych badaniach [102-104]. Ponadto stwierdzono, że w badanym modelu doświadczalnym biosynteza kolagenu jest stymulowana przez sygnalizację EGFR. Dowodzi tego eksperyment z zastosowaniem gefitynibu. Stymulujący wpływ EGF na biosyntezę kolagenu został wykazany przez innych autorów [105-107].

Procesowi uszkodzenia mechanicznego tkanki towarzyszy stan zapalny. W komórkach poddanych takiemu uszkodzeniu zaobserwowałam, że PEPD nasila proliferację i migrację fibroblastów w stosunku do komórek kontrolnych. Postawiłam pytanie, czy mediatory stanu zapalnego przyczyniają się do wzrostu proliferacji i migracji fibroblastów. Dlatego przeprowadziłam dalsze badania w celu oceny biologicznych skutków działania rekombinowanej ludzkiej prolidazy (rhPEPD) na fibroblasty w modelu zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$ .

Zaobserwowałam, że PEPD w obecności IL-1 $\beta$  silnie stymuluje proliferację i migrację fibroblastów w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. Powszechnie wiadomo, że prawidłowy przebieg gojenia ran wymaga fazy zapalnej. Wyniki moich badań mogą zatem sugerować występowanie zjawiska komunikacji pomiędzy PEPD i IL-1 $\beta$  w procesach naprawczych. Nie jest wykluczone, że sama PEPD indukuje stan zapalny bowiem zjawisko takie opisano w makrofagach i prekursorach tkanki tłuszczowej, przyczyniając się do aktywacji komórek i produkcji białek macierzy pozakomórkowej [108]. Ponadto stwierdzono, że PEPD wiąże i inaktywuje p53, co sugeruje kolejny potencjalny mechanizm promowania żywotności i proliferacji komórek przez PEPD [109]. Badania innych zespołów dowodzą, że podczas fazy zapalnej w uszkodzonej skórze wzrasta ekspresja EGFR i IL-1 $\beta$  [110,111].

Ważnym odkryciem w moich badaniach było wykazanie, że PEPD aktywuje sygnalizację EGFR w modelu zapalnym (indukowanym przez IL-1 $\beta$ ) poprzez aktywację całkowitych i ufosforylowanych form białek PI3K/AKT/mTOR, które biorą udział w migracji i proliferacji fibroblastów podczas gojenia ran. Zahamowanie zależnej od PEPD aktywacji EGFR przez gefitynib doprowadziło do obniżenia ekspresji obu form

EGFR i białek od niego zależnych, co potwierdza zależną od PEPD aktywację tego receptora.

Kolejnym odkryciem jest wykazanie, że rhPEPD i IL-1 $\beta$  aktywują receptor integrynowy  $\beta$ 1, na co wskazuje wzrost ekspresji receptora integrynowego  $\beta$ 1 i białek sygnałowych indukowanych przez ten receptor, takich jak p-FAK, Grb2 i ERK1/2. Interesującym spostrzeżeniem jest fakt, że gefitynib nie przeciwdziałał zależnemu od PEPD wzrostowi ekspresji receptora  $\beta$ 1-integryny i p-FAK, obniżał jednak ekspresję Grb2 i ERK1/2. Sugeruje to, że aktywacja szlaku integrynowego  $\beta$ 1 przez PEPD jest niezależna od EGFR, choć ostatnie doniesienie dostarczyło dowodów na kluczową rolę EGFR w regulacji funkcji receptorów integrynowych, sugerując komunikację EGFR/integryna  $\beta$ 1 [112].

Poprzednie badania naszego zespołu naukowego wykazały, że kaskada sygnałowa receptora integrynowego  $\beta$ 1 pobudza biosyntezę kolagenu [50,56,59]. Dane te zostały również potwierdzone przez innych autorów [113-115]. Głównymi komórkami syntetyzującymi kolagen są fibroblasty. Uczestniczą one w rozwoju i utrzymaniu prawidłowej budowy wszystkich narządów poprzez syntezę niezbędnych składników macierzy pozakomórkowej (ECM), zwłaszcza glikozaminoglikanów (GAG) i proteoglikanów [8]. Podczas procesu gojenia ran fibroblasty migrują do miejsc zapalnych, gdzie proliferują i wytwarzają składniki ECM.

Faza zapalna procesu gojenia ran jest niezbędnym etapem prawidłowego gojenia rany. Wiadomo jednak, że stany zapalne prowadzą do utraty wielu GAG i białek ECM, w tym kolagenu [116-118]. Mechanizm tego zjawiska związany jest z deregulacją metabolizmu kolagenu w komórkach odpowiedzialnych za syntezę kolagenu, zwłaszcza w chondrocytach i fibroblastach pod wpływem czynników zapalnych, np. interleukin. Traktowanie komórek IL-1 $\beta$  jest szeroko akceptowanym eksperymentalnym modelem zapalenia [90-93], którego efektem jest zmniejszenie produkcji kolagenu [113] i proteoglikanów [114-115]. Wyniki moich badań potwierdzają, że IL-1 $\beta$  hamuje biosyntezę kolagenu. Jednak w obecność rhPEPD lub EGF nie tylko znosi działanie hamujące IL-1 $\beta$  na biosyntezę kolagenu, ale stymuluje ten proces w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. Stymulujący wpływ EGF na biosyntezę kolagenu potwierdzono w wielu badaniach [105-107]. Wyniki moich badań pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że w przebiegu eksperymentalnego zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$ , zależna od PEPD aktywacja szlaku sygnałowego EGFR prowadzi do pobudzenia biosyntezy kolagenu. Interesującym odkryciem uzupełniającym mechanizm działania

rhPEPD w warunkach zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$ , jest wykazanie wzrostu aktywności MMP-2 i MMP-9, co sugeruje zwiększoną zdolność fibroblastów do degradacji składników ECM, umożliwiając tym samym proces migracji komórek do zranionego miejsca. Potwierdzają to badania innych autorów wskazujących, że aktywacja MMP jest niezbędna w fazie zapalnej gojenia rany [119]. Faktycznie, w eksperymentalnym modelu gojenia ran i stanu zapalnego wykazaliśmy, że PEPD stymuluje migrację fibroblastów.

Obserwacje z przeprowadzonych badań nasuwają pytanie dlaczego w warunkach mechanicznego uszkodzenia i zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$  wielokierunkowe działanie PEPD jest silniejsze niż w komórkach kontrolnych. Czy IL-1 $\beta$  stymuluje uwalnianie PEPD z fibroblastów? Wiadomo, że fibroblasty są zarówno źródłem jak i celem cytokin. Szeroka gama mediatorów stanu zapalnego jest wydzielana przez fibroblasty [120]. Prawdopodobnie w warunkach mechanicznego uszkodzenia ulega przerwaniu ciągłość błony komórkowej przyczyniając się do uwolnienia z fibroblastów do przestrzeni pozakomórkowej różnych mediatorów stanu zapalnego. Możliwe, że komunikacja pomiędzy PEPD i mediatorami zapalenia przyczyniają się do indukcji proliferacji, migracji i biosyntezy kolagenu. Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania nad wpływem PEPD na proces gojenia ran potwierdzają tezę, że PEPD w obecności IL-1 $\beta$  nasila proliferację i migrację fibroblastów. Mechanizm molekularny leżący u podstaw tego zjawiska polega na pobudzeniu przez PEPD szlaku sygnałowego EGFR prowadząc do pobudzenia proliferacji fibroblastów i przebudowy ECM. Nie można również wykluczyć, że IL-1 $\beta$  stymuluje uwalnianie PEPD z fibroblastów, jednakże w celu potwierdzenia tej hipotezy potrzebne są dalsze badania. Do chwili obecnej mechanizm transportu PEPD przez błonę komórkową nie jest znany. Jedynym znanym zjawiskiem wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia PEPD jest przerwanie ciągłości błony komórkowej [21]. W warunkach *in vivo*, potencjalnym źródłem zewnątrzkomórkowej PEPD mogą być płytki krwi [50,121]. Są one niezbędne w początkowej fazie stanu zapalnego, ponieważ przenoszą różne mediatory zapalenia do uszkodzonego miejsca w tkance. Po aktywacji, płytki ulegają degranulacji uwalniając zawartość, między innymi czynniki wzrostu i enzymy, w tym PEPD. Podobną funkcję mogą pełnić uszkodzone inne elementy morfotyczne krwi, np. erytrocyty.

Wartość aplikacyjna przedstawionych wyników ma oczywiste ograniczenia ze względu na wykonanie tych badań *in vitro*, które należy potwierdzić eksperymentami *in vivo*. Chociaż modele komórkowe mają wiele ograniczeń (np. brak możliwości



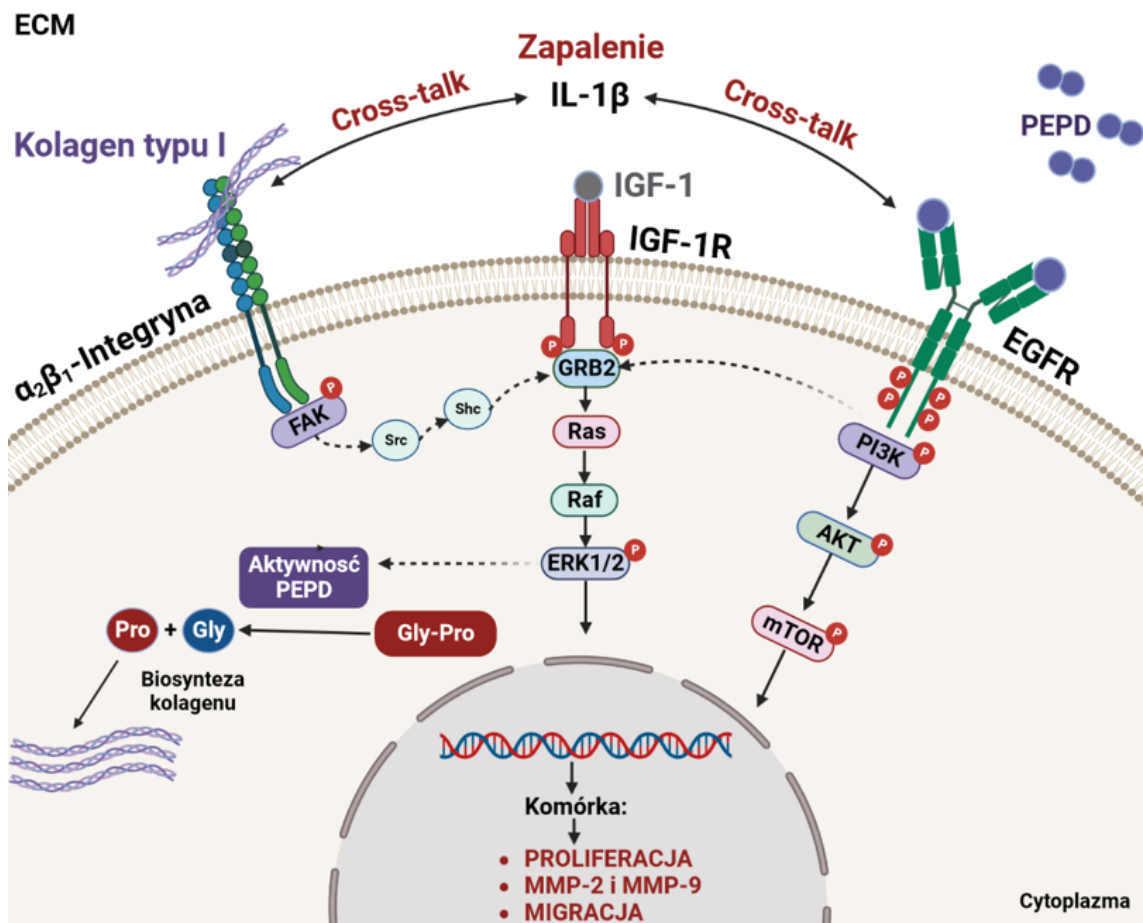
obserwacji zjawisk systemowych), są potężnym narzędziem, które ma równie wiele zalet. Z pewnością modele komórkowe pozwalają na ścisłą kontrolę warunków eksperymentu w celu ustalenia krytycznych czynników wpływających na badane procesy w stosunkowo krótkim czasie. Są one szczególnie pomocne w przypadku ograniczonej dostępności próbek klinicznych lub modeli *in vivo*. Dlatego wyniki na modelach komórkowych pozwalają nam przewidzieć konsekwencje manipulacji farmakoterapeutycznych u ludzi i dostarczają uzasadnienia dla badań klinicznych nad efektami zależnymi od dawki. Różne schematy leczenia i kombinacje terapii zostały przetestowane przy użyciu linii komórkowych, które dały interesujące i potencjalnie obiecujące wyniki, wykazując, że niektóre z nich mogą mieć wartość aplikacyjną. To, czy rhPEPD znajdzie zastosowanie kliniczne, wymaga dalszych badań *in vivo*.

Funkcjonalne znaczenie otrzymanych wyników może zapewnić nowe podejście do terapii zaburzeń gojenia ran i być może terapii niedoboru prolidazy (PD). PD jest rzadkim zaburzeniem dziedziczonym autosomalnie recesywnie, spowodowanym mutacją w genie PEPD. W rezultacie aktywność PEPD zmniejsza się lub całkowicie zanika [121-123]. PD charakteryzuje się podwyższonym poziomem dipeptydów zawierających prolinę we krwi i objawia się zmianami skórnymi, takimi jak rozległe teleangiektazje, postępujące wrzodziejące zapalenie skóry i rumieniowe zmiany [14-20]. Poprzednie badania nad PD koncentrowały się na wewnątrzkomórkowej roli PEPD, ponieważ funkcję zewnątrzkomórkową PEPD opisano zaledwie kilka lat temu. Uzyskane przez nas wyniki pozwalają postawić hipotezę, że obraz kliniczny PD może być związany z brakiem zewnątrzkomórkowej funkcji PEPD, ponieważ suplementacja pacjentów z PD aminokwasami, zwłaszcza proliną i aminokwasami ulegającymi konwersji do proliny była nieskuteczna [124]. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań pokazują, że PEPD znacząco zwiększa zależną od EGFR proliferację i biosyntezę kolagenu w eksperymentalnym modelu gojenia ran i zapalenia w fibroblastach. Wykazanie roli stanu zapalnego w pobudzaniu procesu gojenia ran przez PEPD jest ważnym odkryciem moich badań. Prawdopodobne jest, że w PD faza zapalna nie występuje, co skutkuje zaburzeniem procesu gojenia rany. Taką możliwość sugeruje niedawny raport pokazujący, że PEPD indukuje stan zapalny w makrofagach i konwersje fibroblastów do miofibroblastów indukując zwłóknienie [108]. Należy zbadać, czy mechanizm ten występuje w przypadku PD. Sugeruje to, że zarówno wewnątrzkomórkowa, jak i zewnątrzkomórkowa PEPD może być zaangażowana w mechanizm leżący u podstaw PD.

Moje badania po raz pierwszy przedstawiają dowody, że PEPD aktywuje EGFR-zależny proces gojenia ran poprzez pobudzenie proliferacji i migracji komórek w eksperymentalnym modelu uszkodzonych mechanicznie fibroblastów i modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$ . Wiedza ta może być przydatna w dalszych badaniach nad terapią zaburzeń gojenia ran, zwłaszcza tych wobec których nie opracowano dotychczas skutecznych metod leczenia, jak ma to miejsce w przypadku opisanego PD.

## Rozdział 8. Wnioski

1. Zewnątrzkomórkowa prolidaza zwierzęca (PEPD) jako ligand EGFR stymuluje fibroblasty do proliferacji, migracji i biosyntezy kolagenu, szczególnie w warunkach mechanicznego uszkodzenia komórek.
2. Rekombinowana ludzka prolidaza (rhPEPD) pobudza proliferację, migrację, biosyntezę kolagenu i aktywność MMP-2 i MMP-9 w eksperymentalnym modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$ . Mechanizm tego procesu obejmuje komunikację między EGFR, receptorem integrynowym  $\beta$ 1, IGF-IR i IL-1 $\beta$  (Rycina 22).
3. rhPEPD może stanowić potencjalny środek terapeutyczny przyspieszający proces gojenia ran.



**Rycina 22.** Zewnątrzkomórkowa prolidaza w warunkach eksperymentalnego zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  i mechanicznego uszkodzenia fibroblastów pobudza proliferację, aktywację metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9) uczestniczących w przebudowie ECM, migrację i biosyntezę kolagenu przy udziale szlaków sygnałowych zależnych od EGFR, IGF-IR i receptora integrynowego  $\beta$ 1. Utworzono za pomocą BioRender.com.

## Rozdział 9. Literatura

1. Martinengo, L.; Olsson, M.; Bajpai, R.; et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann. Epidemiol.* **2019**;29:8–15.
2. Kirsner, R.S.; Vivas A.C.; Lower-extremity ulcers: diagnosis and management. *Br. J. Dermatol.* **2015**;173:379–390.
3. Phillips, C.J.; Humphreys, I.; Fletcher, J.; Harding, K.; Chamberlain, G.; Macey, S.; Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. *Int. Wound J.* **2016**;13:1193–1197.
4. Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **2008**, 453, 314–321.
5. Rose, L.F.; Chan, R.K. The Burn Wound Microenvironment. *Adv. Wound Care* **2016**, 5, 106–118.
6. Gonzalez, A.C.; Costa, T.F.; Andrade, Z.A.; Medrado, A.R. Wound healing –A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, 91,614–620.
7. Nguyen, A.T.; Kim, K.Y. Inhibition of Proinflammatory Cytokines in Cutibacterium Acnes-Induced Inflammation 5.in HaCaT Cells by Using Buddleja Davidii Aqueous Extract. *Int. J. Inflamm.* **2020**, 2020, 8063289.
8. Palka, J.; Adelman-Grill, B.C.; Francz, P.I.; Bayreuther, K. Differentiation stage and cell cycle position determine the chemotactic response of fibroblasts. *Folia Histochem. Cytobiol.* **1996**, 34, 121–127.
9. DesJardins-Park, H.E.; Foster, D.S.; Longaker, M.T. Fibroblasts and Wound Healing: An Update. *Regen. Med.* **2018**, 13, 491–495.
10. Yaron, A.; Naider, F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Biochem. Mol. Biol.* **1993**, 28, 31–81.
11. Jackson, S.H.; Dennis, A.W.; Greenberg, M. Iminodipeptiduria: A genetic defect in recycling collagen; a method for determining prolydase in erythrocytes. *Can. Med. Assoc. J.* **1975**, 113, 759, 762–763.
12. Palka, J.A.; Milyk, W.; Karna, E.; Wolczynski, S. Modulation of prolydase activity during in vitro aging of human skin fibroblasts the role of extracellular matrix collagen. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1996**, 21, 207–213.
13. Phang, J.M. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr. Top. Cell Regul.* **1985**, 25, 91–132.

14. Scriver, C.R. Glycyl-Proline in Urine of Humans with Bone Disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1964**, 42, 357–364.
15. Goodman, S.I.; Solomons, C.C.; Muschenheim, F.; McIntyre, C.A.; Miles, B.; O'Brien, D. A syndrome resembling lathyrism associated with iminodipeptiduria. *Am. J. Med.* **1968**, 45, 152–159.
16. Powell, G.F.; Maniscalco, R.M. Bound hydroxyproline excretion following gelatin loading in prolidase deficiency. *Metabolism* **1976**, 25, 503–508.
17. Umemura, S. Studies on a patient with iminodipeptiduria. II. Lack of prolidase activity in blood cells. *Physiol. Chem. Phys.* **1978**, 10, 279–283.
18. Isemura, M.; Hanyu, T.; Gejyo, F.; Nakazawa, R.; Igarashi, R.; Matsuo, S.; Ikeda, K.; Sato, Y. Prolidase deficiency with iminodipeptiduria. A familial case with and without clinical symptoms. *Clin. Chim. Acta* **1979**, 93, 401–407.
19. Freij, B.J.; Levy, H.L.; Dudin, G.; Mutasim, D.; Deeb, M.; Der Kaloustian, V.M. Clinical and biochemical characteristics of prolidase deficiency in siblings. *Am. J. Med. Genet.* **1984**, 19, 561–571.
20. Pierard, G.E.; Cornil, F.; Lapiere, C.M. Pathogenesis of ulcerations in deficiency of prolidase. The role of angiopathy and of deposits of amyloid. *Am. J. Dermatopathol.* **1984**, 6, 491–497.
21. Yang, L.; Li, Y.; Ding, Y.; Choi, K.S.; Kazim, A.L.; Zhang, Y. Prolidase directly binds and activates epidermal growth factor receptor and stimulates downstream signaling. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 2365–2375.
22. Yang, L.; Li, Y.; Zhang, Y. Identification of prolidase as a high affinity ligand of the ErbB2 receptor and its regulation of ErbB2 signaling and cell growth. *Cell Death Dis.* **2014**, 5, e1211.
23. Yang, L.; Li, Y.; Bhattacharya, A.; Zhang, Y. Inhibition of ERBB2-overexpressing Tumors by Recombinant Human Prolidase and Its Enzymatically Inactive Mutant. *EBioMedicine* **2015**, 2, 396–405.
24. Yang, L.; Li, Y.; Bhattacharya, A.; Zhang, Y. Dual inhibition of ErbB1 and ErbB2 in cancer by recombinant human prolidase mutant hPEPD-G278D. *Oncotarget* **2016**, 7, 42340–42352.
25. Yang, L.; Li, Y.; Bhattacharya, A.; Zhang, Y. A recombinant human protein targeting HER2 overcomes drug resistance in HER2-positive breast cancer. *Sci. Transl. Med.* **2019**, 11, eaav1620.

26. Yang, L.; Li, Y.; Bhattacharya, A.; Zhang, Y. PEPD is a pivotal regulator of p53 tumor suppressor. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2052.
27. Lubick, K.J.; Robertson, S.J.; McNally, K.L.; Freedman, B.A.; Rasmussen, A.L.; Taylor, R.T.; Walts, A.D.; Tsuruda, S.; Sakai, M.; Ishizuka, M.; et al. Flavivirus Antagonism of Type I Interferon Signaling Reveals Prolidase as a Regulator of IFNAR1 Surface Expression. *Cell Host Microbe* **2015**, *18*, 61–74.
28. Namiduru, E.S. Prolidase. *Bratisl. Lek. Listy.* **2016**;117:480–485.
29. Hintze, J.P.; Kirby, A.; Torti, E.; Batanian, J.R. Prolidase Deficiency in a Mexican-American Patient Identified by Array CGH Reveals a Novel and the Largest PEPD Gene Deletion. *Mol. Syndromol.* **2016**;7:80–86.
30. Cottin, V.; Nasser, M.; Traalet, J.; Chalabreysse, L.; Lèbre, A. S.; Si-Mohamed, S.; et al. Prolidase Deficiency: A New Genetic Cause of Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema Syndrome in the Adult. *Eur. Respir. J.* **2020**;55, 1901952.
31. Ysrayl, B.B.; Balasubramaniam, M.; Albert, I.; Villalta, F.; Pandhare, J.; Dash, C. A. Novel Role of Prolidase in Cocaine-Mediated Breach in the Barrier of Brain Microvascular Endothelial Cells. *Sci. Rep.* **2019**;9:2567.
32. Spodenkiewicz, M.; Cleary, M.; Massier, M.; Fitsialos, G.; Cottin, V.; Jouret, G.; Poirsier, C.; Doco-Fenzy, M.; Lèbre, A.S. Clinical Genetics of Prolidase Deficiency: An Updated Review. *Biology.* **2020**;9:108.
33. Dunn, R.; Varigos, G.; Winship, I. A Photographic Essay of Prolidase Deficiency. *Clin. Dysmorphol.* **2011**;20, 194–199.
34. Süßmuth, K.; Metze, D.; Muresan, A. M.; Lehmborg, K.; Speckmann, C.; et al. Ulceration in Prolidase Deficiency: Successful Treatment with Anticoagulants. *Acta Derm. Venereol.* **2020**;100, adv00002
35. Nir, V.; Ilivitsky, A.; Hakim, F.; Yoseph, R. B.; Gur, M.; Mandel, H.; et al. Pulmonary Manifestations of Prolidase Deficiency. *Pediatr. Pulmonol.* **2016**;51 (11), 1229–1233.
36. Kenig, A.; Perzon, O.; Tal, Y.; Sviri, S.; Abutbul, A.; Romain, M.; et al. An Adult with Recurrent Severe Pneumococcal Pneumonia Secondary to Prolidase Deficiency. *Isr. Med. Assoc. J.* **2021**;23 (3), 193–195.
37. Reid, K.B. Isolation, by partial pepsin digestion, of the three collagen-like regions present in subcomponent Clq of the first component of human complement. *Biochem. J.* **1976**;155:5–17.

38. Güneş, M.; Bulut, M.; Demir, S.; İbiloğlu, A.O.; Kaya, M.C.; Atlı, A.; Kaplan, İ.; Camkurt, M.A.; Sir, A. Diagnostic performance of increased prolidase activity in schizophrenia. *Neurosci. Lett.* **2016**;613:36–40.
39. Ota, T.; Suzuki, Y.; Nishikawa, T.; Otsuki, T.; Sugiyama, T.; Irie, R.; Wakamatsu, A.; Hayashi, K.; Sato, H.; Nagai, K.; et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat. Genet.* **2004**;36:40–45.
40. Uramatsu, S.; Liu, G.; Yang, Q.; Uramatsu, M.; Chi, H.; Lu, J.; et al. Characterization of Prolidase I and II Purified from Normal Human Erythrocytes: Comparison with Prolidase in Erythrocytes from a Patient with Prolidase Deficiency. *Amino Acids* **2009**;37, 543–551.
41. Ohhashi, T.; Ohno, T.; Arata, J.; Kodama, H. Biochemical Studies on Prolidase in Sera from Control, Patients with Prolidase Deficiency and Their Mother. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1998**;11, 166–173.
42. Oono, T.; Yasutomi, H.; Ohhashi, T.; Kodama, H.; Arata, J. Characterization of Fibroblast-Derived Prolidase. The Presence of Two Forms of Prolidase. *J. Dermatol. Sci.* **1990**;1, 319–323.
43. Cosson, C.; Myara, I.; Miech, G.; Moatti, N.; Lemonnier, A. Only Prolidase I Activity Is Present in Human Plasma. *Int. J. Biochem.* **1992**;24, 427–432.
44. Cunningham, D.F.; O'Connor, B. Proline specific peptidases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**;1343:160–186.
45. Wilk, P.; Uehlein, M.; Kalms, J.; Dobbek, H.; Mueller, U.; Weiss, M.S. Substrate specificity and reaction mechanism of human prolidase. *FEBS J.* **2017**;284: 2870–2885.
46. Lowther, W.T.; Matthews, B.W. Metalloaminopeptidases: Common functional themes in disparate structural surroundings. *Chem. Rev.* **2002**;102:4581–4608.
47. Sabuncu, T.; Boduroglu, O.; Eren, M.A.; Torun, A.N.; Aksoy, N. The Value of Serum Prolidase Activity in Progression of Microalbuminuria in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Lab. Anal.* **2016**;30:557–562.
48. Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Oksvold, P.; Kampf, C.; Djureinovic, D.; Odeberg, J.; Habuka, M.; Tahmasebpour, S.; Danielsson, A.; Edlund, K.; et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell Proteom.* **2014**;13: 397–406.

49. Lupi, A.; Tenni, R.; Rossi, A.; Cetta, G.; Forlino, A. Human prolidase and prolidase deficiency: An overview on the characterization of the enzyme involved in proline recycling and on the effects of its mutations. *Amino Acids*. **2008**;35:739–752.
50. Guszczyn, T.; Surazynski, A.; Zareba, I.; Rysiak, E.; Popko, J.; Palka, J. Differential effect of platelet-rich plasma fractions on  $\beta$ 1-integrin signaling, collagen biosynthesis, and prolidase activity in human skin fibroblasts. *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**;11:1849–1857.
51. Sjöström, H.; Norén, O. Structural properties of pig intestinal proline dipeptidase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1974**;359:177–185.
52. Lupi, A.; Della Torre, S.; Campari, E.; Tenni, R.; Cetta, G.; Rossi, A.; Forlino, A. Human recombinant prolidase from eukaryotic and prokaryotic sources. Expression, purification, characterization and long-term stability studies. *FEBS J.* **2006**;273:5466–5478.
53. Surazynski, A.; Liu, Y.; Milyk, W.; Phang, J.M. Nitric oxide regulates prolidase activity by serine/threonine phosphorylation. *J. Cell Biochem.* **2005**;96:1086–1094.
54. Surazynski, A.; Palka, J.; Wolczynski, S. Phosphorylation of prolidase increases the enzyme activity. *Mol. Cell Biochem.* **2001**;220:95–101.
55. Palka, J.A. The role of prolidase as an enzyme participating in the metabolism of collagen. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* **1996**;41:149–160.
56. Surazynski, A.; Milyk, W.; Palka, J.; Phang, J.M. Prolidase-dependent regulation of collagen biosynthesis. *Amino Acids*. **2008**;35:731–738.
57. Kadler, K.E.; Baldock, C.; Bella, J.; Boot-Handford, R.P. Collagens at a glance. **J. Cell Sci.** **2007**;120:1955–1958.
58. Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R.A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**;147:1–73.
59. Palka, J.A.; Phang, J.M. Prolidase activity in fibroblasts is regulated by interaction of extracellular matrix with cell surface integrin receptors. *J. Cell Biochem.* **1997**, 67, 166–175.
60. Endo, F.; Tanoue, A.; Nakai, H.; Hata, A.; Indo, Y.; Titani, K.; Matsuda, I. Primary structure and gene localization of human prolidase. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 4476–4481.
61. Galicka, A.; Wolczyński, S.; Anchim, T.; Surazyński, A.; Lesniewicz, R.; Palka, J. Defects of type I procollagen metabolism correlated with decrease of prolidase



- activity in a case of lethal osteogenesis imperfecta. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 2172–2178.
62. Mezu-Ndubuisi, O.J.; Maheshwari, A. The Role of Integrins in Inflammation and Angiogenesis. *Pediatr. Res.* **2021**;89 (7), 1619–1626.
63. Miltyk, W.; Karna, E.; Wolczynski, S.; Palka, J. Insulin-Like Growth Factor I-Dependent Regulation of Prolidase Activity in Cultured Human Skin Fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* **1998**;189, 177–183.
64. Kubiczekova, L.; Sedlarikova, L.; Hajek, R.; Sevcikova, S. TGF- $\beta$  - An Excellent Servant but a Bad Master. *J. Translational Med. BioMed Cent.* **2012**;10, 1–24
65. Surazynski, A.; Donald, S.P.; Cooper, S.K.; Whiteside, M.A.; Salnikow, K.; Liu, Y.; Phang, J.M. Extracellular matrix and HIF-1 signaling: The role of prolidase. *Int. J. Cancer.* **2008**;122:1435–1440.
66. Kim, K. K.; Sheppard, D.; Chapman, H. A. TGF- $\beta$ 1 Signaling and Tissue Fibrosis. Cold Spring Harbor Perspect. *Biol.* **2018**;10, a022293.
67. Surazynski, A.; Miltyk, W.; Prokop, I.; and Palka, J. Prolidase-Dependent Regulation of TGF Beta and TGF Beta Receptor Expressions in Human Skin Fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**;649 (1-3), 115–119.
68. Zeltz, C.; Orgel, J.; and Gullberg, D. Molecular Composition and Function of Integrin-Based Collagen Glues - Introducing Colinbris. *Biochim. Bio-phys. Acta - Gen.* **2014**;1840, 2533–2548
69. Surazymski, A.; Palka, J.; Wolczynski, S. Acetylsalicylic Acid-Dependent Inhibition of Collagen Biosynthesis and Beta1-Integrin Signaling in Cultured Fibroblasts. *Med. Sci. monitor : Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2004**;10, BR175–179.
70. Blackstock, C. D.; Higashi, Y.; Sukhanov, S.; Shai, S.Y.; Stefanovic, B.; Tabony, A. M.; et al. Insulin-like Growth Factor-1 Increases Synthesis of Collagen Type I via Induction of the mRNA-Binding Protein LARP6 Expression and Binding to the 5' Stem-Loop of COL1a1 and COL1a2 mRNA. *J. Biol. Chem.* **2014**;289, 7264–7274.
71. Sienkiewicz, P.; Palka, M.; Palka, J. Oxidative Stress Induces IGF-I Receptor Signaling Disturbances in Cultured Human Dermal Fibroblasts. A Possible Mechanism for Collagen Biosynthesis Inhibition. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2004**;9, 643–650.
72. Lokmic, Z.; Musyoka, J.; Hewitson, T. D.; Darby, I. A. Hypoxia and Hypoxia Signaling in Tissue Repair and Fibrosis. *Int. Rev. Cel Mol. Biol.* **2012**;296, 139–185.

73. Mitchell, S.; Vargas, J.; Hoffmann, A. Signaling via the NFκB system. Wiley Interdiscip. *Rev Syst Biol Med.* **2016**;8(3):227-41.
74. Liu, W.; Phang, J.M. Proline dehydrogenase (oxidase), a mitochondrial tumor suppressor, and autophagy under the hypoxia microenvironment. *Autophagy.* **2012**;8(9):1407-9.
75. Zareba, I.; Palka, J. Prolidase-proline dehydrogenase/proline oxidase-collagen biosynthesis axis as a potential interface of apoptosis/autophagy. *BioFactors.* **2016**;42(4):341-8.
76. Hu, C.A.; Donald, S.P.; Yu, J.; Lin, W.W.; Liu, Z.; Steel, G.; Obie, C.; Valle, D.; Phang, J. Overexpression of proline oxidase induces proline-dependent and mitochondria-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* **2007**;295(1-2):85-92.
77. Liu, Y.; Borchert, G.L.; Surazynski, A.; Hu, C.A.; Phang, J.M. Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling. *Oncogene.* **2006**;25(41):5640-5647.
78. Hu, C.A.; Khalil, S.; Zhaorigetu, S.; Liu, Z.; Tyler, M.; Wan, G.; et al. Human Delta1 - pyrroline-5-carboxylate synthase: function and regulation. *Amino Acids.* **2008**;35(4):665-72.
79. Fahmy, A.S.; Mohamed, S.A.; Girgis, R.B.; Abdel-Ghaffar, F.A.; Enzymes of delta 1- pyrroline-5-carboxylate metabolism in the camel tick *Hyalomma dromedarii* during embryogenesis. Purification and characterization of delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenases. *Biochem. Mol. Biol.* **1997**;118(1): 229-37.
80. Jones, J.T.; Akita, R.W.; Sliwkowski MX. Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.* **1999**;447(2-3):227-31.
81. Hynes, N.E.; Lane, H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**;5(5):341-54.
82. Arteaga, C.L.; Engelman, J.A. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* **2014**;25(3):282-303.
83. Misiura, M.; Miltyk, W. Current Understanding of the Emerging Role of Prolidase in Cellular Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 5906.
84. Tong, J.; Wang, Z. Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor-Induced Cell Motility by Wound Healing Assay. *Methods Mol. Biol.* **2017**;1652:159–163.
85. Yang, L.; Li, Y.; Bhattacharya, A.; Zhang, Y. A plasma proteolysis pathway comprising blood coagulation proteases. *Oncotarget.* **2016**;7(27):40919-38.

86. Hafner, A.; Bulyk, M.L.; Jambhekar A., Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**;20:199–210.
87. Yang, L.; Li, Y.; Bhattacharya, A.; Zhang, Y. Loss of peptidase D binding restores the tumor suppressor functions of oncogenic p53 mutants. *Commun. Biol.* **2021**;4(1):1373.
88. Best, S.M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* **2017**;91:e01970-16.
89. Thurmond, S.; Wang, B.; Song, J.; Hai, R. Suppression of Type I Interferon Signaling by *Flavivirus* NS5. *Viruses.* **2018**;10:712.
90. Tyler, J.A.; Bolis, S.; Dingle, J.T.; Middleson, J.F.S. Mediators of matrix catabolism. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*; Kuettner, K.E., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., Hascall, V.C., Eds.; Raven Press: New York, NY, USA, **1992**; pp. 251–264.
91. Tyler, J.A. Articular cartilage cultured with catabolin (pig interleukin I) synthesized a decreased number of normal proteoglycan molecules. *Biochem. J.* **1985**, *227*, 869–878.
92. Aydelotte, M.; Raiss, R.; Caterson, B.; Kuettner, K. Influence of interleukin-1 on the metabolism of proteoglycans and morphology of cultured bovine articular chondrocytes. *Connect. Tissue Res.* **1992**, *8*, 59–143.
93. Beekman, B.; Verzijl, N.; de Roos, J.A.; TeKoppele, J.M. Matrix degradation by chondrocytes cultured in alginate: IL-1 beta induces proteoglycan degradation and proMMP synthesis but does not result in collagen degradation. *Osteoarthr. Cartil.* **1998**, *6*, 330–340.
94. Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Muzio, L.L. The Crucial Role of Protein Phosphorylation in Cell Signaling and its Use as Targeted Therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 271–280.
95. Palka, J.A.; Karna, E.; Milyk, W. Fibroblast chemotaxis and prolidase activity modulation by insulin-like growth factor II and mannose 6-phosphate. *Mol. Cell Biochem.* **1997**, *168*, 177–183.
96. Milyk, W.; Palka, J.A. Potential role of pyrroline 5-carboxylate in regulation of collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2000**, *125*, 265–271.
97. Eming, S.A.; Martin, P.; Tomic-Canic, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* **2014**;6(265):265sr6.

98. Wee, P.; Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. **2017**;9(5).
99. Prokop, I.; Konończuk, J.; Surażyński, A.; Palka, J. Cross-talk between integrin receptor and insulin-like growth factor receptor in regulation of collagen biosynthesis in cultured fibroblasts. *Adv. Med. Sci.* **2013**;58(2):292-7.
100. Lurje, G.; Lenz, H.J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* **2009**, 77, 400–410.
101. Lee, S.H.; Zahoor, M.; Hwang, J.K.; Min, D.S.; Choi, K.Y. Valproic acid induces cutaneous wound healing in vivo and enhances keratinocyte motility. *PLoS ONE* **2012**, 7, e48791.
102. Rippe, R.A.; Schrum, L.W.; Stefanovic, B.; Solís-Herruzo, J.A.; Brenner, D.A. NF-kappaB inhibits expression of the alpha1(I) collagen gene. *DNA Cell Biol.* **1999**, 18, 751–761.
103. Kouba, D.J.; Chung, K.Y.; Nishiyama, T.; Vindevoghel, L.; Kon, A.; Klement, J.F.; Uitto, J.; Mauviel, A. Nuclear factor-kappa B mediates TNF-alpha inhibitory effect on alpha 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. *J. Immunol.* **1999**, 162, 4226–4234.
104. Milyk, W.; Karna, E.; Palka, J.A. Prolidase-independent mechanism of camptothecin-induced inhibition of collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *J. Biochem.* **2007**, 141, 287–292.
105. Sen, S.; Basak, P.; Prasad Sinha, B.; Maurye, P.; Kumar Jaiswal, K.; Das, P.; Kumar Mandal, T. Anti-inflammatory effect of epidermal growth factor conjugated silk fibroin immobilized polyurethane ameliorates diabetic burn wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 143, 1009–1032.
106. Liu, L.; Song, S.; Zhang, Y.P.; Wang, D.; Zhou, Z.; Chen, Y.; Jin, X.; Hu, C.F.; Shen, C.X. Amphiregulin promotes cardiac fibrosis post myocardial infarction by inducing the endothelial-mesenchymal transition via the EGFR pathway in endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **2020**, 390, 111950.
107. Overstreet, J.M.; Wang, Y.; Wang, X.; Niu, A.; Gewin, L.S.; Yao, B.; Harris, R.C.; Zhang, M.Z. Selective activation of epidermal growth factor receptor in renal proximal tubule induces tubulointerstitial fibrosis. *FASEB J.* **2017**, 31, 4407–4421.
108. Pellegrinelli, V.; Rodriguez-Cuenca, S.; Rouault, C.; Figueroa-Juarez, E.; Schilbert, H.; Virtue, S.; Moreno-Navarrete, J.M.; Bidault, G.; Vázquez-Borrego, M.C.; Dias,

- A.R.; et al. Dysregulation of macrophage PEPD in obesity determines adipose tissue fibro-inflammation and insulin resistance. *Nat. Metab.* **2022**, *4*, 476–494.
109. Oscilowska, I.; Huynh, T.Y.L.; Baszanowska, W.; Prokop, I.; Surazynski, A.; Galli, M.; Zabielski, P.; Palka, J. Proline oxidase silencing inhibits p53-dependent apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Amino Acids* **2021**, *53*, 1943–1956.
110. Barrientos, S.; Stojadinovic, O.; Golinko, M.S.; Brem, H.; Tomic-Canic, M. Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 585–601.
111. Yoshida, A.; Kanno, H.; Watabe, D.; Akasaka, T.; Sawai, T. The Role of Heparin-Binding EGF-like Growth Factor and Amphiregulin in the Epidermal Proliferation of Psoriasis in Cooperation with TNF $\alpha$ . *Arch. Dermatol. Res.* **2008**, *300*, 37–45.
112. Rao, T.C.; Ma, P.Y.; Blanchard, A.; Umer, T.M.; Mattheyses, A.L. EGFR activation attenuates the mechanical threshold for integrin tension and focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, jcs238840.
113. Pujol, J.P.; Brisset, M.; Jourdan, C.; Bocquet, J.; Jouis, V. Effect of a mononuclear cell factor (MCF) on collagen production in cultured articular chondrocytes: Role of prostaglandin E2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *119*, 499–508.
114. Benton, H.P.; Tyler, J.A. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *154*, 421–428.
115. Gowen, M.; Wood, D.D.; Ihrie, E.J.; Meats, J.E.; Russel, R.G.G. Stimulation by human interleukin-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *797*, 186–193.
116. Dingle, J.T. Mechanism of cartilage destruction and repair: The outlook. *Clinique Rheum.* **1993**, *3*, 1–5.
117. Martel-Pelletier, J. Patophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **1998**, *6*, 374–376.
118. Hamerman, D. Aging and osteoarthritis: Basic mechanisms. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1993**, *41*, 760–770.
119. Yang, H.L.; Tsai, Y.C.; Korivi, M.; Chang, C.T.; Hseu, Y.C. Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI3K/AKT, Wnt/beta-catenin and NF-kappaB Signaling Pathways. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 151–168.

120. Jiang Y, Tsoi LC, Billi AC, Ward NL, Harms PW, Zeng C, et al. Cytokinocytes: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight*. **2020**;5(20).
121. Misiura M, Guszczyn T, Oscilowska I, Baszanowska W, Palka J, Milyk W. Platelet- Rich Plasma Promotes the Proliferation of Human Keratinocytes via a Progression of the Cell Cycle. A Role of Prolidase. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2).
122. Marx, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. **2001**, 10, 225–228.
123. Amable, P.R.; Carias, R.B.; Teixeira, M.V.; da Cruz Pacheco, I.; Corrêa do Amaral, R.J.; Granjeiro, J.M.; Borojevic, R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem. Cell Res. Ther*. **2013**, 4, 67.
124. Kitchener, R.L.; Grunden, A.M. Prolidase function in proline metabolism and its medical and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol*. **2012**, 113, 233–247.

## Rozdział 10. Streszczenie w języku polskim

Przedmiotem badań stanowiących treść rozprawy doktorskiej jest poznanie złożonych mechanizmów regulacji procesu naprawczego uszkodzonych tkanek w przebiegu zapalenia oraz poszukiwanie nowych sposobów terapii wspomagającej ich regenerację tkanek.

W kontekście poszukiwania czynników pobudzających proces gojenia ran na uwagę zasługują prolidaza (PEPD), wewnątrzkomórkowy enzym, który niedawno okazał się również ligandem EGFR. Odkrycie to sugeruje, że PEPD może uczestniczyć w sygnalizacji EGFR i regulacji proliferacji i migracji komórek.

Przeprowadziłam szereg badań *in vitro* mających na celu ocenę wpływu pozakomórkowej PEPD na procesy naprawcze w eksperymentalnym modelu mechanicznie uszkodzonych fibroblastów i modelu zapalenia indukowanego interleukiną-1 $\beta$ . Wykazałam, że zwierzęca PEPD indukuje proliferację i migrację fibroblastów w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. Proces ten był szczególnie nasilony w komórkach mechanicznie uszkodzonych, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Mechanizm tego procesu związany jest z sygnalizacją EGFR, ponieważ pozakomórkowa PEPD aktywowała białka szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR. Dowodem potwierdzającym działania PEPD na szlak sygnałowy EGFR był eksperyment z zastosowaniem gefitinibu, inhibitora EGFR. Dowiodłam, że gefitinib zahamował pobudzające działanie PEPD na szlak sygnałowy EGFR poprzez obniżenie stopnia fosforylacji białek PI3K, Akt i mTOR, a także ekspresji ich form całkowitych. Funkcjonalne znaczenie tego procesu przedstawiłam w modelu gojenia ran pozwalającym ocenić szybkość migracji fibroblastów. Wyniki tego eksperymentu wskazują, że PEPD-zależne pobudzenie migracji fibroblastów w modelu mechanicznie uszkodzonych komórek jest zniesione przez gefitinib, co potwierdza obserwację, że aktywacja EGFR przez PEPD jest kluczowym czynnikiem pobudzającym migrację fibroblastów. Oceeniłam także wzajemną komunikację pomiędzy EGFR, IGF-1R i receptorem integrynowym  $\beta$ 1. Wiadomo bowiem, że aktywność PEPD regulowana jest poprzez receptor integrynowy  $\beta$ 1 i receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R). Wykazałam, że fibroblasty stymulowane PEPD pobudzają biosyntezę kolagenu za pośrednictwem szlaku sygnałowego generowanego przez pobudzone receptory  $\beta$ 1-integryny i IGF-1R. Indukują one kaskadę szlaku sygnałowego z udziałem białek FAK, Grb2 i kinaz ERK1/ ERK2 stymulując biosyntezę kolagenu.

Procesowi uszkodzenia mechanicznego tkanki towarzyszy stan zapalny. Dlatego przeprowadziłam dalsze badania w celu oceny biologicznych skutków działania rekombinowanej ludzkiej prolidazy (rhPEPD) na fibroblasty w modelu zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$ . Zaobserwowałam, że PEPD w obecności IL-1 $\beta$  silnie stymuluje proliferację i migrację fibroblastów w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. Ważnym odkryciem moich badań było wykazanie, że PEPD aktywuje sygnalizację EGFR w modelu zapalnym (indukowanym przez IL-1 $\beta$ ) poprzez aktywację całkowitych i ufosforylowanych form białek PI3K/AKT/mTOR, które biorą udział w migracji i proliferacji fibroblastów podczas gojenia ran. Zahamowanie zależnej od PEPD aktywacji EGFR przez gefitynib doprowadziło do obniżenia ekspresji obu form EGFR i białek od niego zależnych, co potwierdza zależną od PEPD aktywację tego receptora. Ponadto dowiodłam, że rhPEPD i IL-1 $\beta$  aktywują receptor integrynowy  $\beta$ 1, na co wskazuje wzrost ekspresji receptora integrynowego  $\beta$ 1 i białek sygnałowych indukowanych przez ten receptor, takich jak p-FAK, Grb2 i ERK1/2.

Wyniki moich badań potwierdzają, że IL-1 $\beta$  hamuje biosyntezę kolagenu. Jednak w obecność rhPEPD lub EGF nie tylko znosi działanie hamujące IL-1 $\beta$  na biosyntezę kolagenu, ale stymuluje ten proces w sposób zależnie od dawki i czasu inkubacji. Uzyskane wyniki pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że w przebiegu eksperymentalnego zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$ , zależna od PEPD aktywacja szlaku sygnałowego EGFR prowadzi do pobudzenia biosyntezy kolagenu. Interesującym odkryciem uzupełniającym mechanizm działania rhPEPD w warunkach zapalenia indukowanego przez IL-1 $\beta$ , jest wykazanie wzrostu aktywności MMP-2 i MMP-9, co sugeruje zwiększoną zdolność fibroblastów do degradacji składników ECM, umożliwiając tym samym proces migracji komórek do zranionego miejsca.

Niniejsze badania po raz pierwszy przedstawiają dowody, że PEPD aktywuje EGFR-zależny proces gojenia ran poprzez pobudzenie proliferacji i migracji komórek w eksperymentalnym modelu uszkodzonych mechanicznie fibroblastów i modelu zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$ . Funkcjonalne znaczenie otrzymanych wyników może zapewnić nowe podejście do terapii zaburzeń gojenia ran.



## Streszczenie w języku angielskim

The subject of the research constituting the content of the doctoral dissertation is to learn the complex mechanisms of regulating the repair process of damaged tissues in the course of inflammation and to search for new ways of therapy supporting tissue regeneration.

Prolidase (PEPD), an intracellular enzyme that has recently also been shown to be a ligand of EGFR, deserves attention in the context of the search for factors that stimulate the wound healing process. This finding suggests that PEPD may be involved in EGFR signaling and regulation of cell proliferation and migration.

I conducted a number of in vitro studies to assess the effect of extracellular PEPD on repair processes in an experimental model of mechanically damaged fibroblasts and a model of interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation. I showed that animal-derived PEPD induces proliferation and migration of fibroblasts in a dose- and time-dependent manner. This process was particularly intensified in mechanically damaged cells, compared to control cells. The mechanism of this process is related to EGFR signaling, since extracellular PEPD activated proteins of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Evidence confirming the effects of PEPD on the EGFR signaling pathway was an experiment with the use of gefitinib, an EGFR inhibitor. I proved that gefitinib inhibited the stimulatory effect of PEPD on the EGFR signaling pathway by reducing the degree of phosphorylation of PI3K, Akt and mTOR proteins, as well as the expression of their complete forms. The functional significance of this process was presented in a wound healing model that allows to assess the rate of fibroblast migration. The results of this experiment indicate that the PEPD-mediated stimulation of fibroblast migration in a model of mechanically damaged cells is abolished by gefitinib, supporting the observation that EGFR activation by PEPD is a key factor in stimulating fibroblast migration. I also evaluated the mutual communication between EGFR, IGF-1R and the  $\beta$ 1-integrin receptor. It is known that the activity of PEPD is regulated by the  $\beta$ 1-integrin receptor and the insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R). I showed that PEPD-stimulated fibroblasts induce collagen biosynthesis via a signaling pathway generated by activated  $\beta$ 1-integrin and IGF-1R receptors. They induce a cascade of signaling pathway involving FAK, Grb2 and ERK1/ERK2 kinases, stimulating collagen biosynthesis.

The process of mechanical damage of tissues is accompanied by inflammation. Therefore, I conducted further studies to evaluate the biological effects of recombinant human prolidase (rhPEPD) on fibroblasts in a model of IL-1 $\beta$ -induced inflammation. I observed that PEPD in the presence of IL-1 $\beta$  strongly stimulates the proliferation and migration of fibroblasts in a dose- and time-dependent manner. An important finding of my research was the demonstration that PEPD activates EGFR signaling in an inflammatory model (induced by IL-1 $\beta$ ) by activating total and phosphorylated forms of PI3K/AKT/mTOR proteins, which are involved in the migration and proliferation of fibroblasts during wound healing. Inhibition of PEPD-dependent EGFR activation by gefitinib led to downregulation of both forms of EGFR and its dependent proteins, confirming PEPD-dependent activation of this receptor. In addition, I have proved that rhPEPD and IL-1 $\beta$  activate the  $\beta$ 1 integrin receptor signaling, as indicated by an increase in the expression of the  $\beta$ 1 integrin receptor and signaling proteins induced by this receptor, such as p-FAK, Grb2 and ERK1/2.

The results of my research confirm that IL-1 $\beta$  inhibits collagen biosynthesis. However, in the presence of rhPEPD or EGF, it not only abolishes the inhibitory effect of IL-1 $\beta$  on collagen biosynthesis, but stimulates this process in a dose- and time-dependent manner. The obtained results allow to conclude that in the course of experimental inflammation induced by IL-1 $\beta$ , PEPD-dependent activation of the EGFR signaling pathway leads to the stimulation of collagen biosynthesis. An interesting finding supplementing the mechanism of rhPEPD action in the conditions of inflammation induced by IL-1 $\beta$  is the increase in the activity of MMP-2 and MMP-9, which suggests an increased ability of fibroblasts to degrade ECM components, thus enabling the process of cell migration to the wounded site.

This study presents for the first time evidence that PEPD activates EGFR-dependent wound healing by stimulating cell proliferation and migration in an experimental model of mechanically damaged fibroblasts and inflammation induced by IL-1 $\beta$ . The functional significance of the obtained results may provide a new approach to the treatment of wound healing disorders.

## **Rozdział 11. Kopie publikacji składających się na rozprawę doktorską**

**11.1. Publikacja I.** „Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta$ 1-integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts”.

International Journal of Molecular Sciences. 2021; 21, 5906.

<https://doi.org/10.3390/ijms22020942>. IF: 6.208, MEiN: 140 punktów.



Article

# Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR, $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts

Weronika Baszanowska <sup>1</sup>, Magdalena Misiura <sup>2</sup> , Iлона Oscilowska <sup>1</sup> , Jerzy Palka <sup>1</sup> and Wojciech Milyk <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicinal Chemistry, Medical University of Białystok, Kilińskiego 1, 15-089 Białystok, Poland; w.baszanowska22@wp.pl (W.B.); ilonazareba@gmail.com (I.O.); pal@umb.edu.pl (J.P.)

<sup>2</sup> Department of Analysis and Bioanalysis of Medicines, Medical University of Białystok, Kilińskiego 1, 15-089 Białystok, Poland; magdalena.misiura@umb.edu.pl

\* Correspondence: wojciech.milyk@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-748-5845

**Abstract:** The role of prolidase (PEPD) as a ligand of the epidermal growth factor receptor (EGFR) was studied in an experimental model of wound healing in cultured fibroblasts. The cells were treated with PEPD (1–100 nM) and analysis of cell viability, proliferation, migration, collagen biosynthesis, PEPD activity, and the expressions of EGFR, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), and  $\beta_1$ -integrin receptor including downstream signaling proteins were performed. It has been found that PEPD stimulated proliferation and migration of fibroblasts via activation of the EGFR-downstream PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Simultaneously, PEPD stimulated the expression of  $\beta_1$ -integrin and IGF-1 receptors and proteins downstream to these receptors such as FAK, Grb2, and ERK1/2. Collagen biosynthesis was increased in control and “wounded” fibroblasts under PEPD treatment. The data suggest that PEPD-induced EGFR signaling may serve as a new attempt to therapy wound healing.

**Keywords:**  $\beta_1$ -integrin; EGFR; fibroblasts; IGF-1; PEPD; prolidase; wound healing



Citation: Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Milyk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>

Received: 17 December 2020

Accepted: 16 January 2021

Published: 19 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Skin, as the largest organ of the human body, is responsible for several major functions. It protects against mechanical damage, extreme temperature, microbial infection, radiation, and other environmental factors [1]. Damage of this protective barrier may lead to serious disturbances in the functioning of the entire body. For this reason, the repair processes of this organ are of particular research interest. Skin repair requires the participation of several different cell types [2] as well as many different factors, cellular proteins, soluble growth factors, and extracellular matrix (ECM) proteins [3]. In this process fibroblasts and growth factors play a dominant role. It is well established that during the wound healing process fibroblast functions are activated by PDGF, EGF, IGF-1, and others [4]. However, not all defects in wound healing could be explained based on the growth factors. An example is prolidase deficiency (PD) that is accompanied, among others, by ulceration and impaired wound healing [5]. It got attention on the role of prolidase in wound healing, particularly because of recent data showing that prolidase operates as a regulator of epidermal growth factor receptor (EGFR) and HER2-dependent signaling pathways [6], p53 transcriptional activity [7], and interferon  $\alpha/\beta$  receptor expression [8,9].

Prolidase, known as peptidase D (PEPD), plays a significant role in collagen metabolism and matrix remodeling. It participates in the last step of collagen degradation, cleaving dipeptides with proline or hydroxyproline at the C terminus. Released proline could be used for collagen resynthesis [10–13]. It has been discovered that PEPD is involved in the regulation of collagen biosynthesis. Using cellular models it has been shown that collagen-prolidase axis is affected in fibroblast treated with anti-inflammatory drugs [14], pyrroline 5-carboxylate (proline metabolite) [15,16], in experimental inflammation of chondrocytes [10], during experimental fibroblasts aging [15], activation of integrin receptor

for type I collagen in osteogenesis imperfecta-derived fibroblasts [17] and cancer cell models [18–20].

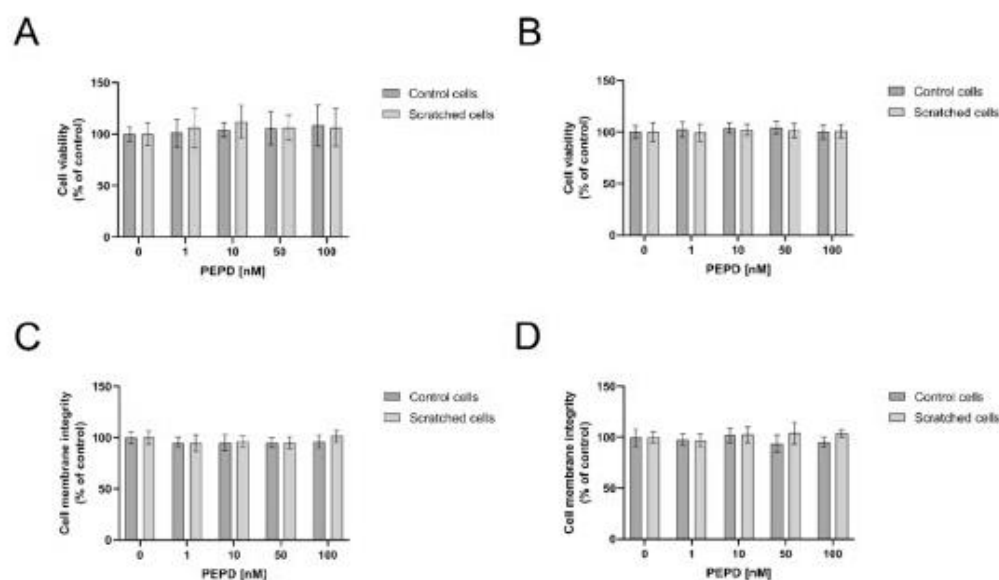
EGFR is a member of the transmembrane receptor tyrosine kinases (ERBB family) which requires dimerization of receptor subunits for autophosphorylation inducing further signaling [21,22]. This process leads to the induction of proliferation, differentiation, and migration of the cells through the phosphorylation of proteins in several signaling pathways [23–25]. The key EGFR downstream signaling involves the PI3K/ AKT/mTOR, Ras/Raf/ERK, and JAK/STAT pathways [6,26,27]. EGFR signaling is coupled to adhesion receptor signaling. Growth promoting and anabolic pathways require activation of integrin receptor pathways. For instance, stimulation of  $\beta_1$ -integrin receptor induces autophosphorylation of FAK that integrates the signal from growth factor receptors leading to up-regulation of two MAP kinases: ERK1/2 [28,29] inducing cell growth, differentiation, and metabolism [28,30]. Of special interest is that activation of  $\beta_1$ -integrin receptor up-regulates PEPD activity and collagen biosynthesis [8,9,12,31]. However, the role of PEPD in the anabolic and growth-promoting processes in tissue regeneration is still unknown.

We hypothesized that PEPD-EGFR interaction may represent an important mechanism for regenerative processes in the skin. Skin fibroblasts characterized by high PEPD activity and the capacity to synthesize collagen [8] served as model cells to study the effect of PEPD on several processes accompanied by experimental wound healing.

## 2. Results

### 2.1. The Viability of Fibroblasts Is Not Affected by Extracellular PEPD

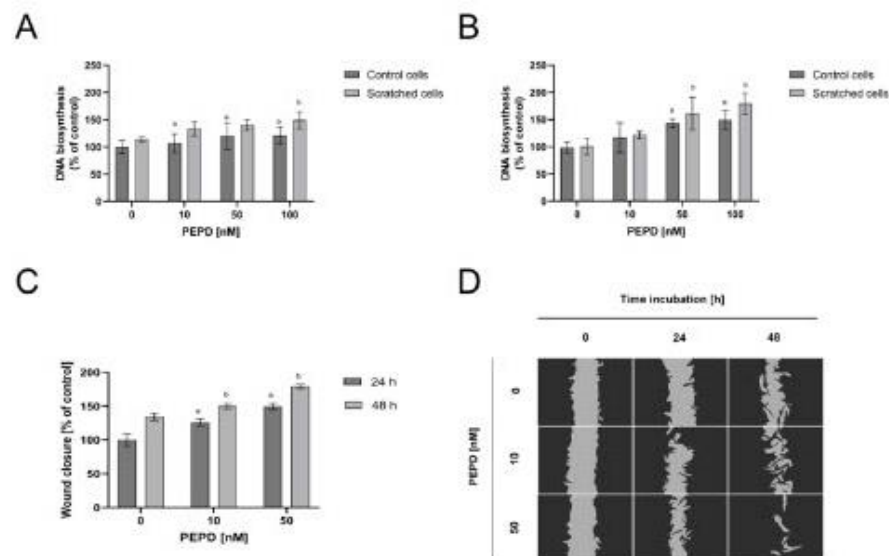
The effect of PEPD on cell viability was evaluated by measurement of MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) concentration (Figure 1A,B) and the integrity of the cell membrane (Figure 1C,D). PEPD-treated fibroblasts (range of concentration: 1–100 nM) did not affect cell viability as well as cell membrane integrity in both cell models, control and “scratched”, after 24 and 48 h of incubation, respectively.



**Figure 1.** The effect of PEPD on fibroblasts viability and cell membrane integrity. Control cells, as well as scratched fibroblasts, were treated with PEPD (1–100 nM) for 24 h (A,C) and 48 h (B,D) followed by measurement of MTT and cell membrane integrity, respectively. Mean values  $\pm$  SD of three experiments done in replicates are presented. The results are significant at a, b < 0.05 indicates a vs. control (0 nM of PEPD) of control cells, b vs. control (0 nM of PEPD) of scratched cells, respectively. PEPD—prolidase.

## 2.2. Fibroblast Proliferation and Migration Are Augmented by PEPD Treatment in an Experimental Model of Wounded Cells

The effect of PEPD on fibroblast proliferation after mechanical damage, the of the cell monolayer (by scratch), and DNA biosynthesis were measured by fluorescence assay. The cells were incubated with the selected concentrations (from 1 nM to 100 nM) of PEPD for 24 and 48 h. As shown in Figure 2A, PEPD promoted similar cell proliferation in both controls and “wounded” cellular models. The process was also time-dependent since after 48 h incubation (Figure 2B) the effect was augmented in both models of the cells.



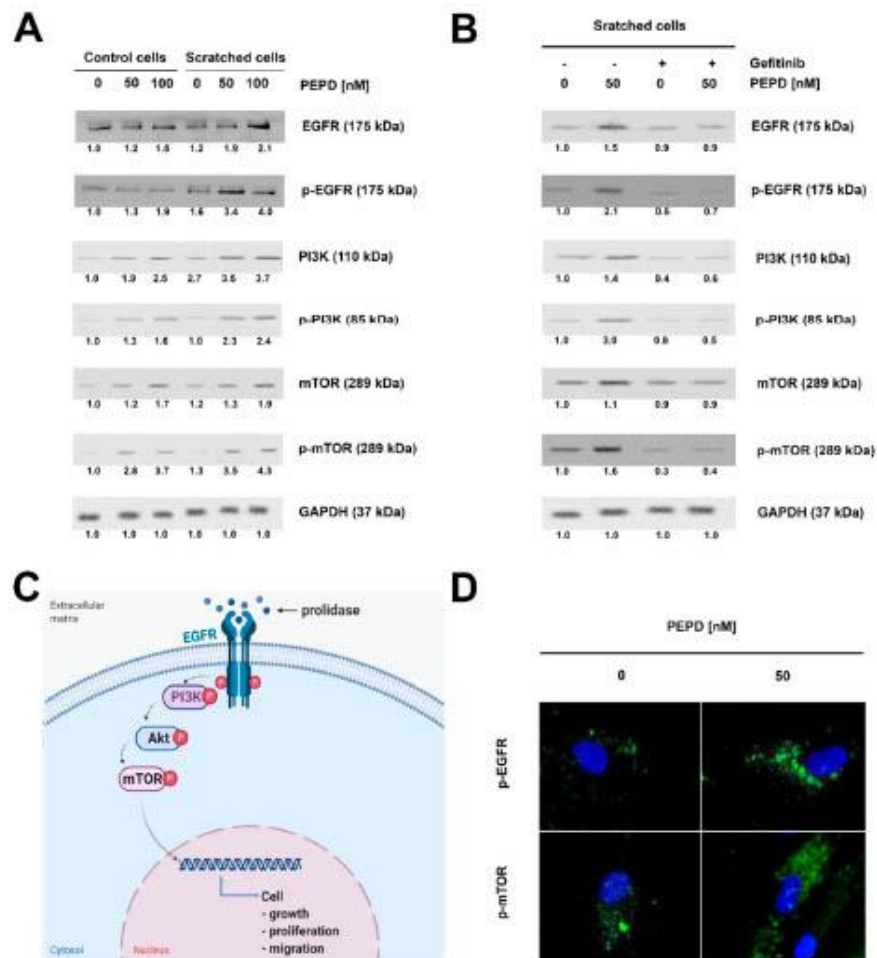
**Figure 2.** Extracellular PEPD-dependent proliferation and migration of fibroblasts in a model of closure/scratch assay. (A,B) Control, as well as “scratched” fibroblasts, were treated with PEPD (1–100 nM) for 24 h and 48 h, and proliferation was evaluated using CyQuant Proliferation assay. (C,D) PEPD-stimulated fibroblasts migration was calculated using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) vs. control. PEPD-treated cells were scratched and monitored using an inverted microscope (40× magnification) at 0, 24, and 48 h. Mean values  $\pm$  SD of three experiments done in replicates are presented. The results are significant at a,  $b < 0.05$ , and indicates a vs. control (0 nM of PEPD) of control cells and part C of 24 h incubation, b vs. control (0 nM of PEPD) of scratched cells, and part C of 48 h incubation, respectively. PEPD—prolidase.

Similarly, the effect of extracellular PEPD on fibroblast migration was studied in wound closure/scratch assay. The data demonstrate that PEPD induced wound closure and the process was dependent on the dose of PEPD and time of incubation (Figure 2C). Quantification of the wounded area showed that PEPD-treated fibroblasts migrated faster to the wounded area than control cells, especially after 48 h incubation. These results were confirmed by microscopic visualization, as presented in Figure 2D. PEPD-treated cells for 48 h yielded nearly the entire closure of the wound, whilst the scratched area of control cells (no PEPD treatment) was slightly decreased. The obtained results showed that PEPD-driven wound closure is dependent on a dose and time of fibroblasts treatment with the EGFR ligand.

## 2.3. Extracellular PEPD Induces EGFR-Downstream Signaling Pathways

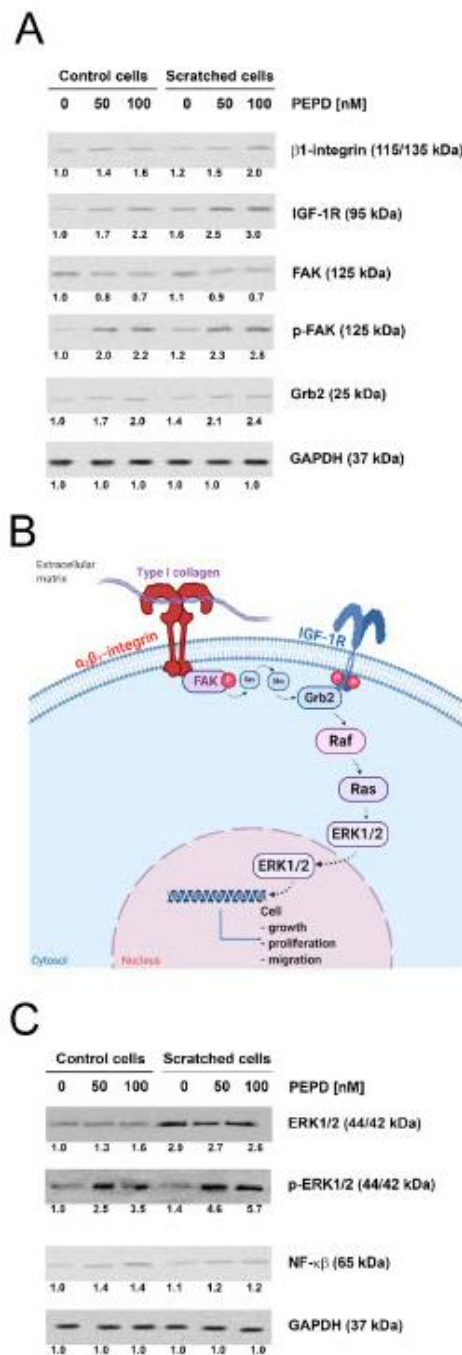
To test whether extracellular PEPD functions may undergo via EGFR, the expression of EGFR-dependent signaling proteins was assessed in fibroblasts after PEPD treatment. As presented in Figure 3A, in PEPD-treated cells (50, and 100 nM) the phosphorylated and total forms of EGFR, PI3K (p85), mTOR protein expressions were increased in a dose-dependent

manner. The expression of phospho-EGFR and phospho-mTOR in a model of wounded cells stimulated by PEPD was confirmed by immunofluorescence analysis (Figure 3D).



**Figure 3.** Extracellular PEPD-induced epidermal growth factor receptor (EGFR)-downstream signaling pathway. (A) Western blot for the proteins of EGFR-downstream signaling pathway in lysates of control and “scratched” PEPD-treated fibroblasts (PEPD, 1–100 nM) for 24 h or PEPD-treated fibroblasts (PEPD, 0 and 50 nM) with an inhibitor of EGFR (Gefitinib pretreated cells for 2 h, 0 and 45  $\mu$ M) for 24 h. GAPDH was used as a loading control. (B) Representative blot images were shown (densitometry of protein stains is presented under protein bands as a ratio versus control; Supplementary Figure S1). GAPDH was used as a loading control. (C) Illustration of the PEPD-dependent EGFR-downstream signaling pathway. Created with BioRender.com. (D) Representative results of immunostaining of p-EGFR and p-mTOR in PEPD-stimulated fibroblasts (50 nM) for 24 h are presented; magnification 200 $\times$ .

Activation of EGFR signaling by PEPD is supported by the study showing that inhibition of EGFR function abolished the effects induced by PEPD. The cells were pretreated (2 h) with a well-known EGFR inhibitor, Gefitinib (final concentration: 45  $\mu$ M). It was used to counteract PEPD-dependent stimulation of EGFR signaling. Gefitinib fully reduced PEPD-related phosphorylation of EGFR and diminished expression of total EGFR protein (Figure 4B). Figure 3C presents a potential PEPD-dependent activation of the EGFR-downstream signaling pathway in fibroblasts.



**Figure 4** Extracellular PEPD induced expression of the  $\beta$ <sub>1</sub>-integrin receptor and IGF-1R signaling proteins in control and “scratched” fibroblast models. (A) The proteins of  $\beta$ <sub>1</sub>-integrin receptor and IGF-1R downstream signaling pathways, FAK, Grb2, and (C) NF- $\kappa$ B and ERK1/2 were analyzed by Western blot in lysates of PEPD-treated fibroblasts (50, and 100 nM). Representative blot images were shown (densitometry of protein stains is presented under protein bands as a ratio versus control; Supplementary Figure S2). GAPDH was used as a loading control. (B) Illustration of the  $\beta$ <sub>1</sub>-integrin receptor-downstream signaling pathway. Created with BioRender.com.

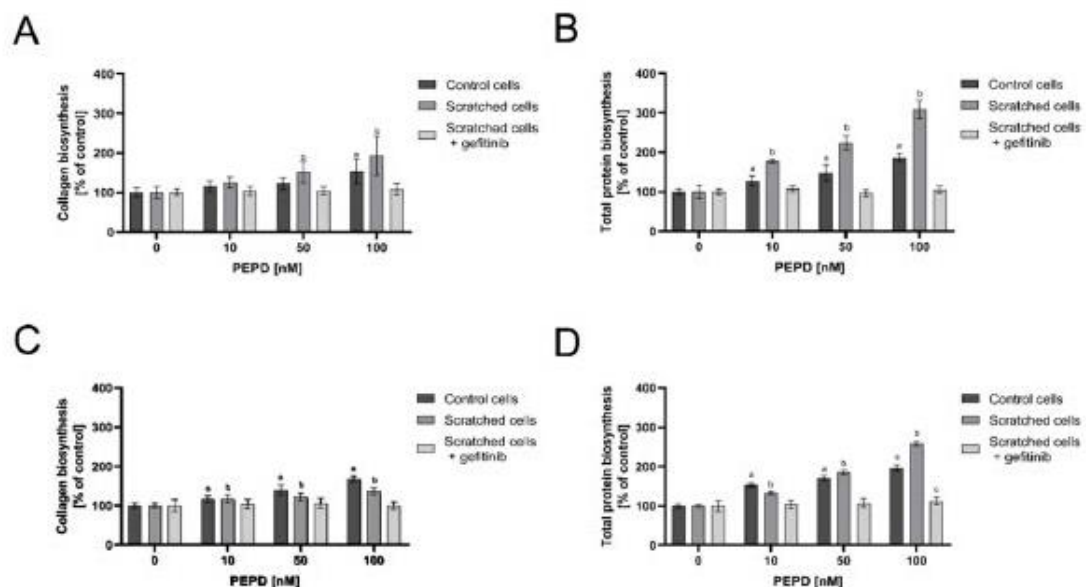


#### 2.4. The Expressions of the $\beta_1$ -integrin Receptor, IGF-1R, and Downstream Signaling Proteins Are Stimulated by an Extracellular PEPD in Control and “Scratched” Fibroblast Models

PEPD-treated fibroblasts showed elevated  $\beta_1$ -integrin receptor and IGF-1R expressions. An increase in the expression of p-FAK and Grb2, downstream proteins to these receptors was also detected by Western blot (Figure 4A). The potential signaling pathway induced by studied receptors is mediated by Ras/Raf/ERK signaling as presented in Figure 4B. PEPD strongly stimulated p-ERK1/2 in cellular models of control and “scratched” fibroblasts. Interestingly, the expression of NF- $\kappa$ B (an inhibitor of type I collagen gene expression) was elevated in PEPD-treated control cells, while “scratched” fibroblasts did not express the protein (Figure 4C).

#### 2.5. Collagen Biosynthesis Was Stimulated by Extracellular PEPD in Control and “Scratched” Fibroblast Models

The effect of PEPD on collagen biosynthesis and total protein biosynthesis was measured by radiometric assay in control and “scratched” fibroblast models. The cells were treated with the selected concentrations of PEPD (10, 50, and 100 nM) for 24 h and 48 h. As shown in Figure 5A,C, extracellular PEPD stimulated collagen biosynthesis in both control and “wounded” cells in a manner dependent on used doses and time of incubation. A similar effect of PEPD was found concerning total protein synthesis. Figure 5B,D shows that total protein biosynthesis, which was used for normalization of the results of collagen biosynthesis, is stimulated by PEPD depending on used doses and time of incubation in both cell models. Inhibitor of EGFR (Gefitinib) abolished PEPD-dependent stimulation of collagen biosynthesis (A, C) and total protein biosynthesis (B, D) in studied cell model. The data suggest that the predominant portion of proteins synthesized due to PEPD stimulation is represented by collagen.



**Figure 5.** Extracellular PEPD activated collagen and total protein biosynthesis in control and “scratched” fibroblast models. Collagen biosynthesis (A,C) and total protein biosynthesis (B,D) in PEPD-treated fibroblasts (1–100 nM) in the presence and absence of EGFR inhibitor (Gefitinib, 0 and 45  $\mu$ M pretreated cells for 2 h) after 24 and 48 h incubation, respectively. The values were presented as a percent of control cells (0 nM of PEPD). Mean values  $\pm$  SD of three experiments done in replicates is presented. The results are significant at a, b,  $c < 0.05$ , and are marked as a vs. control (0 nM of PEPD) of control cells, b vs. control (0 nM of PEPD) of scratched cells, c vs. control (0 nM of PEPD) of scratched cells incubated with gefitinib, respectively. PEPD—prolidase.

### 3. Discussion

The development of all organs requires fibroblasts to synthesize connective tissue constituents and maintain tissue architecture. The cells are of special interest in the repair phase of wound healing, since fibroblasts migrate into inflammatory sites, proliferate, and produce extracellular matrix components as glycosaminoglycans and collagen for scar formation. It is well established that migration of fibroblasts can be elicited by a variety of growth factors, e.g., EGF, IGF-1, PDGF [4].

The hypothesis that the activation of EGFR by PEPD [6] may play a crucial role in tissue regeneration led us to investigate the functional significance of fibroblast proliferation and migration in an experimental model of wound healing. In this report, we provide evidence for PEPD-induced EGFR signaling, cell proliferation, and migration in the experimental model of mechanically wounded fibroblasts in vitro.

It seems that PEPD is a good candidate as an activator of EGFR-dependent regeneration processes. It did not affect cell viability or cell membrane integrity in control and “wounded” fibroblast models. However, we observed that PEPD induced fibroblast proliferation in a dose- and time-dependent fashion as detected by evaluation of DNA biosynthesis. Interestingly, DNA biosynthesis was augmented in “scratched” cells, compared to control. Moreover, we observed that PEPD remarkably accelerated the migration of cultured human fibroblasts. In this case, we also noticed that PEPD-induced migration was dose- and time-dependent.

The mechanism explaining this process was related to the EGFR signaling. It is well established that EGFR activation is followed by an up-regulation of 3 signaling pathways such as PI3K/Akt/mTOR, the Ras/Raf/ERK, and JAK/STAT [6,26,27]. Our study shows that extracellular PEPD activated PI3K/Akt/mTOR proteins. The evidence for the mechanism was proved in the experiment showing that preincubation of the cells with EGFR inhibitor, Gefitinib, abolished the stimulatory effect of PEPD on total and phosphorylated forms of EGFR downstream signaling proteins as PI3K, Akt, and mTOR. These findings confirmed that PEPD binds to EGFR and evokes growth-promoting activity in the fibroblast model of wound healing. These data are supported by studies of Lee et al. [32] showing that blockade of the PI3K/Akt/mTOR pathway diminished cell proliferation and migration.

Growth factor signaling is often coupled to signaling induced by adhesion receptors. The example is IGF-1 and  $\alpha 2\beta 1$  integrin receptor that is activated by collagen type I [9]. The communication between both types of receptors is called cross-talk. The activation of the  $\beta 1$ -integrin receptor and IGF-1 triggers the signaling pathway cascade by the proteins FAK and MAPK (ERK1 and ERK2) [33]. PEPD strongly induced expressions of both receptors ( $\beta 1$ -integrin and IGF-1R) and their downstream proteins, as FAK and ERK1/2. This signaling cascade is known to stimulate the biosynthesis of ECM constituents, especially collagen [8,34,35]. We have shown that up-regulation of ERK contributed to down-regulation of NF- $\kappa$ B expression, a well-known inhibitor of collagen biosynthesis [36]. Therefore, the increase in collagen biosynthesis in PEPD-treated fibroblasts is a result of collagen biosynthesis stimulation by IGF-1R and inhibition of NF- $\kappa$ B expression, as an inhibitor of collagen gene expression. These data are supported by other researches [36–38]. It cannot be excluded that in the studied cells collagen biosynthesis is stimulated by EGFR signaling. The experiment with Gefitinib proved such a possibility. The stimulatory effect of EGF on collagen biosynthesis was confirmed by other authors [39–41].

The functional significance of our findings could be of importance not only in wound healing but also in prolysin deficiency (PD). It is a rare autosomal recessive disorder that is described by massive imidodipeptiduria, skin lesions as well as elevated dipeptides contained proline in plasma [5,42–47]. The most specific manifestation of PD concerns connective tissue metabolism. All cases of PD are characterized by skin lesions (e.g., diffuse telangiectasia, purpuric rash, crusting erythematous dermatitis, progressive ulcerative dermatitis, particularly on the lower legs). PD results from low or lack of PEPD activity due to mutations in the *PEPD* gene [48–50]. Studies so far on PD were focused on the intracellular

role of PEPD since its extracellular function was described just a few years ago. Given our data, it cannot be excluded that the described manifestation of PD may derive from a deficiency of extracellular PEPD function since supplementation of PD patients with proline or proline-convertible amino acids was ineffective in the therapy of the disease [51]. New data on the role of PEPD as a regulator of p53 function, interferon- $\alpha/\beta$  receptor maturation, and activation of EGFR or HER2 create the prospect of discovering new functions of PEPD [30]. As our study evidenced promising effects of PEPD in cell proliferation, migration, and connective tissue rearrangement (mainly on collagen biosynthesis), further experiments are crucial to understanding its role in PD and other connective tissue disturbances.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Fibroblasts Cell Cultures

Fibroblasts cells were cultured as we described previously [16]. Fibroblasts were subjected to treatment with porcine kidney prolidase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at a concentration of 1–100 nM. Moreover, cells were pretreated with an EGFR inhibitor, Gefitinib (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at a final concentration of 45  $\mu$ M for 2 h before supplementation with prolidase.

##### 4.2. Cell Viability

The cell viability of treated cells was measured using the MTT assay, as described previously [16]. Cells survival was calculated as a percentage of living cells when compared to control (0 nM of PEPD, 100% survival).

##### 4.3. NRU Assay

Neutral red uptake (NRU) assay was performed according to the protocol by Børenfreund and Puermer [52] to elucidate the permeability of prolidase treated cells. At indicated time-points, the culture medium was removed, after washed cells, Neutral Red solution (final concentration: 50  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was added. After 30 min, the cells were washed, dye from viable cells was released by extraction with a mixture of acetic acid, ethanol, and water (1:50:49, respectively; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After shaking, the absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (Asys UVN 340 microplate reader, Biochrom, Cambridge, UK) using a blank as a reference. Cytotoxicity was calculated as a percentage of the control (0 nM of PEPD, 100% of intact membranes).

##### 4.4. Cell Proliferation Assay

The effect of extracellular prolidase on proliferation capability and DNA biosynthesis in treated cells was assessed using the CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's guidelines. At the indicated times, the culture medium from treated cells was discarded, cells were washed with PBS, and plates were frozen. Then, samples were thawed at room temperature and lysed using CyQUANT dye mix, and total cellular nucleic acid was measured by fluorometer at 480/520 nm wavelengths (VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer, MA, USA). The results were calculated as a percent of the control value.

##### 4.5. Total Protein and Collagen Biosynthesis

The cells were cultured in 6-well plates at  $1 \times 10^6$  cells/well with 2 mL of growth medium. After 48 h, the cells were incubated with 5[ $^3$ H]-proline (5  $\mu$ Ci/mL; Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany) and prolidase (1–100 nM) for 24 or 48 h. Total protein biosynthesis and collagen biosynthesis were measured by the incorporation of radioactive proline into proteins. Then, collagen was subjected to digestion by purified *Clostridium histolyticum* collagenase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), according to the method of Peterkofsky et al. [53]. After isolation of proteins, the incorporation of tracer was measured

in total proteins and collagenase-digestible proteins. The results were shown as combined values for cell plus medium fractions.

#### 4.6. Western Blot

The cells, after incubation with PEPD (50–100 nM) for 40 min and 24 h (respectively), were washed and then incubated on ice for 15 min with a mixture of lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and a mix of protease inhibitors (Protease Inhibitors Mix G, SERVA, Heidelberg, Germany). Lysates were sonicated, centrifuged, and then the supernatant was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until Western blot assay. The total concentration of protein was measured by the method of Lowry et al. [54]. The procedure of Western blot analysis was described previously [55]. Equal amounts (30  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ) of protein were diluted in lysis buffer. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE electrophoresis. After semi-dry transfer, membranes were blocked with non-fat dry milk in TBS-T. The membranes were incubated with primary antibodies (all from CST and in 1:1000 dilution; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) overnight, including anti-EGF Receptor, anti-phospho-EGF Receptor, anti-PI3 Kinase p85, anti-phospho-PI3 Kinase p85, anti-mTOR, anti-phospho-mTOR, anti-Integrin  $\beta 1$  Receptor, anti-IGF-1 Receptor  $\beta$ , anti-FAK, anti-phospho-FAK, anti-Grb2 (in 1:1000 dilution, Becton, Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-NF- $\kappa\beta$  p65, anti-p44/42 MAPK (ERK1/2), anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), anti-GAPDH. Then membranes were washed and incubated with anti-mouse or anti-rabbit HRP-linked secondary antibodies at concentration 1:7500 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Then, the membranes were incubated with Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent, (GE Healthcare Life Sciences, Helsinki, Finland) followed by an image capturing performed using the BioSpectrum Imaging System UVP (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK). The band intensity was measured by ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Western blot analysis was performed at least in triplicates.

#### 4.7. In Vitro Wound-Healing Assay

An analysis of cell migration was conducted using an in vitro wound-healing assay. Fibroblasts were cultured in six-well plates to confluency, then they were scratched with a sterile 200  $\mu\text{L}$  pipette tip. Before PEPD treatment, the cell monolayer was rinsed three times with PBS. The cells were treated with PEPD concentrations in the range 10–50 nM for 24 and 48 h. Image capture of cells (at least in triplicates) was made using an inverted optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan) every 24 h with a 40 $\times$  magnification to monitor the wound closure. The wound closure was counted by ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>) and calculated according to the following formula [56].

#### 4.8. Immunocytochemistry

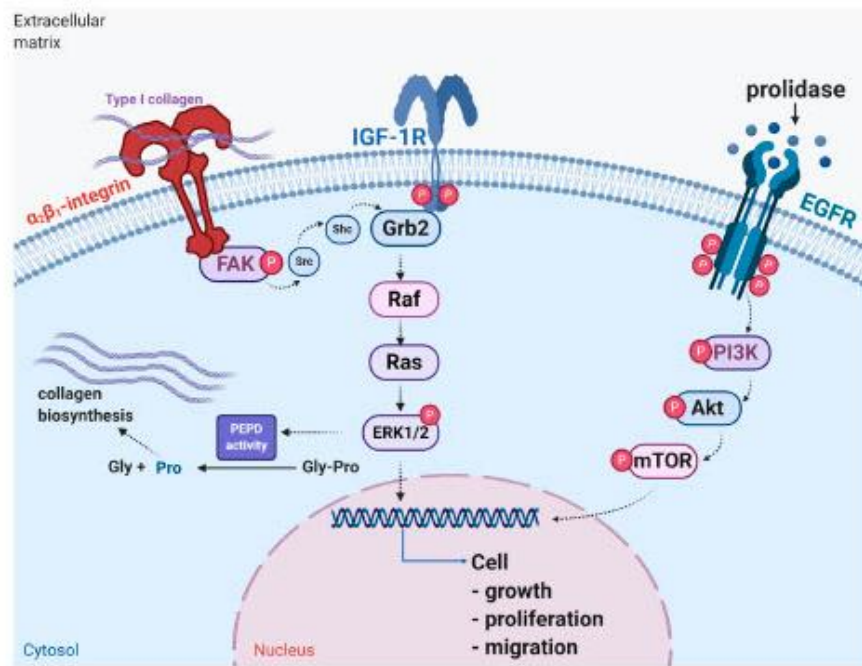
Immunocytochemistry was conducted according to BDB Bioimaging protocol, as described previously [55]. Cells grown on a 96-wells plate were fixed with paraformaldehyde, then permeabilized with Triton and blocked with 3% foetal bovine serum. Cells were incubated with primary antibodies (anti-phospho-EGFR and anti-phospho-mTOR, dilution 1:1000), then with FITC-linked secondary antibody and Hoechst. A confocal laser scanning microscope (BD Pathway 855 Bioimager; Becton, Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) with AttoVision software was used for image capture.

#### 4.9. Statistical Analysis

All experiments were run at least in triplicates and the experiments were repeated twice. Data represent a mean  $\pm$  standard deviation (SD). For statistical analysis, we used one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's correction and *t*-test using GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 5. Conclusions

In this report, we demonstrated results presenting that extracellular PEPD binding to EGFR accelerates wound healing in cultured fibroblasts. The potential mechanism is outlined in Figure 6. It suggests that PEPD may be considered as a therapeutic agent for skin wound healing.



**Figure 6.** Schematic representation of the functional significance of activation of EGFR, IGF-1R, and  $\beta_1$ -integrin receptor downstream signaling in wound healing. Under experimental conditions of mechanically “wounded” fibroblasts, PEPD activates EGFR-dependent downstream PI3K/Akt/mTOR signaling, while IGF-1R and  $\beta_1$ -integrin receptor cooperate to activate MAPK (ERK1/2) pathway resulting in increased cell proliferation, migration and collagen biosynthesis. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/2/942/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.P. and W.M.; data curation, M.M., W.B., and I.O.; funding acquisition, W.M.; investigation, M.M. and I.O.; methodology, M.M., W.B., and I.O.; visualization, M.M., W.B., and I.O.; writing—original draft, W.B., and I.O.; writing—review and editing, J.P. and W.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Centre of Science, Poland, grant no. 2017/25/B/NZ7/02650. The publication was written during doctoral studies under project no. POWR.03.02.00-00-I051/16 co-funded from the European Union funds, Operational Programme Knowledge Education Development for the years 2014–2020.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Abbreviations

Akt	protein kinase B
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERBB	family of proteins contains four receptor tyrosine kinases
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAK	focal adhesion kinase pp125 <sup>FAK</sup>
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
HER 2	epidermal growth factor receptor 2
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IGF-1R	insulin-like growth factor 1 receptor
JAK	Janus kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa beta
p53	tumor protein p53
PD	prolidase deficiency
PDGF	platelet-derived growth factor
PEPD	prolidase
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
Pro	proline
Shc	SHC adaptor protein 1
Sos1	son of sevenless 1
STAT	signal transducer and activator of transcription
Src	proto-oncogene Src

### References

- Leavitt, T.; Hu, M.S.; Marshall, C.D.; Barnes, L.A.; Lorenz, H.P.; Longaker, M.T. Scarless wound healing: Finding the right cells and signals. *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 483–493. [[CrossRef](#)]
- Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **2008**, *453*, 314–321. [[CrossRef](#)]
- Rose, L.F.; Chan, R.K. The Burn Wound Microenvironment. *Adv. Wound Care* **2016**, *5*, 106–118. [[CrossRef](#)]
- Palka, J.; Adelman-Grill, B.C.; Francz, P.I.; Bayreuther, K. Differentiation stage and cell cycle position determine the chemotactic response of fibroblasts. *Folia Histochem. Cytobiol.* **1996**, *34*, 121–127.
- Pierard, G.E.; Cornil, F.; Lapiere, C.M. Pathogenesis of ulcerations in deficiency of prolidase. The role of angiopathy and of deposits of amyloid. *Am. J. Dermatopathol.* **1984**, *6*, 491–497. [[CrossRef](#)]
- Yang, L.; Li, Y.; Ding, Y.; Choi, K.S.; Kazim, A.L.; Zhang, Y. Prolidase directly binds and activates epidermal growth factor receptor and stimulates downstream signaling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 2365–2375. [[CrossRef](#)]
- Yang, L.; Li, Y.; Bhattacharya, A.; Zhang, Y. PEPD is a pivotal regulator of p53 tumor suppressor. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2052. [[CrossRef](#)]
- Palka, J.A.; Phang, J.M. Prolidase activity in fibroblasts is regulated by interaction of extracellular matrix with cell surface integrin receptors. *J. Cell Biochem.* **1997**, *67*, 166–175. [[CrossRef](#)]
- Ivaska, J.; Reunanen, H.; Westermarck, J.; Koivisto, L.; Kähäri, V.M.; Heino, J. Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the  $\alpha$ 2 cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 401–416. [[CrossRef](#)]
- Endo, F.; Tanoue, A.; Nakai, H.; Hata, A.; Indo, Y.; Titani, K.; Matsuda, I. Primary structure and gene localization of human prolidase. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 4476–4481. [[CrossRef](#)]
- Zareba, I.; Palka, J. Prolidase-proline dehydrogenase/proline oxidase-collagen biosynthesis axis as a potential interface of apoptosis/autophagy. *BioFactors* **2016**, *42*, 341–348. [[CrossRef](#)]
- Donejko, M.; Przyłipiak, A.; Rysiak, E.; Miltky, W.; Galicka, E.; Przyłipiak, J.; Zareba, I.; Surazynski, A. Hyaluronic acid abrogates ethanol-dependent inhibition of collagen biosynthesis in cultured human fibroblasts. *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 6225–6233. [[CrossRef](#)]
- Namiduru, E.S. Prolidase. *Bratisl. Lek. Listy* **2016**, *117*, 480–485. [[CrossRef](#)]
- Miltky, W.; Karna, E.; Palka, J. Inhibition of prolidase activity by non-steroid antiinflammatory drugs in cultured human skin fibroblasts. *Pd. J. Pharmacol.* **1996**, *48*, 609–613.

15. Palka, J.A.; Miltyk, W.; Karna, E.; Wolczyński, S. Modulation of prolydase activity during in vitro aging of human skin fibroblasts the role of extracellular matrix collagen. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1996**, *21*, 207–213.
16. Karaszewski, J.; Zareba, I.; Guszczyn, T.; Datewicz, B.; Palka, J. Verapamil and collagenase differentially affect collagen metabolism in experimental model of Peyronie's disease. *Mol. Cell Probes* **2020**, *49*, 101488. [[CrossRef](#)]
17. Galicka, A.; Wolczyński, S.; Anchim, T.; Surazyński, A.; Lesniewicz, R.; Palka, J. Defects of type I procollagen metabolism correlated with decrease of prolydase activity in a case of lethal osteogenesis imperfecta. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2172–2178. [[CrossRef](#)]
18. Karna, E.; Surazynski, A.; Palka, J. Collagen metabolism disturbances are accompanied by an increase in prolydase activity in lung carcinoma planoepitheliale. *Int. J. Exp. Pathol.* **2000**, *81*, 341–347. [[CrossRef](#)]
19. Karna, E.; Surazynski, A.; Orłowski, K.; Łaskiewicz, J.; Puchalski, Z.; Nawrat, P.; Palka, J. Serum and tissue level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding proteins as an index of pancreatitis and pancreatic cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* **2002**, *83*, 239–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Cechowska-Pasko, M.; Palka, J.; Wojtkiewicz, M.Z. Enhanced prolydase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue. *Int. J. Exp. Pathol.* **2006**, *87*, 289–296. [[CrossRef](#)]
21. Arteaga, C.L.; Engelman, J.A. ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 282–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fan, P.; Abderrahman, B.; Chai, T.S.; Yerrum, S.; Jordan, V.C. Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma to Increase Estrogen-Induced Apoptosis in Estrogen-Deprived Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 2732–2745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yarden, Y.; Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 127–137. [[CrossRef](#)]
24. Misiura, M.; Miltyk, W. Proline-containing peptides—New insight and implications: A Review. *Biofactors* **2019**, *45*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wee, P.; Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* **2017**, *9*, 52. [[CrossRef](#)]
26. Hynes, N.E.; Lane, H.A. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 341–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lurje, G.; Lenz, H.J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* **2009**, *77*, 400–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Labat-Robert, J.; Robert, L. Interaction between cells and extracellular matrix: Signaling by integrins and the elastin-laminin receptor. *Prog. Mol. Subcell Biol.* **2000**, *25*, 57–70. [[PubMed](#)]
29. Ebi, H.; Corcoran, R.B.; Singh, A.; Chen, Z.; Song, Y.; Lifshits, E.; Ryan, D.P.; Meyerhardt, J.A.; Benes, C.; Settleman, J.; et al. Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4311–4321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Misiura, M.; Miltyk, W. Current Understanding of the Emerging Role of Prolidase in Cellular Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5906. [[CrossRef](#)]
31. Surazynski, A.; Liu, Y.; Miltyk, W.; Phang, J.M. Nitric oxide regulates prolydase activity by serine/threonine phosphorylation. *J. Cell Biochem.* **2005**, *96*, 1086–1094. [[CrossRef](#)]
32. Lee, S.H.; Zahoor, M.; Hwang, J.K.; Min, D.S.; Choi, K.Y. Valproic acid induces cutaneous wound healing in vivo and enhances keratinocyte motility. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48791. [[CrossRef](#)]
33. Juliano, R.L.; Haskill, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 577–585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Surazynski, A.; Miltyk, W.; Palka, J.; Phang, J.M. Prolidase-dependent regulation of collagen biosynthesis. *Amino Acids* **2008**, *35*, 731–738. [[CrossRef](#)]
35. Guszczyn, T.; Surazyński, A.; Zareba, I.; Rysiak, E.; Popko, J.; Palka, J. Differential effect of platelet-rich plasma fractions on  $\beta$ 1-integrin signaling, collagen biosynthesis, and prolydase activity in human skin fibroblasts. *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**, *11*, 1849–1857. [[CrossRef](#)]
36. Rippe, R.A.; Schrum, L.W.; Stefanovic, B.; Solís-Herruzo, J.A.; Brenner, D.A. NF-kappaB inhibits expression of the alpha1(I) collagen gene. *DNA Cell Biol.* **1999**, *18*, 751–761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kouba, D.J.; Chung, K.Y.; Nishiyama, T.; Vindevoghel, L.; Kon, A.; Klement, J.F.; Uitto, J.; Mauviel, A. Nuclear factor-kappa B mediates TNF-alpha inhibitory effect on alpha 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 4226–4234.
38. Miltyk, W.; Karna, E.; Palka, J.A. Prolidase-independent mechanism of camptothecin-induced inhibition of collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *J. Biochem.* **2007**, *141*, 287–292. [[CrossRef](#)]
39. Sen, S.; Basak, P.; Prasad Sinha, B.; Maurye, P.; Kumar Jaiswal, K.; Das, P.; Kumar Mandal, T. Anti-inflammatory effect of epidermal growth factor conjugated silk fibroin immobilized polyurethane ameliorates diabetic burn wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *143*, 1009–1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Liu, L.; Song, S.; Zhang, Y.P.; Wang, D.; Zhou, Z.; Chen, Y.; Jin, X.; Hu, C.F.; Shen, C.X. Amphiregulin promotes cardiac fibrosis post myocardial infarction by inducing the endothelial-mesenchymal transition via the EGFR pathway in endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **2020**, *390*, 111950. [[CrossRef](#)]
41. Overstreet, J.M.; Wang, Y.; Wang, X.; Niu, A.; Gewin, L.S.; Yao, B.; Harris, R.C.; Zhang, M.Z. Selective activation of epidermal growth factor receptor in renal proximal tubule induces tubulointerstitial fibrosis. *FASEB J.* **2017**, *31*, 4407–4421. [[CrossRef](#)]

42. Freij, B.J.; Levy, H.L.; Dudin, G.; Mutasim, D.; Deeb, M.; Der Kaloustian, V.M. Clinical and biochemical characteristics of prolidase deficiency in siblings. *Am. J. Med. Genet.* **1984**, *19*, 561–571. [[CrossRef](#)]
43. Goodman, S.I.; Solomons, C.C.; Muschenheim, F.; McIntyre, C.A.; Miles, B.; O'Brien, D. A syndrome resembling lathyrism associated with iminodipeptiduria. *Am. J. Med.* **1968**, *45*, 152–159. [[CrossRef](#)]
44. Powell, G.F.; Maniscalco, R.M. Bound hydroxyproline excretion following gelatin loading in prolidase deficiency. *Metabolism* **1976**, *25*, 503–508. [[CrossRef](#)]
45. Isemura, M.; Hanyu, T.; Gejyo, F.; Nakazawa, R.; Igarashi, R.; Matsuo, S.; Ikeda, K.; Sato, Y. Prolidase deficiency with imidodipeptiduria. A familial case with and without clinical symptoms. *Clin. Chim. Acta* **1979**, *93*, 401–407. [[CrossRef](#)]
46. Sriver, C.R. Glycyl-Proline in Urine of Humans with Bone Disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1964**, *42*, 357–364. [[CrossRef](#)]
47. Umemura, S. Studies on a patient with iminodipeptiduria. II. Lack of prolidase activity in blood cells. *Physiol. Chem. Phys.* **1978**, *10*, 279–283.
48. Endo, F.; Matsuda, I. Molecular basis of prolidase (peptidase D) deficiency. *Mol. Biol. Med.* **1991**, *8*, 117–127.
49. Ledoux, P.; Sriver, C.R.; Hechtman, P. Expression and molecular analysis of mutations in prolidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, *59*, 1035–1039.
50. Lupi, A.; Rossi, A.; Campari, E.; Pecora, F.; Lund, A.M.; Elcioglu, N.H.; Gultepe, M.; Di Rocco, M.; Cetta, G.; Forlino, A. Molecular characterisation of six patients with prolidase deficiency: Identification of the first small duplication in the prolidase gene and of a mutation generating symptomatic and asymptomatic outcomes within the same family. *J. Med. Genet.* **2006**, *43*, e58. [[CrossRef](#)]
51. Kitchener, R.L.; Grunden, A.M. Prolidase function in proline metabolism and its medical and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 233–247. [[CrossRef](#)]
52. Borenfreund, E.; Puerner, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* **1985**, *24*, 119–124. [[CrossRef](#)]
53. Peterkofsky, B.; Diegelmann, R. Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* **1971**, *10*, 988–994. [[CrossRef](#)]
54. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)]
55. Załęba, I.; Surazynski, A.; Chrusciel, M.; Milyk, W.; Doroszko, M.; Rahman, N.; Palka, J. Functional Consequences of Intracellular Proline Levels Manipulation Affecting PRODH/POX-Dependent Pro-Apoptotic Pathways in a Novel in Vitro Cell Culture Model. *Cell Physiol. Biochem.* **2017**, *43*, 670–684. [[CrossRef](#)]
56. Misiura, M.; Baszanowska, W.; Ościłowska, I.; Palka, J.; Milyk, W. Prolidase Stimulates Proliferation and Migration through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Human Keratinocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9243. [[CrossRef](#)]



## **11.2. Material uzupełniający - publikacja I**

**Do publikacji I.**, „Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta$ 1-integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts”.

International Journal of Molecular Sciences. 2021; 21, 5906.

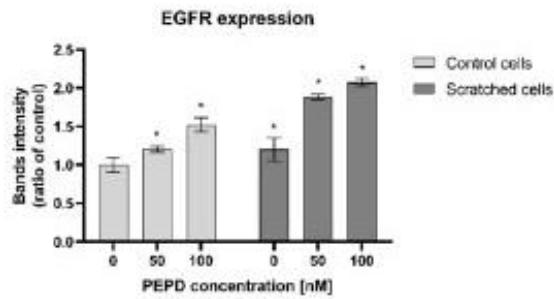
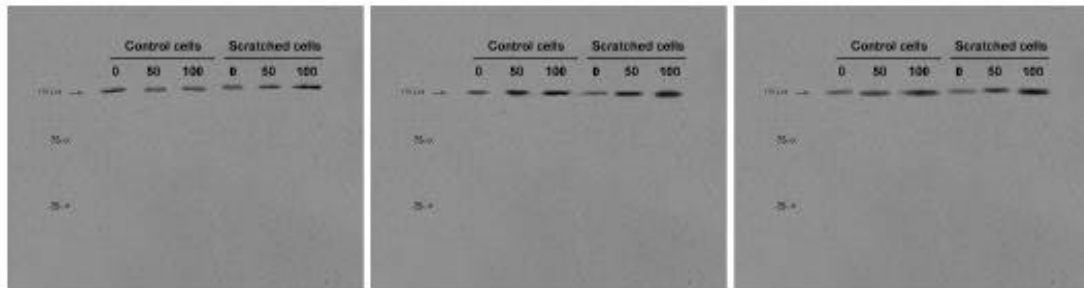
<https://doi.org/10.3390/ijms22020942>. IF: 6.208, MEiN: 140 punktów.

File name: Additional file 1

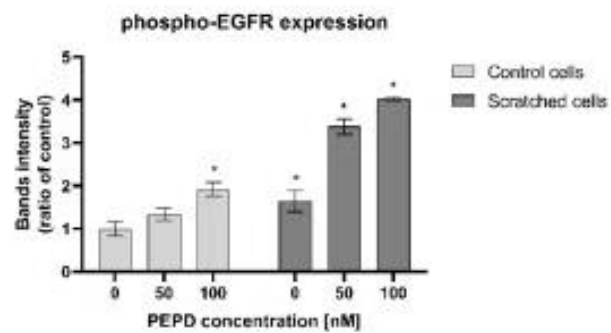
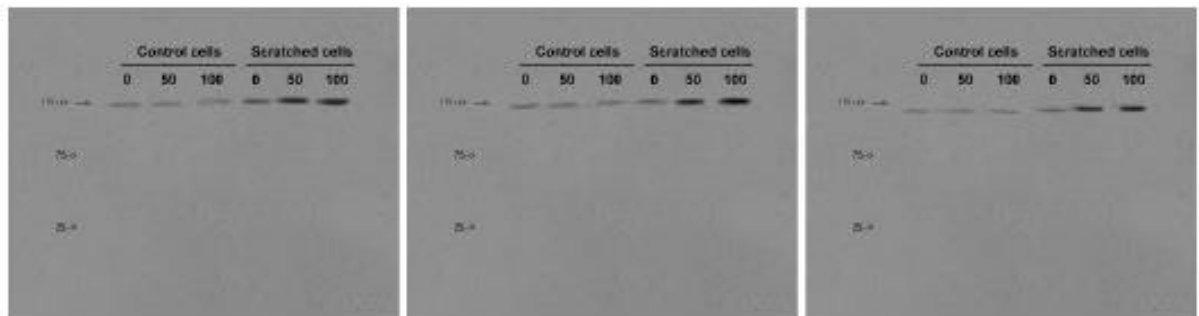
Title of data: Supplementary data analysis presented on Figure 3 and Figure 4.

Description of data: The blots and images are described in the result section. SFig. 1. - Supplementary data analysis presented on Figure 3. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 3A.

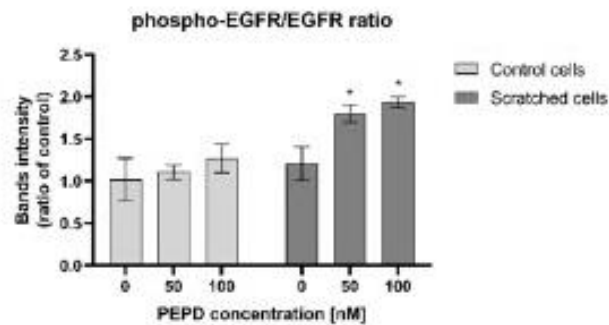
### 1.1.1. EGFR expression and its intensity



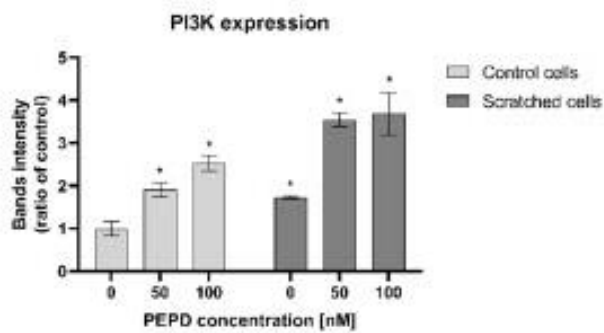
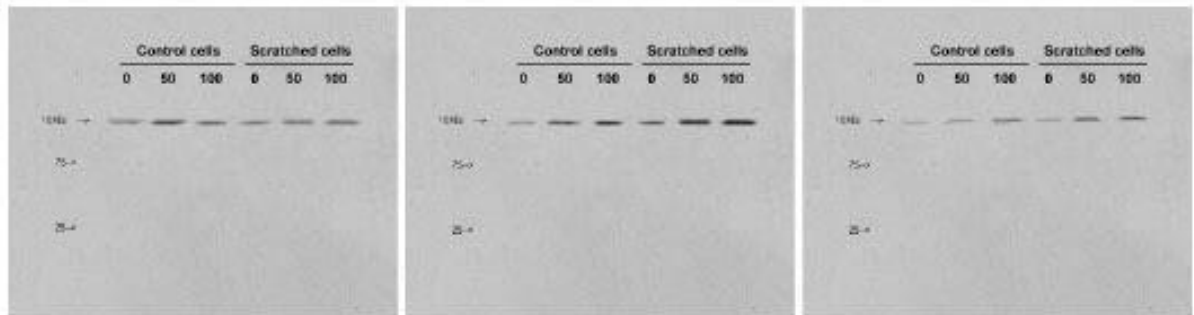
### 1.1.2. Phospho-EGFR expression and its intensity



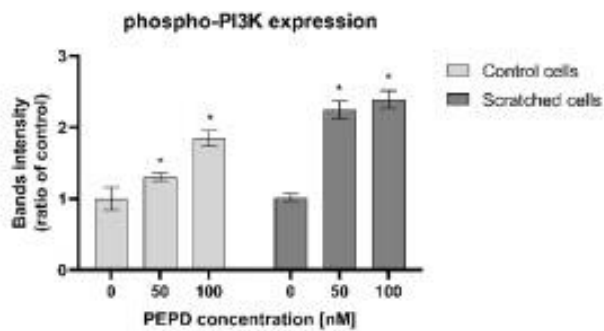
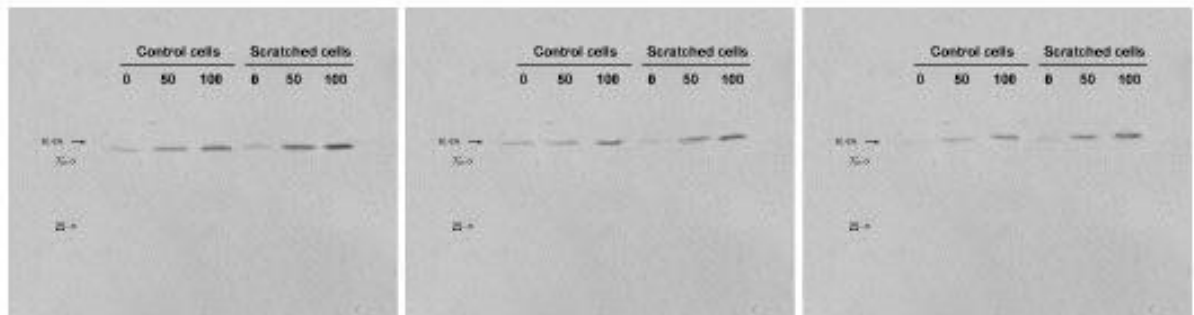
### 1.1.3. Ratio of phosphor-EGFR/EGFR expression



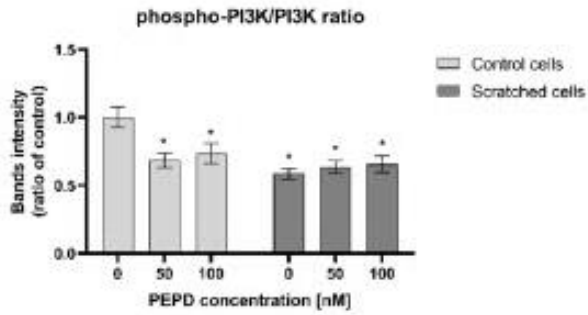
### 1.1.4. PI3K expression and its intensity



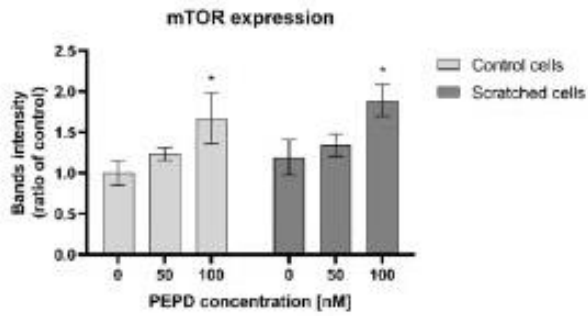
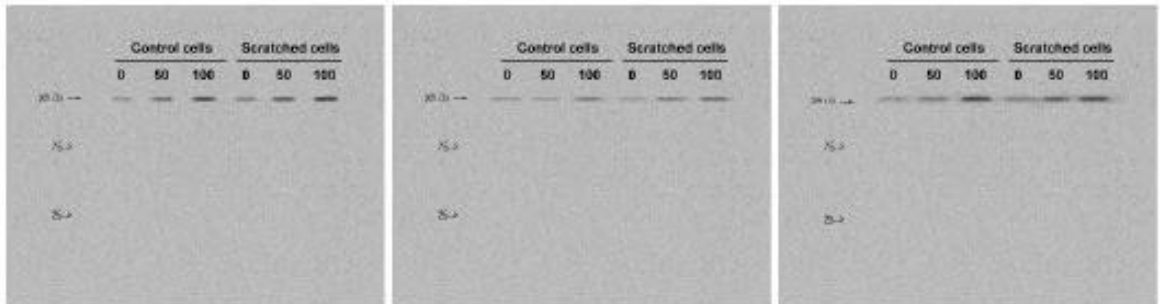
### 1.1.5. Phospho-PI3K expression and its intensity



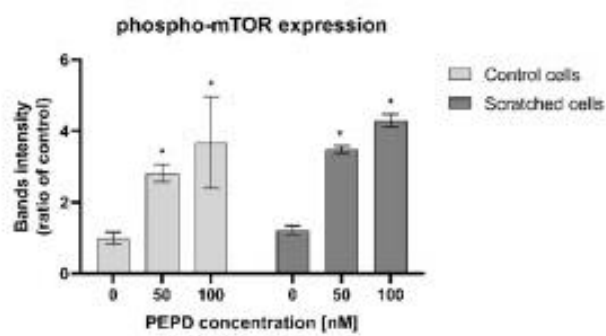
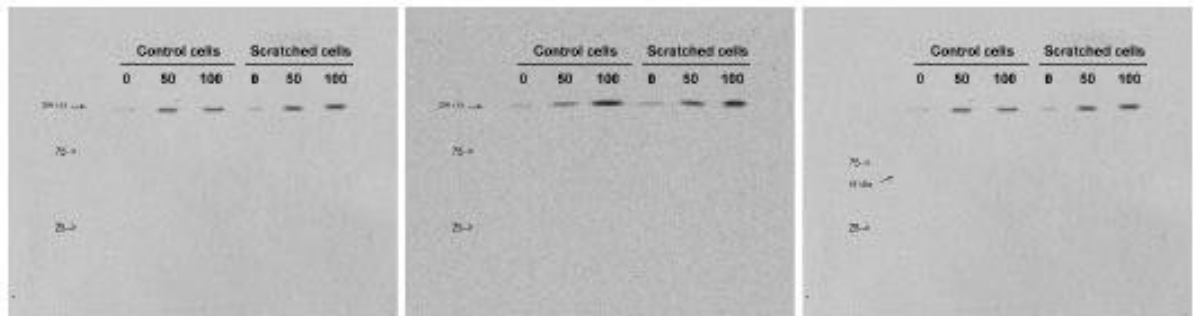
### 1.1.6. Ratio of phospho-PI3K/PI3K expression



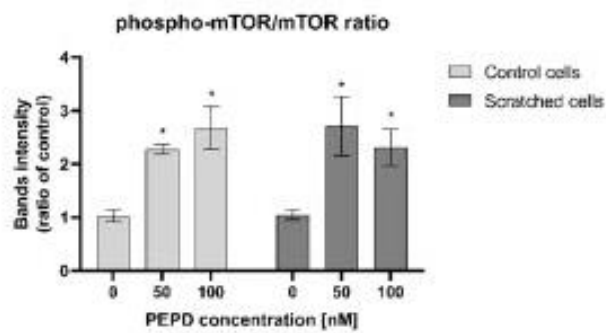
### 1.1.7. mTOR expression and its intensity



### 1.1.8. Phospho-mTOR expression and its intensity

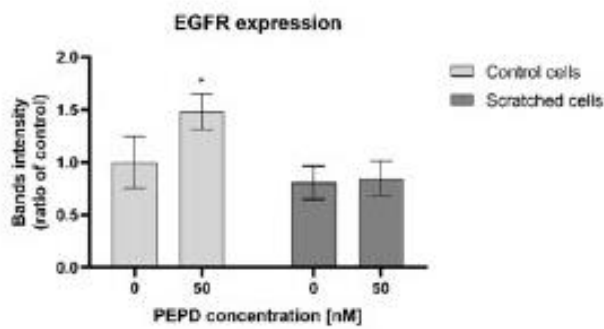


### 1.1.9. Ratio of phospho-mTOR/mTOR expression

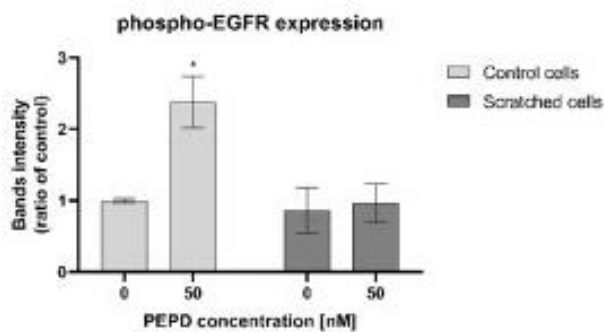


## 1.2. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 3B

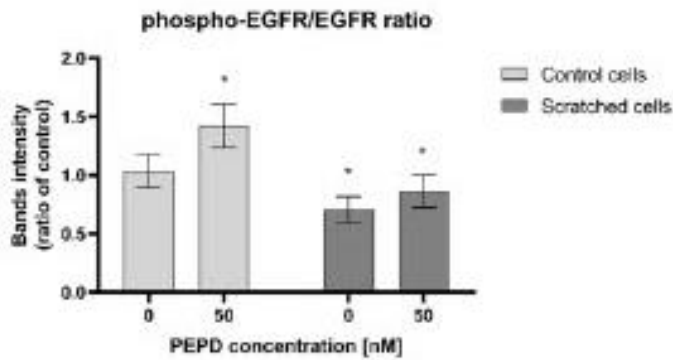
### 1.2.1. EGFR expression and its intensity



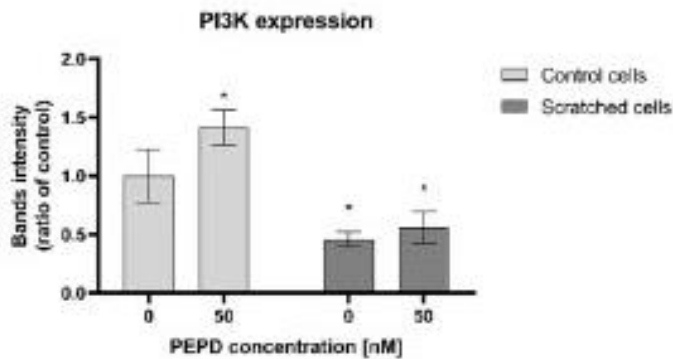
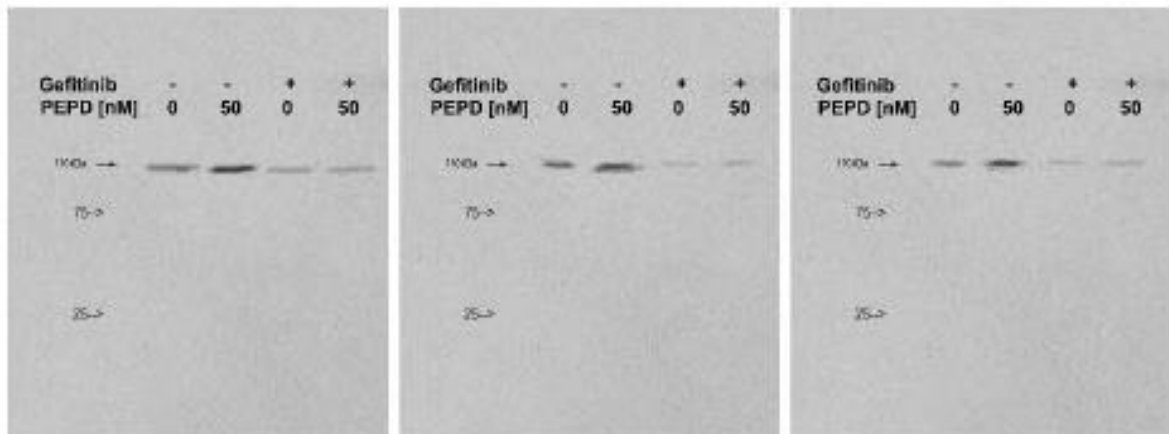
### 1.2.2. Phospho-EGFR expression and its intensity



### 1.2.3. Ratio of phospho-EGFR/EGFR expression

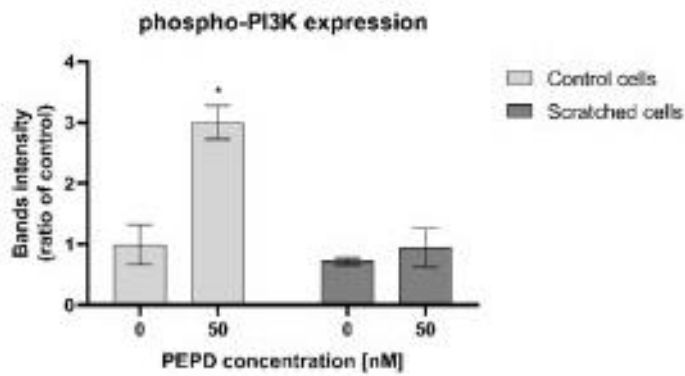
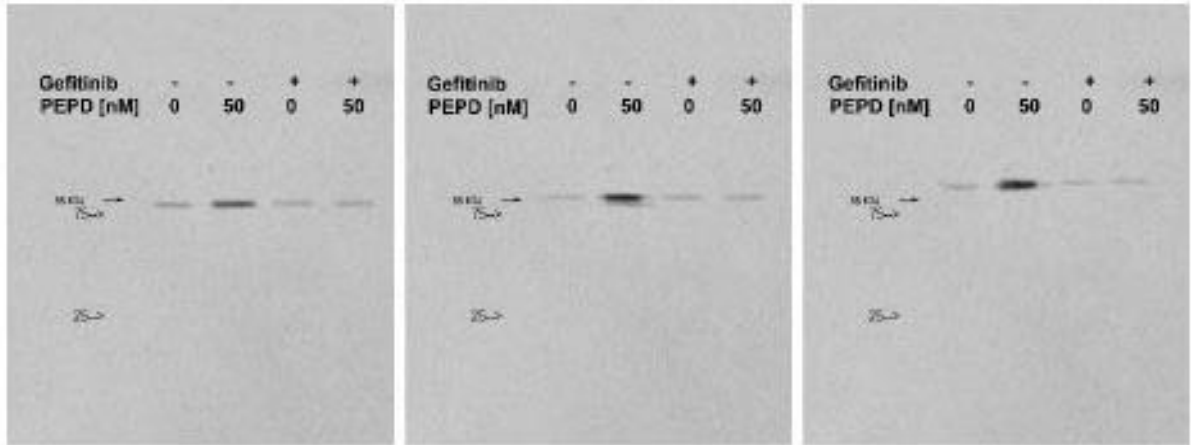


### 1.2.4. PI3K expression and its intensity

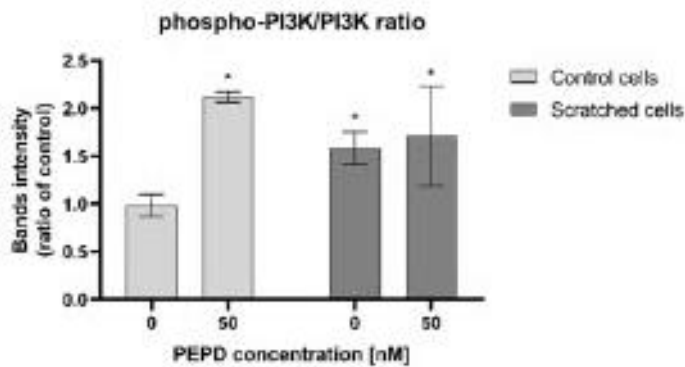




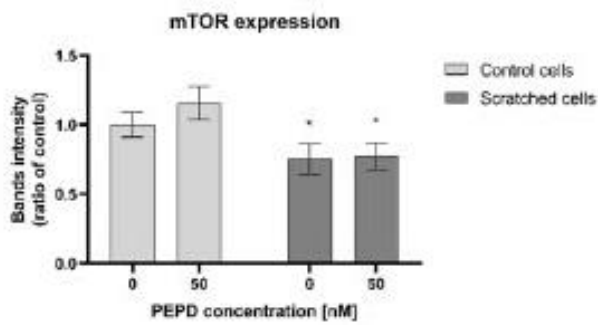
### 1.2.5. Phospho-PI3K expression and its intensity



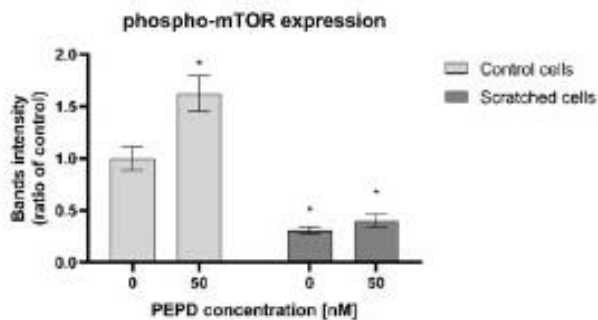
### 1.2.6. Ratio of phospho-PI3K/PI3K expression



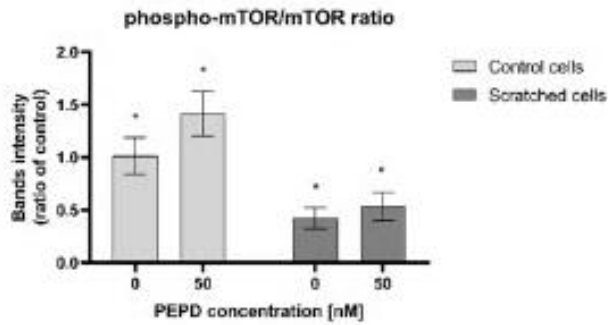
### 1.2.7. mTOR expression and its intensity



### 1.2.8. Phospho-mTOR expression and its intensity



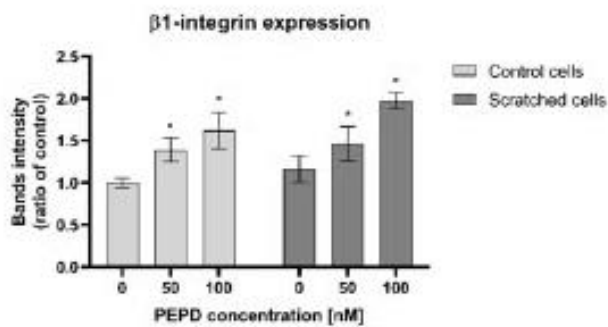
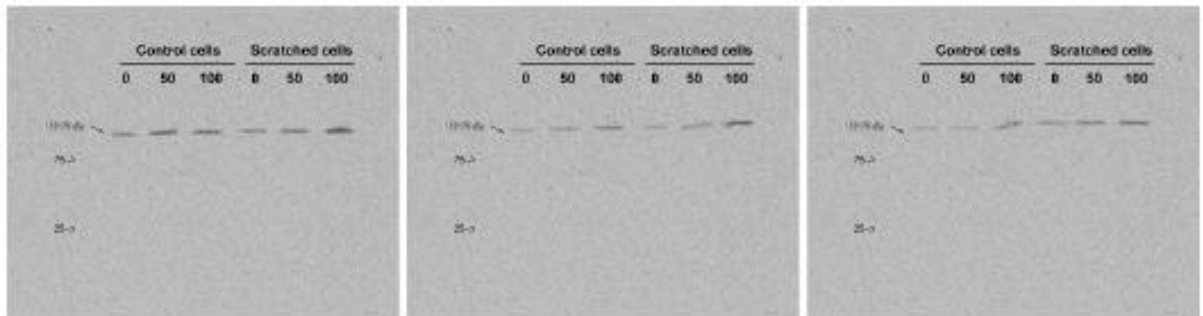
### 1.2.9. Ratio of phospho-mTOR/mTOR expression



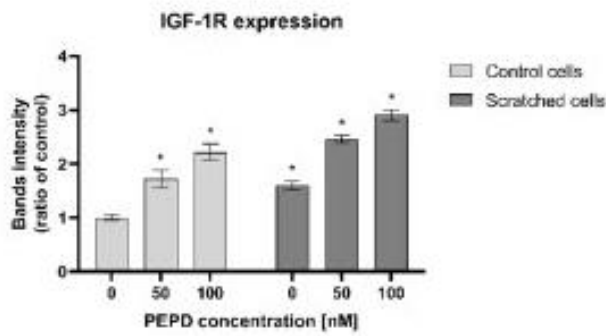
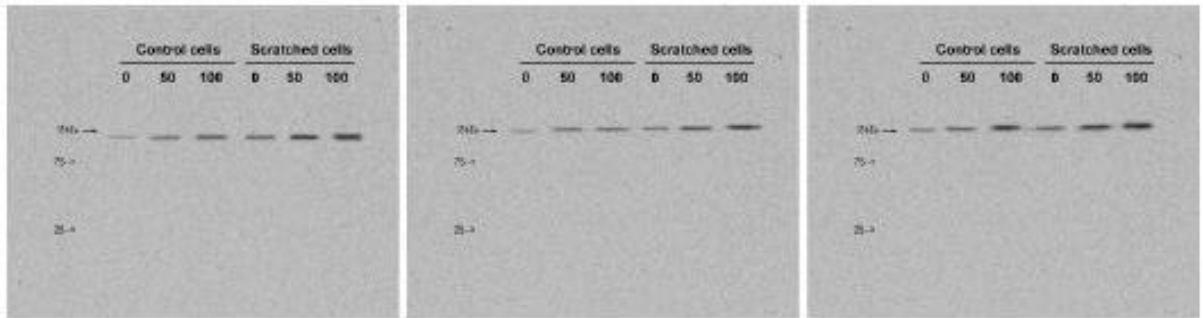
## 2. SFig.2. - Supplementary data analysis presented on Figure 4

### 2.1. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 4A

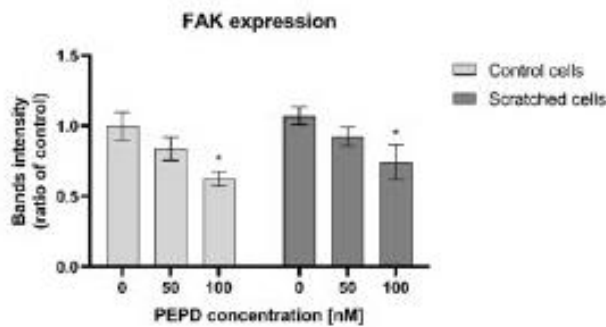
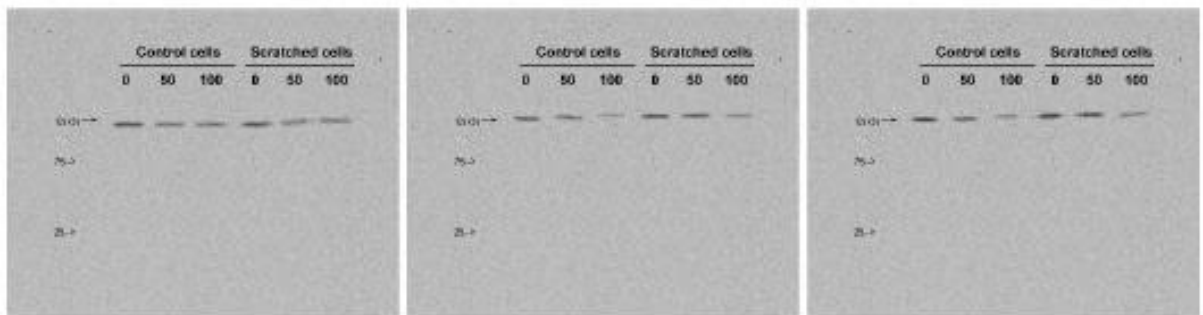
#### 2.1.1. B1-integrin expression and its intensity



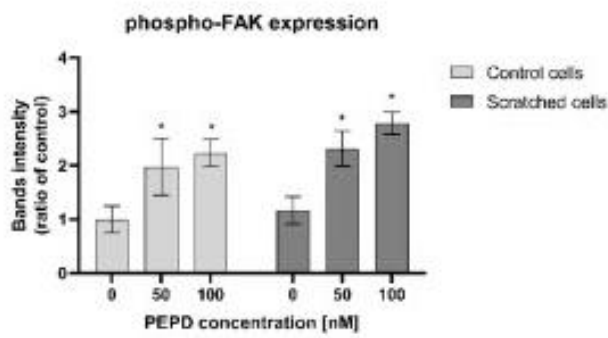
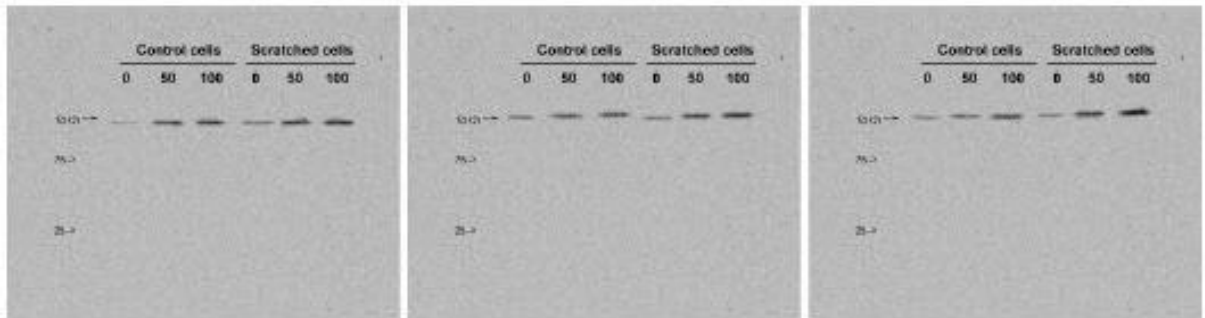
### 2.1.2. IGF-1R expression and its intensity



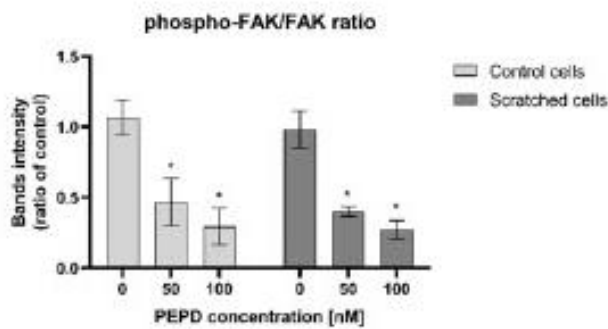
### 2.1.3. FAK expression and its intensity



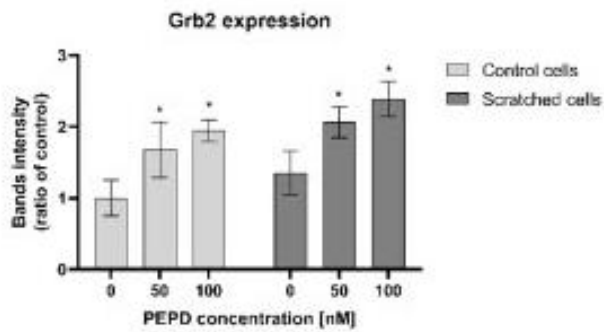
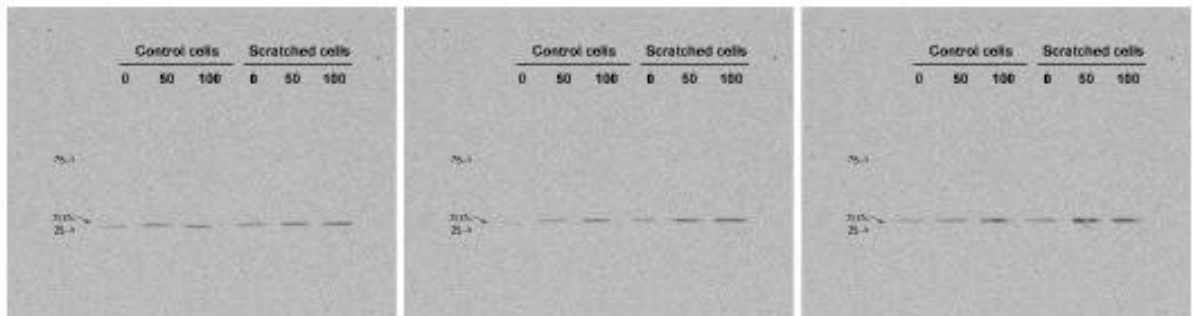
#### 2.1.4. Phospho-FAK expression and its intensity



#### 2.1.5. Ratio of phospho-FAK/FAK expression

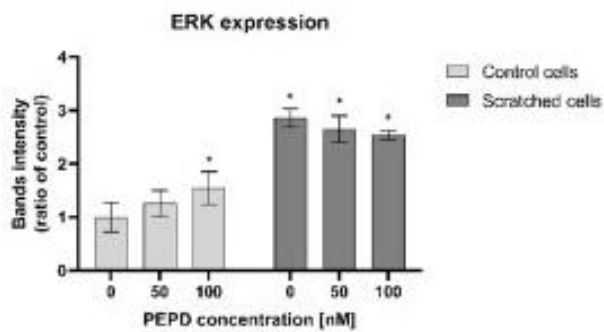
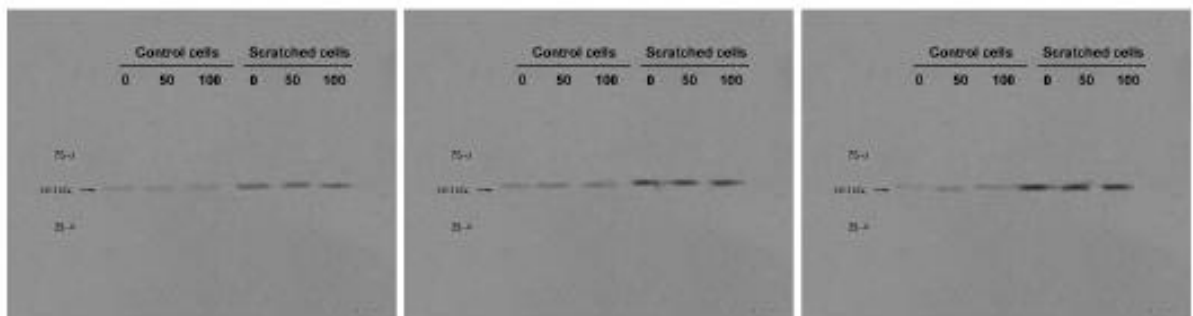


### 2.1.6. Grb2 expression and its intensity

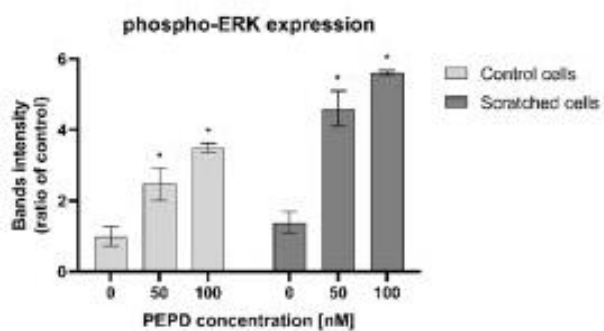
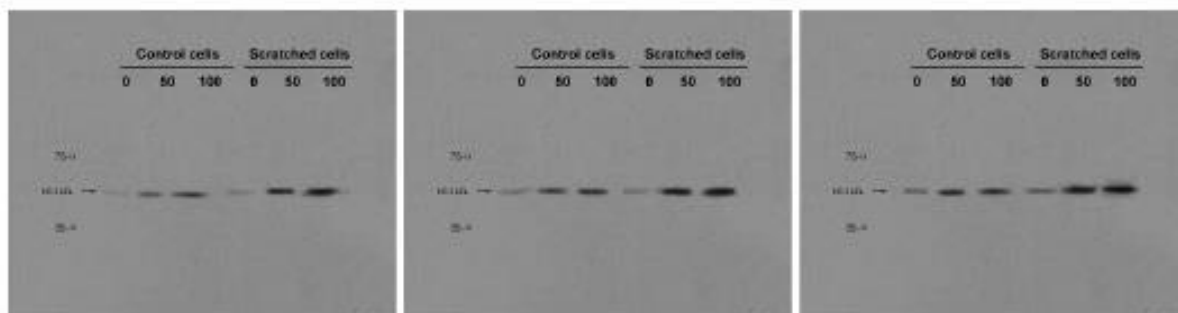


## 2.2. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 4C

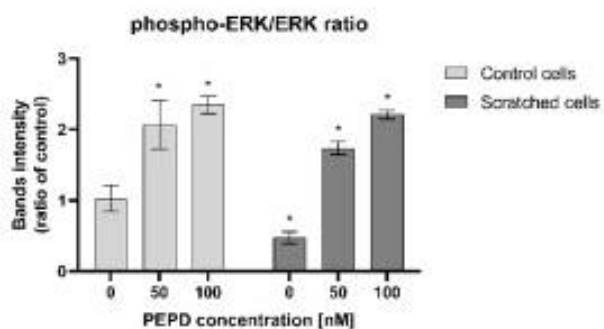
### 2.2.1. ERK expression and its intensity



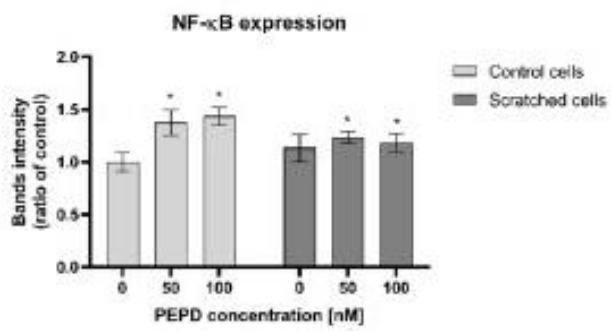
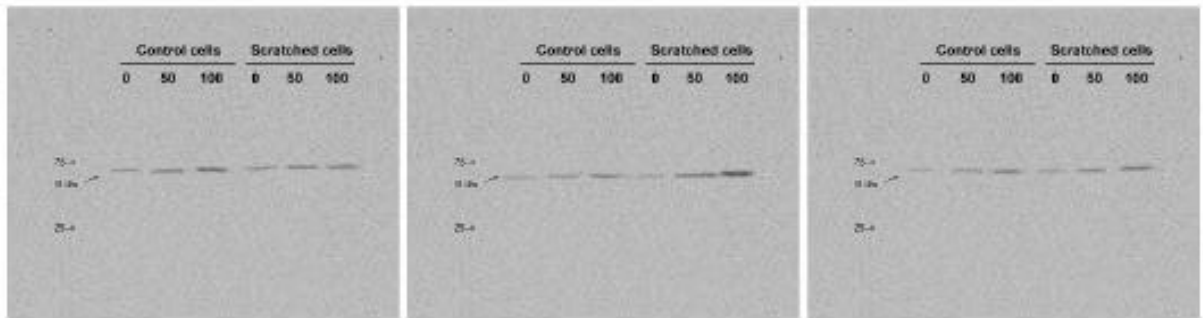
## 2.2.2. Phospho-ERK expression and its intensity



## 2.2.3. Ratio of phospho-ERK/ERK expression

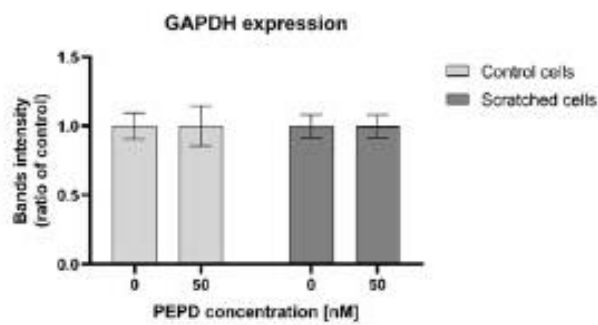
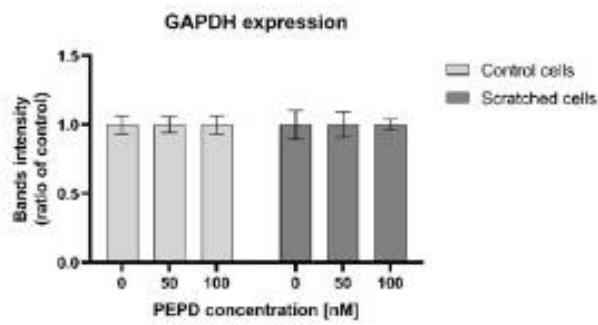
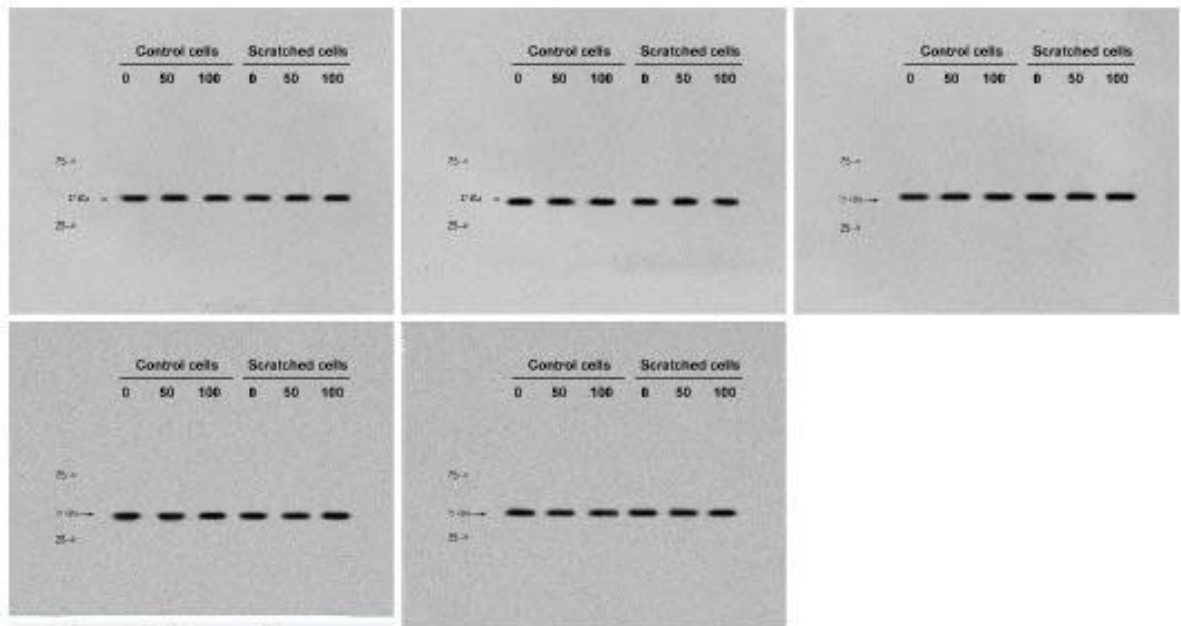


## 2.2.4. NF- $\kappa$ B expression and its intensity





### 2.3.Representative blots of GAPDH from Western blotting analysis







**11.3. Publikacja II.** „Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts”.

Molecules 2023, 28, 851.

<https://doi.org/10.3390/molecules28020851>. IF: 4.927, MEiN: 140 punktów.

Article

# Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts

Weronika Baszanowska <sup>1</sup> , Magdalena Nizioł <sup>2</sup>, Iłona Oscilowska <sup>1</sup> , Justyna Czyrko-Horczak <sup>3</sup>, Wojciech Miłtyk <sup>2</sup>  and Jerzy Palka <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Medicinal Chemistry, Medical University of Białystok, Kilinskiego 1, 15-089 Białystok, Poland

<sup>2</sup> Department of Analysis and Bioanalysis of Medicines, Medical University of Białystok, Kilinskiego 1, 15-089 Białystok, Poland

<sup>3</sup> Department of Structural Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Białystok, Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok, Poland

\* Correspondence: pal@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-748-5706

**Abstract:** The potential of recombinant human prolidase (rhPEPD) to induce wound healing in an experimental model of IL-1 $\beta$ -induced inflammation in human fibroblasts was studied. It was found that rhPEPD significantly increased cell proliferation and viability, as well as the expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream signaling proteins, such as phosphorylated PI3K, AKT, and mTOR, in the studied model. Moreover, rhPEPD upregulated the expression of the  $\beta$ 1 integrin receptor and its downstream signaling proteins, such as p-FAK, Grb2 and p-ERK 1/2. The inhibition of EGFR signaling by gefitinib abolished rhPEPD-dependent functions in an experimental model of inflammation. Subsequent studies showed that rhPEPD augmented collagen biosynthesis in IL-1 $\beta$ -treated fibroblasts as well as in a wound healing model (wound closure/scratch test). Although IL-1 $\beta$  treatment of fibroblasts increased cell migration, rhPEPD significantly enhanced this process. This effect was accompanied by an increase in the activity of MMP-2 and MMP-9, suggesting extracellular matrix (ECM) remodeling during the inflammatory process. The data suggest that rhPEPD may play an important role in EGFR-dependent cell growth in an experimental model of inflammation in human fibroblasts, and this knowledge may be useful for further approaches to the treatment of abnormalities of wound healing and other skin diseases.

**Keywords:** prolidase; epidermal growth factor receptor; fibroblasts; interleukin 1 $\beta$ ; wound healing;  $\beta$ 1-integrin



Citation: Baszanowska, W.; Nizioł, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horczak, J.; Miłtyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. *Molecules* **2023**, *28*, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>

Academic Editor: Ying-Jie Zhu

Received: 14 December 2022

Revised: 31 December 2022

Accepted: 8 January 2023

Published: 14 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Prolidase (PEPD), an imidodi- or imidotri-peptidase [EC.3.4.13.9], is an enzyme with a dual mechanism of biological activity. In the cytoplasm, this enzyme is essential for the proteolysis of di- and tripeptides containing proline or hydroxyproline at the C-terminal position [1,2]. The released proline is reused for protein synthesis, particularly for collagen and amino acid metabolism. The intracellular function of prolidase is of great importance in the dermis, the tissue abundant in collagen. The activity of prolidase in the dermis is reflected by its activity in the skin cells, mainly fibroblasts and keratinocytes. However, during aging, the activity of prolidase decreases [3]. The mechanism for this phenomenon has not yet been established. Extracellularly, PEPD was found recently as a ligand of epidermal growth factor receptor (EGFR) stimulating cell growth and proliferation [4]. Interestingly, for the stimulation of EGFR-dependent signaling, PEPD does not require enzymatic activity. The PEPD-dependent activation of EGFR signaling could be of particular interest in wound healing since clinical symptoms of PEPD deficiency (PD) are characterized by skin lesions such as progressive ulcerative dermatitis [5–11]. In our recent study, we have focused on

the role of PEPD in wound healing as an approach to understanding the mechanism of its dual action, intracellular and extracellular. We have found that the PEPD of platelet-rich plasma (PRP) plays an important role in the stimulation of the wound healing process in keratinocytes [12]. The mechanism of this phenomenon has been attributed to the PEPD-dependent activation of EGFR and downstream signalling proteins [13]. The results of these studies were confirmed in an experimental model of wound healing in fibroblasts using porcine PEPD [14] and in experimental inflammation in keratinocytes using recombinant human rhPEPD [15]. These results suggest that PEPD is especially effective in wound healing in conditions of inflammation.

Wound healing is a multistep process in which several different cell types [16], as well as growth factors and extracellular matrix proteins (ECM) [17], are engaged in order to restore tissue integrity [18]. Four stages of wound healing (homeostasis, inflammation, proliferation, and remodeling) are required to restore the integrity of damaged tissue. The homeostasis phase is characterized by blood clots activating thrombocytes to stimulate the production of neutrophils and macrophages that release the growth factors required for fibroblast recruitment. During the inflammatory phase, transcription factors are translocated to the nucleus, leading to the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-6 [19]. During the proliferation and remodeling phases, fibroblasts are activated by growth factors, such as EGF, PDGF, IGF-1 [20]. Fibroblasts are the most common type of connective tissue cells involved in the proliferative phase of wound healing and the production of collagen for scar formation [16,21].

The activation of EGFR, also known as ErbB, by PEPD is of great importance since EGFR signaling shows a strong anabolic effect reflected by the stimulation of the proliferation, migration, growth and differentiation of cells [22]. Interactions between ligands and EGFR leads to EGFR dimerization and receptor autophosphorylation initiating a signaling phosphorylation cascade of proteins, including phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/rapamycin mammalian target (mTOR) [23], and, subsequently, Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Janus kinase (JAK)/transcriptional and activator (STAT) pathways [24]. The pathway transmits signals to the nucleus via transcription factors inducing the expression of genes involved in the regulation of cell growth, metabolism and differentiation [25]. The signaling pathways are linked to the adhesion receptors as integrin receptors, which are particularly abundant in fibroblasts and keratinocytes. The signaling induced by the  $\beta$ 1 integrin receptor was found to stimulate PEPD activity [26] as well as collagen biosynthesis [27]. The activation of the  $\beta$ 1 integrin receptor is followed by autophosphorylation of the specific pp125FAK non-receptor focal adhesion kinase (FAK). This kinase is able to interact with growth factor receptor-related protein 2 (Grb2) via the proto-oncogene proteins Src and Shc. The downstream signaling cascade includes the son of sevenless 1 (Sos1) and the proteins Ras and Raf, followed by two mitogen-activated protein kinases (MAP): ERK1 and ERK2 [28,29]. This signaling pathway is further enhanced by EGFR signaling [20]. This integrin  $\beta$ 1 signaling pathway is known to regulate PEPD activity and collagen biosynthesis [26,27,30].

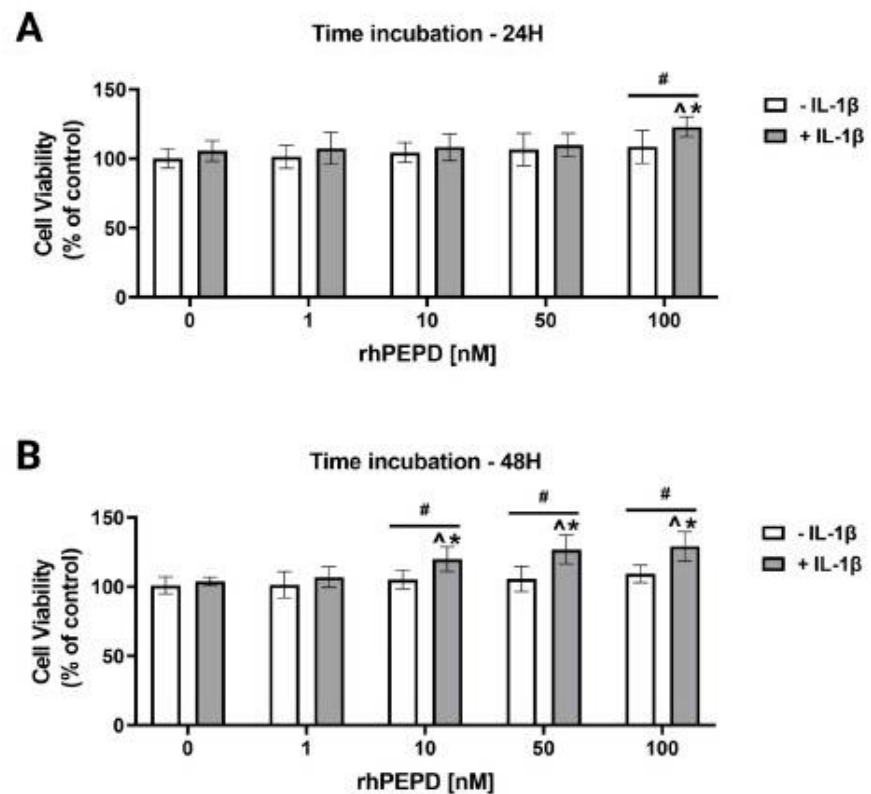
The aim of the present study is to establish the effect of recombinant human prolidase (rhPEPD) on wound healing in an experimental model of inflammation in human skin fibroblasts. This study also aims to establish the role of EGFR downstream signaling in this process. The approach to establishing the mechanism of rhPEPD-dependent wound healing involves the measurement of cell proliferation, collagen biosynthesis, the activity of some metalloproteinases, the expression of EGFR and  $\beta$ 1 integrin receptor signalling proteins, and the migratory potential of fibroblasts.

## 2. Results

### 2.1. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Increase in Cell Viability in Experimental Model of Inflammation in Fibroblasts

The effect of rhPEPD on cell viability was studied in an experimental model of inflammation induced by IL-1 $\beta$  in cultured fibroblasts. Treatment of the cells with inflammatory

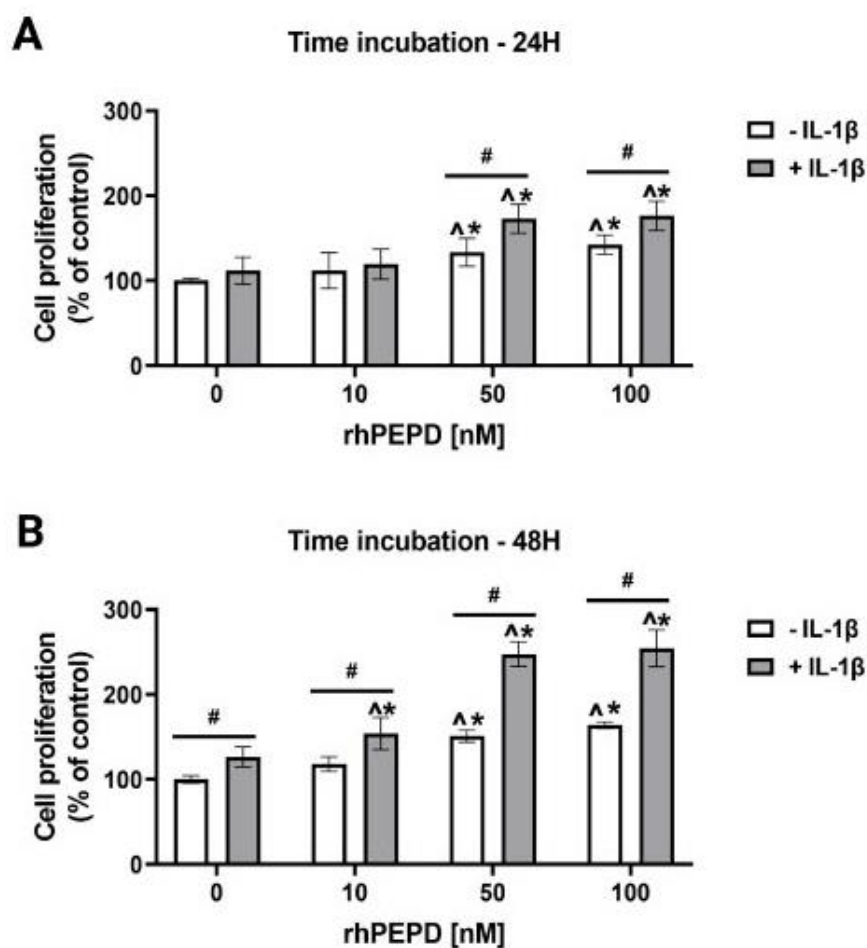
cytokine IL-1 $\beta$  is a commonly accepted experimental model of inflammation [31–34]. Cell viability was evaluated by an MTT assay. It was found that rhPEPD at the studied concentrations did not affect cell viability after 24 and 48 h of incubation (Figure 1A,B). However, in the presence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL), rhPEPD significantly increased cell viability at a concentration of 100 nM during 24 h of incubation (Figure 1A) and at concentrations of 10, 50 and 100 nM during 48 h of incubation (Figure 1B). The data were corroborated by a CellTiter-Blue Cell Viability assay (Supplementary Materials, Figure S30).



**Figure 1.** The effect of rhPEPD on cell viability in experimental model of inflammation induced by IL-1 $\beta$  in fibroblasts. Cells were treated with various concentrations of rhPEPD in the absence or presence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) for 24 h (A) and 48 h (B), followed by MTT assay. The mean values  $\pm$  S.D. of three experiments carried out in duplicate are presented. The results are significant at  $p < 0.05$ , represented by  $\wedge$ ,  $*$ , and  $\#$ ;  $\wedge$  indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$ ),  $*$  indicates significance vs. control (0 nM of PEPD with IL-1 $\beta$ ), and  $\#$  indicates significance between groups treated with and without IL-1 $\beta$ .

## 2.2. IL-1 $\beta$ Augments rhPEPD-Stimulated Fibroblast Proliferation

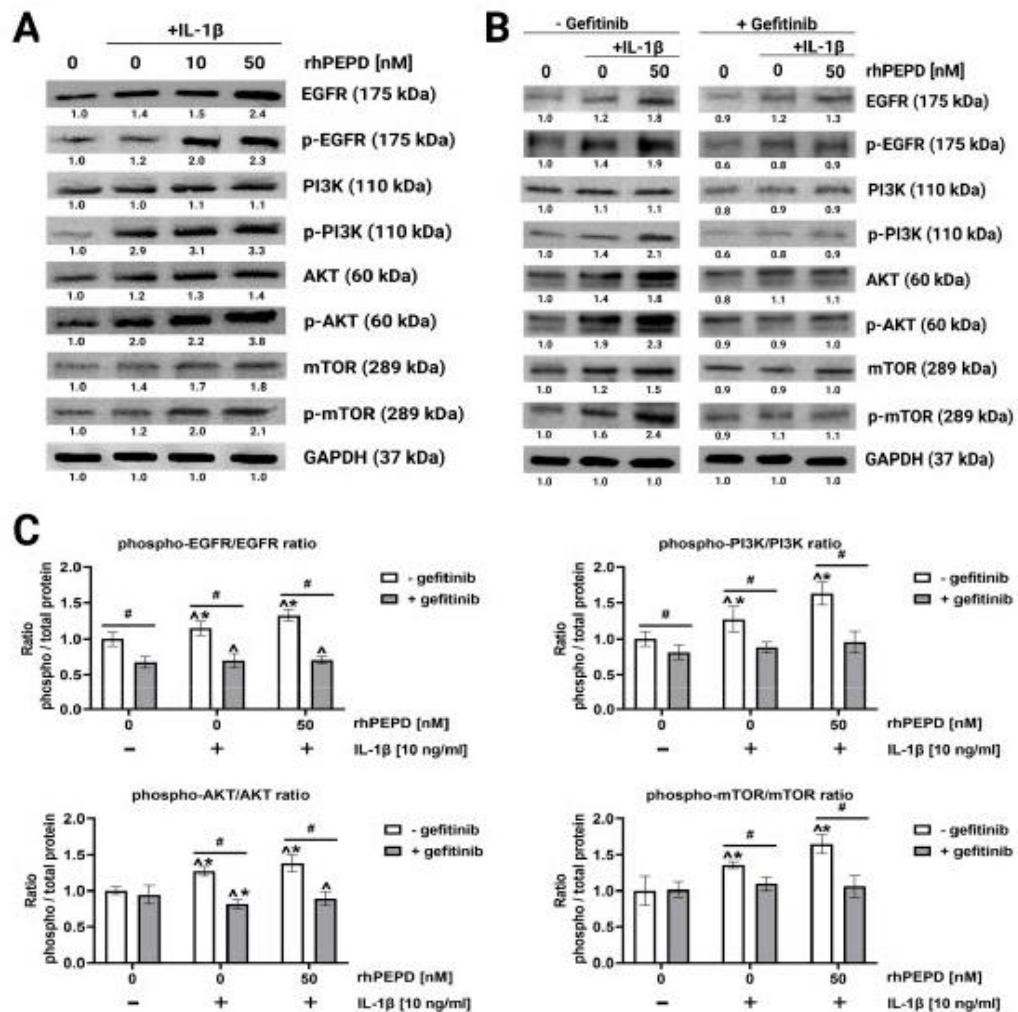
The effect of rhPEPD on cell proliferation was measured by fluorimetry. Fibroblasts were treated with different concentrations of rhPEPD (0, 10, 50, 100 nM) in the presence or absence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) for 24 and 48 h. The treatment of fibroblasts with rhPEPD at concentrations of 50 and 100 nM significantly induced cell proliferation when incubated both for 24 h (Figure 2A) and 48 h (Figure 2B) compared to rhPEPD-untreated cells. However, in the presence of IL-1 $\beta$ , the effect of rhPEPD on cell proliferation was significantly augmented in a concentration- (Figure 2A) and time- (Figure 2B) dependent manner.



**Figure 2.** rhPEPD-dependent proliferation of fibroblasts in a model of inflammation induced by IL-1 $\beta$ . The cells were treated with various concentrations of rhPEPD in the absence or presence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) for 24 h (A) and 48 h (B). Proliferation was evaluated by CyQuant Proliferation assay. The mean values  $\pm$  S.D. of three experiments carried out in duplicate are presented. The results are significant at  $p < 0.05$ , represented by <sup>^</sup>, <sup>\*</sup>, and <sup>#</sup>; <sup>^</sup> indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$ ), <sup>\*</sup> indicates significance vs. control (0 nM of PEPD with IL-1 $\beta$ ), and <sup>#</sup> indicates significance between groups treated with and without IL-1 $\beta$ .

### 2.3. rhPEPD Augments IL-1 $\beta$ -Induced EGFR-Downstream Signalling in Fibroblasts

The effect of rhPEPD on the epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream signalling pathway was studied in an experimental model of inflammation in fibroblasts (IL-1 $\beta$  treated cells). Signal transduction is mediated by the phosphorylation of several signalling proteins [35]. The EGFR downstream signalling pathway involves PI3K, AKT, and mTOR. They were evaluated by Western blot analysis after 40 min of treatment of the cells with rhPEPD. It was found that rhPEPD (10 and 50 nM) in the presence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) increased the expression of all studied EGFR downstream signalling proteins (Figure 3A).



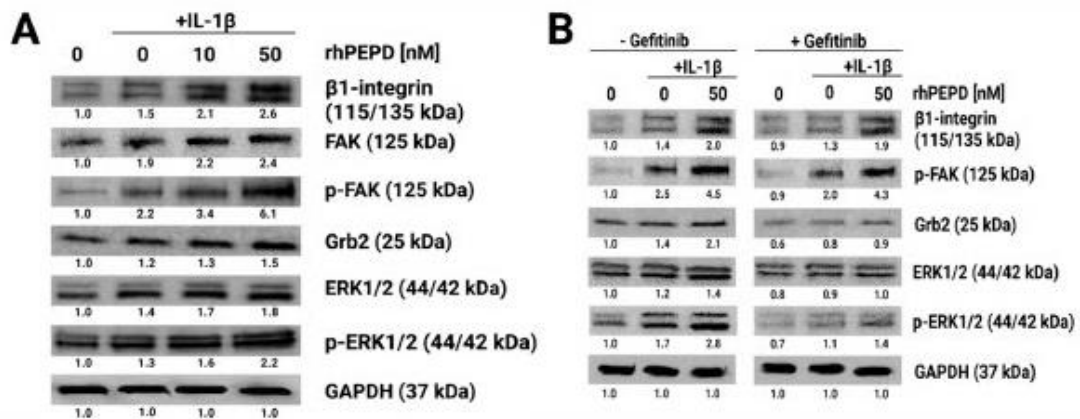
**Figure 3.** The effect of rhPEPD on IL-1 $\beta$ -induced EGFR downstream signalling pathway in fibroblasts: (A) Western blot for the proteins of EGFR downstream signalling pathway in lysates of fibroblasts treated for 24 h in the presence or absence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) and then incubated for 40 min with rhPEPD (10 and 50 nM) in order to detect phosphorylation of studied proteins. (B) Western blot for the proteins of EGFR downstream signalling pathway in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) pretreated with an inhibitor of EGFR (Gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) and cultured for 24 h or 40 min (for phosphorylation forms) in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL). GAPDH expression was used as a loading control. Representative blot images are shown. Densitometry of protein stains is presented under protein bands as a ratio versus control (0 nM of rhPEPD without IL-1 $\beta$  and gefitinib, Supplementary Materials, Figures S1–S18). (C) The ratio of phosphorylated/total proteins in the presence or absence of gefitinib (45  $\mu$ M). The results are significant at  $p < 0.05$ , represented by  $\wedge$ ,  $\ast$ , and  $\#$ ;  $\wedge$  indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without gefitinib and IL-1 $\beta$ ),  $\ast$  indicates significance vs. control (0 nM of PEPD with gefitinib and without IL-1 $\beta$ ), and  $\#$  indicates significance between groups treated with and without gefitinib, respectively.

The role of EGFR signaling in rhPEPD-dependent functions was confirmed by an experiment showing that the pharmacological blockage of EGFR abolished rhPEPD-dependent

effects (Figure 3B). Gefitinib (45  $\mu\text{M}$ , 2 h), a specific EGFR inhibitor, was used to suppress EGFR downstream signaling (Figure 3B). The inhibitor strongly diminished rhPEPD-induced EGFR, PI3K, AKT and mTOR phosphorylation compared to the values found in cells cultured without gefitinib, rhPEPD and IL-1 $\beta$ , indicating that in the presence of IL-1 $\beta$ , rhPEPD stimulates anabolic processes through the EGFR downstream signaling pathway. The ratio of phosphorylated/total proteins in the presence or absence of gefitinib (45  $\mu\text{M}$ ) (Figure 3C) suggests that rhPEPD in IL-1 $\beta$  treated cells induces the phosphorylation of the studied signalling proteins through EGFR.

#### 2.4. rhPEPD Augments IL-1 $\beta$ -Induced Expression of $\beta_1$ -Integrin Receptor Downstream Signaling Proteins in Fibroblasts

Fibroblasts treated with rhPEPD and IL-1 $\beta$  increased their  $\beta_1$ -integrin receptor expression. This was accompanied by the activation of FAK, resulting in an increase in the expression of p-FAK as well as downstream proteins such as Grb2, Ras/Raf/ERK1/2 and p-ERK1/2 (Figure 4A). In the gefitinib-treated cells, rhPEPD, in the presence of IL-1 $\beta$  still induced the expression of  $\beta_1$ -integrin and p-FAK; however, it inhibited the expression of Grb2, ERK1/2 and p-ERK1/2 (Figure 4B).



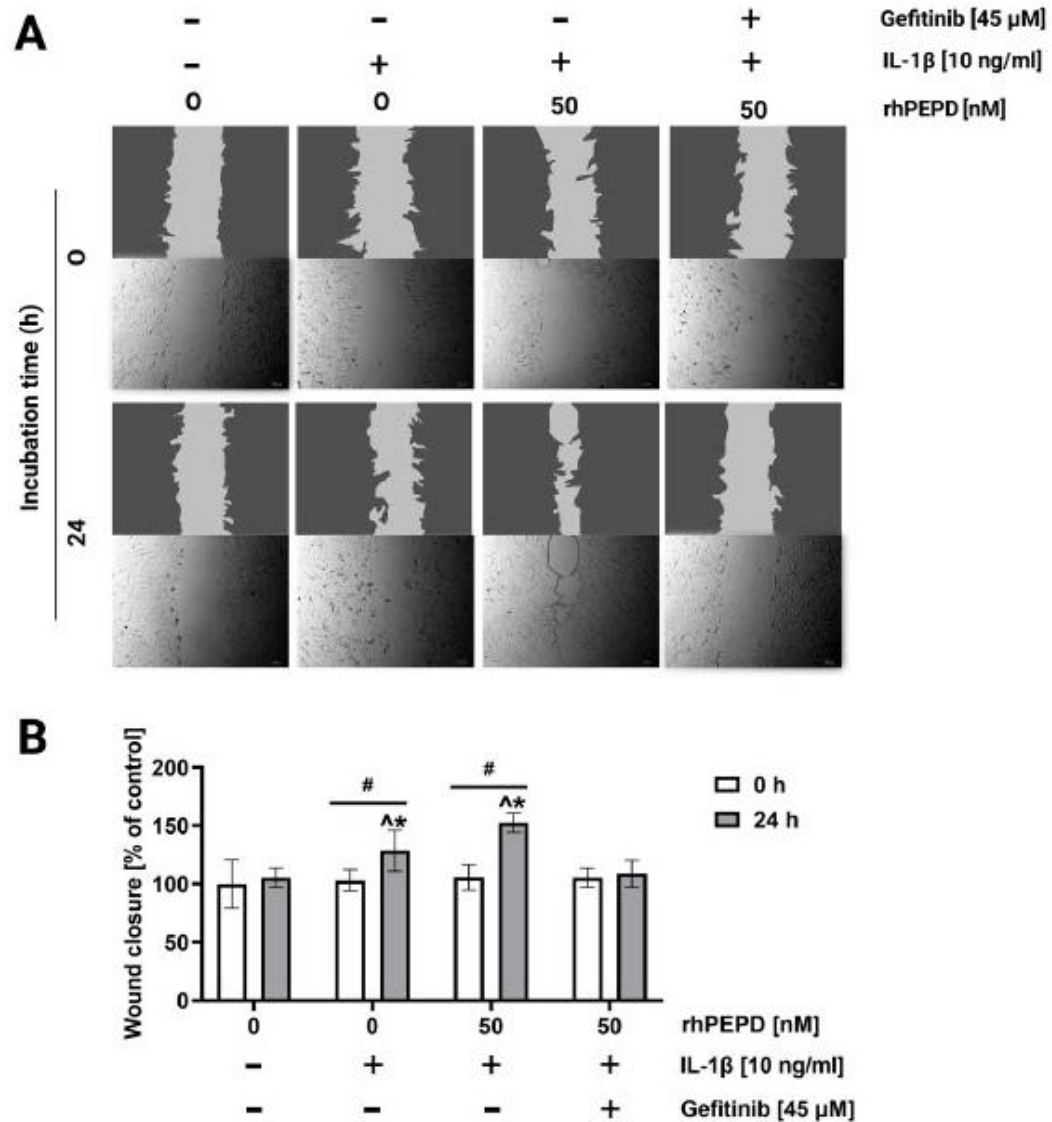
**Figure 4.** The effect of rhPEPD on IL-1 $\beta$ -induced  $\beta_1$ -integrin receptor signaling. (A) Western blot for the proteins of  $\beta_1$ -integrin receptor downstream signaling pathways, FAK, Grb2 and ERK1/2 in lysates of fibroblasts treated for 24 h in the presence or absence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) and then incubated for 40 min with rhPEPD (10 and 50 nM) in order to detect phosphorylation of studied proteins. (B) Western blot for the proteins of  $\beta_1$ -integrin receptor downstream signalling pathway in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu\text{M}$  for 2 h) cultured for 24 h or 40 min (for phosphorylation forms) in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10 ng/mL). GAPDH expression was used as a loading control. Representative blot images are shown. Densitometry of protein stains is presented under protein bands as a ratio versus control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$  and gefitinib, Supplementary Materials, Figures S19–29).

#### 2.5. rhPEPD Promotes the Migration of Fibroblasts in a Model of Wound Healing and Activates MMP-2 and MMP-9

During the re-epithelization phase of wound healing in vivo, fibroblasts proliferate and migrate, closing the wound and restoring the epithelial layer [18]. A wound closure/scratch assay was employed to test fibroblast migration in the presence of rhPEPD, IL-1 $\beta$  and gefitinib. As shown in Figure 5A,B, cell migration was increased upon IL-1 $\beta$ -treatment; however, rhPEPD remarkably augmented this process. The effect was accompanied by an increase in the activity of metalloproteinase-2 (MMP-2) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in culture media, as measured by zymography. rhPEPD in the presence of IL-1 $\beta$  induced MMP-2 and MMP-9 activity in a dose-dependent manner (Figure 5A,B). It has



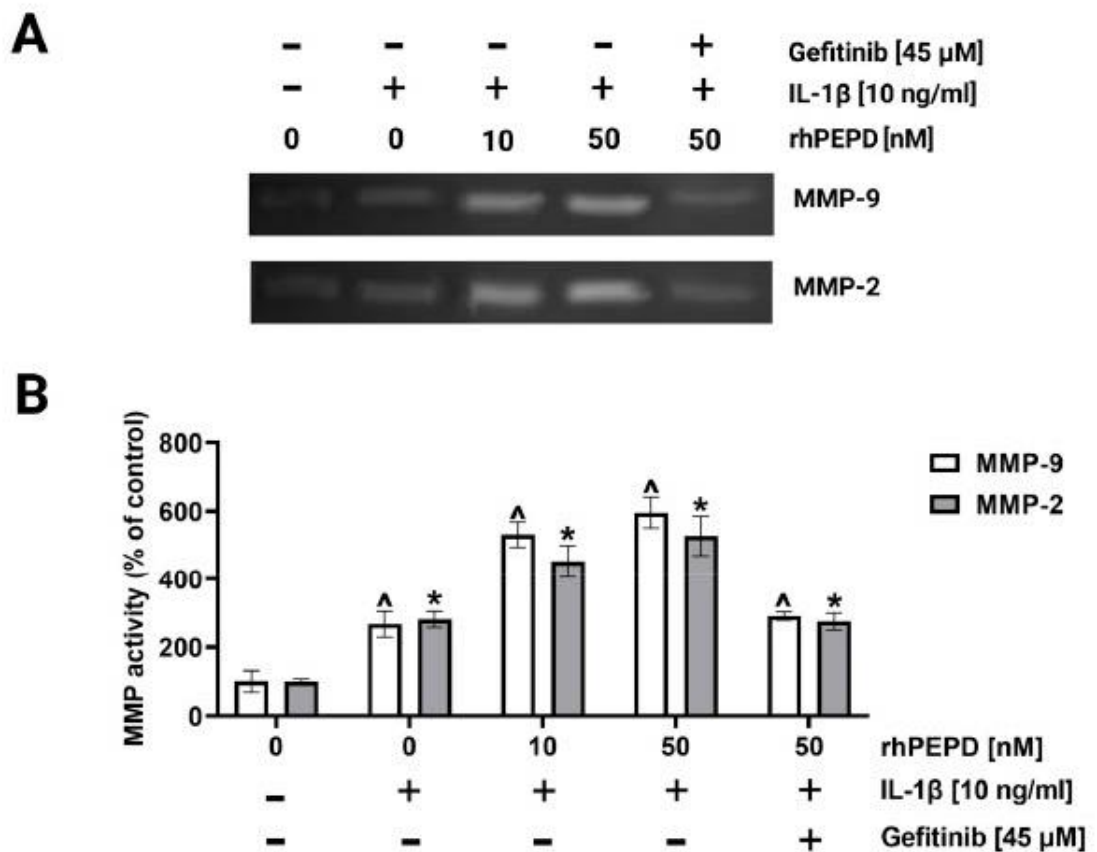
been found that fibroblasts pretreated with the EGFR inhibitor and then supplemented with rhPEPD (50 nM) decreased their ability to migrate (Figure 5A,B) and express MMP activity (Figure 6A,B).



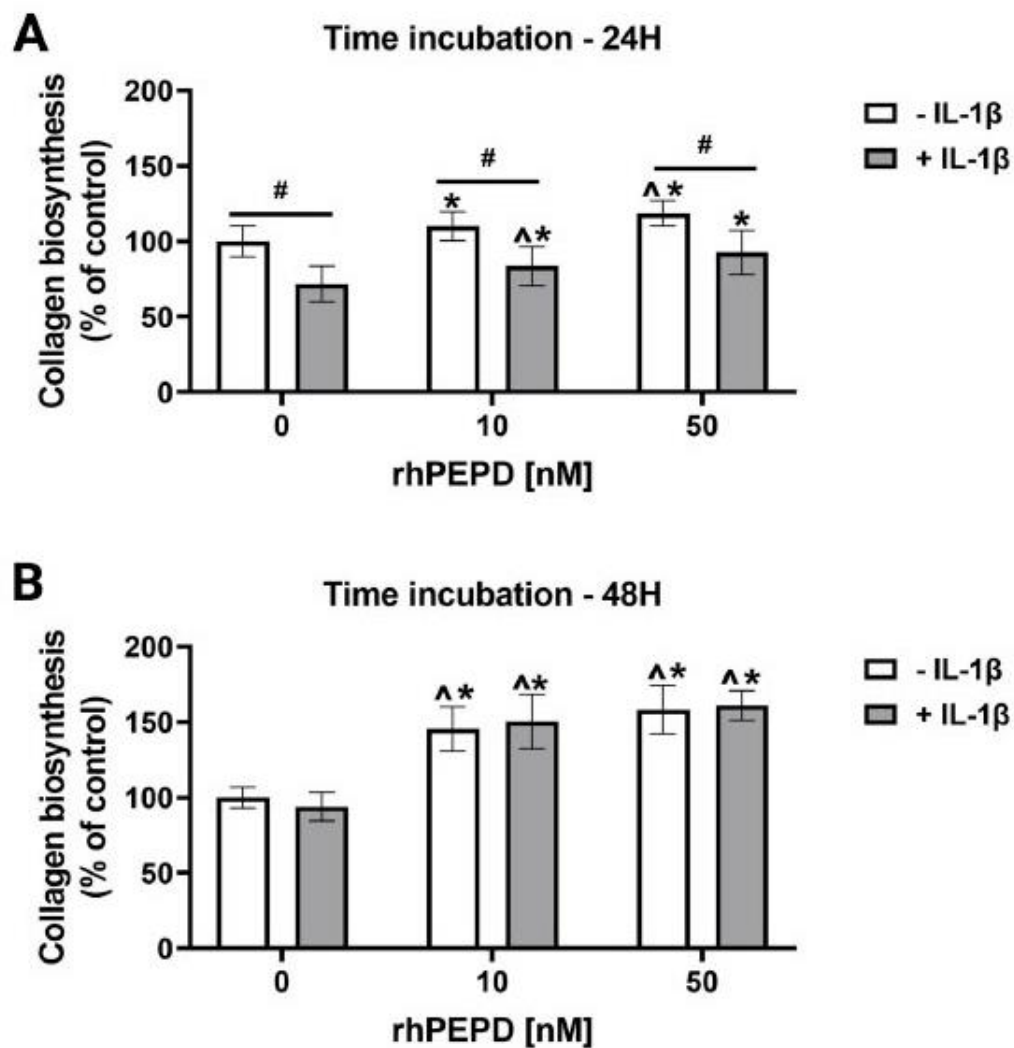
**Figure 5.** The effect of rhPEPD on fibroblast migration under conditions of IL-1 $\beta$ -induced inflammation. (A) rhPEPD and gefitinib treated fibroblasts were scratched and monitored using an inverted microscope at 0 and 24 h of incubation. (B) The wound closure rate of scratched fibroblast cells was evaluated by ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/> accessed on 26 April 2022) vs. control (0 nM of rhPEPD without IL-1 $\beta$ ). Mean values  $\pm$  S.D. of three experiments carried out in duplicate are presented. The results are significant at  $p < 0.05$ , represented by <sup>^</sup>, <sup>\*</sup>, and <sup>#</sup>; <sup>^</sup> indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$  and gefitinib in the cells at 0 h incubation), <sup>\*</sup> indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$  and gefitinib in the cells at 24 h incubation), and <sup>#</sup> indicates significance between groups incubated for 0 and 24 h, respectively.

2.6. rhPEPD Augments Collagen Biosynthesis in IL-1 $\beta$ -Treated Fibroblasts

A 5-[<sup>3</sup>H]-proline incorporation assay was employed to study the effect of different concentrations of rhPEPD (0, 10 and 50 nM) on collagen biosynthesis in the presence or absence of IL-1 $\beta$ . The treatment of fibroblasts with rhPEPD at concentrations of 10 and 50 nM significantly induced collagen biosynthesis when incubated both for 24 h (Figure 7A) and 48 h (Figure 7B). Moreover, collagen biosynthesis was significantly inhibited in the cells treated with IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) for 24 h compared to the cells without IL-1 $\beta$ . The effect was not seen in the cells treated with IL-1 $\beta$  for 48 h. However, the presence of rhPEPD partially counteracted the IL-1 $\beta$ -dependent inhibition of collagen biosynthesis after 24 h of incubation and significantly increased the process after 48 h of incubation in a dose-dependent manner (Figure 7A,B).



**Figure 6.** The activity of MMP-2 and MMP-9 in the culture media from fibroblasts treated with various concentrations of rhPEPD (10, 50 nM), IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) and gefitinib (45  $\mu$ M) for 24 h (A) and respective quantification analysis done by densitometry (B). The mean values  $\pm$  S.D. of three experiments carried out in duplicate are presented. The results are significant at  $p < 0.05$ , represented by ^ and \*; ^ indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$  for MMP-9), and \* indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$  for MMP-2).

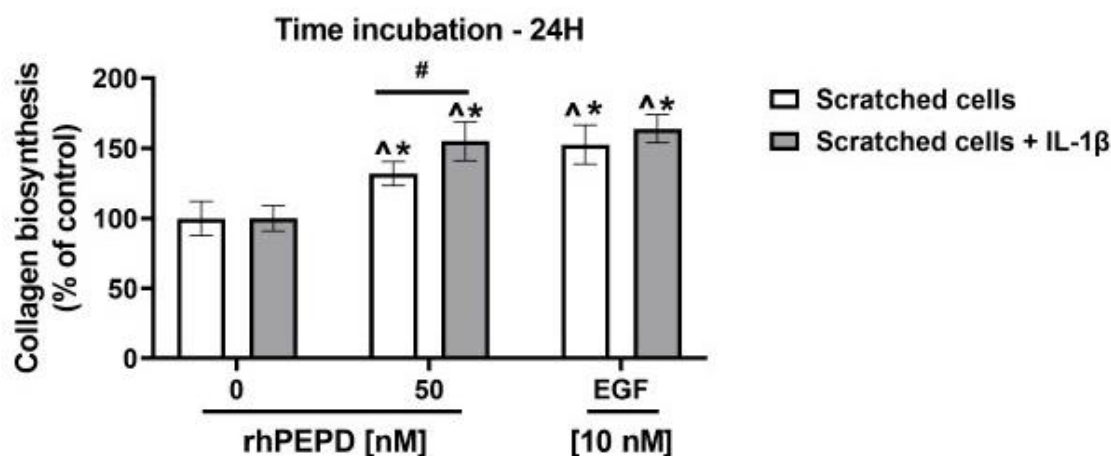


**Figure 7.** The effect of rhPEPD on IL-1 $\beta$ -dependent inhibition of collagen biosynthesis (measured by 5-[ $^3$ H]-proline incorporation into proteins susceptible to bacterial collagenase). Collagen biosynthesis was measured in rhPEPD-treated fibroblasts (0, 10, 50 nM) for 24 (A) and 48 h (B). The mean values  $\pm$  S.D. of three experiments carried out in duplicate are presented. The results are significant at  $p < 0.05$ , represented by ^, \*, and #; ^ indicates significance vs. control (0 nM of PEPD without IL-1 $\beta$ ) cells, \* indicates significance vs. control (0 nM of PEPD with IL-1 $\beta$ ) cells, and # indicates significance between groups treated with and without IL-1 $\beta$ , respectively.

### 2.7. rhPEPD Stimulates Collagen Biosynthesis in IL-1 $\beta$ -Treated Fibroblasts in a Model of Wound Healing

A 5-[ $^3$ H]-proline incorporation assay was employed to compare the effect of rhPEPD and epidermal growth factor (EGF) on collagen biosynthesis in a fibroblast model of wound healing (scratched cells) and scratched cells treated with IL-1 $\beta$  (Figure 8). The cells were treated with rhPEPD (0, 50 nM) and EGF (10 nM) for 24 h. Since EGFR is mainly activated by EGF [20,36,37], it was used as a positive control. As shown in Figure 8, rhPEPD stimulated collagen biosynthesis; however, it exhibited lower potency than EGF. Moreover, in the

presence of IL-1 $\beta$ , the effect on the rhPEPD-dependent stimulation of collagen biosynthesis was enhanced.



**Figure 8.** The effect of rhPEPD (0, 50nM) and EGF (10 nM) on collagen biosynthesis in a model of wound healing, scratched fibroblasts (A) and scratched fibroblasts treated with IL-1 $\beta$  (B) for 24 h. The mean values  $\pm$  S.D. of three experiments done in duplicates are presented. The statistical significance was calculated vs. control (0 nM of rhPEPD without IL-1 $\beta$ ), and the results were considered significant at \*  $p < 0.05$ , represented by ^, \*, and #. Here, ^ indicates significance vs. control (0 nM of PEPD, scratched cells), \* indicates significance vs. control (0 nM of PEPD, scratched cells + IL-1 $\beta$ ), and # indicates significance between scratched cells and scratched cells + IL-1 $\beta$ .

### 3. Discussion

To the best of our knowledge, this is one of the first studies suggesting cross-talk between rhPEPD and IL-1 $\beta$  in the stimulation of growth, migration, proliferation and collagen biosynthesis in human fibroblasts, which may be of key importance in wound healing. The current study is based on our previous results on the evaluation of the mechanism of PEPD-induced wound healing. It has been shown that the PEPD of platelet-rich plasma (PRP) plays an important role in the stimulation of the wound healing process in keratinocytes [12]. The mechanism of this phenomenon has been attributed to the PEPD-dependent activation of EGFR and downstream signalling proteins [13]. The results of these studies were confirmed in an experimental model of wound healing in fibroblasts using porcine PEPD [14] and in experimental inflammation in keratinocytes using recombinant human rhPEPD [15]. These results suggest that PEPD is especially effective in wound healing in conditions of inflammation. The present study was therefore devoted to assessing the effect of inflammation on the rhPEPD-mediated stimulation of wound healing in fibroblasts. This is particularly important in view of a recent report suggesting that PEPD by itself stimulates fibro-inflammation in an *in vivo* mice model [38].

Since disturbed wound healing often occurs in inflammatory conditions [39], it is reasonable to explore the mechanism of complex regulatory processes during tissue healing. We found that PEPD stimulates cell proliferation and other processes, particularly in the presence of IL-1 $\beta$ . It is well known that proper wound healing requires an inflammatory phase; this phenomenon could explain the profitable role of PEPD in wound healing. Of interest is the finding that PEPD by itself induces inflammation, at least in macrophages and adipose precursors, contributing to the activation of cells to produce extracellular matrix proteins [38]. Moreover, PEPD was found to sequester and inactivate p53, suggesting another potential to promote cell viability and proliferation [40].

In the present study, we observed that rhPEPD in the presence of IL-1 $\beta$  significantly stimulated fibroblast growth, proliferation and migration in a dose- and time-dependent

manner. It is known that during the inflammatory phase of injured skin, EGFR and IL-1 $\beta$  expressions are upregulated [41,42]. During EGFR stimulation, several downstream signaling proteins are activated, including PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT and Ras/Raf/ERK [4,24,43]. We have found that only in an inflammatory model, rhPEPD activated total and phosphorylated forms of PI3K/AKT/mTOR proteins, which are involved in the migration and proliferation of fibroblasts during wound healing. Evidence for the rhPEPD-dependent stimulation of EGFR signaling was confirmed in an experiment showing that the use of the EGFR inhibitor, gefitinib, abolished the rhPEPD-dependent stimulation of signaling. These data are supported by studies by Lee et al. [44] showing that the inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway inhibited cell proliferation and migration. Although these studies were performed on keratinocytes, it seems likely that the same mechanism applies to fibroblasts.

EGFR signaling cooperates with adhesion receptor signaling. An example is the  $\beta$ 1 integrin receptor, which is activated by some extracellular matrix proteins, including type I collagen [27]. The communication between these receptors is known as cross-talk. Activation of the  $\beta$ 1 integrin receptor induces the expression of proteins, such as FAK, Grb2 and ERK1/2 [28]. Interestingly, rhPEPD and IL-1 $\beta$  activated  $\beta$ 1-integrin signalling, as shown by the increase in the expression of the  $\beta$ 1-integrin receptor and downstream signalling proteins, such as p-FAK, Grb2 and ERK1/2. Although gefitinib did not counteract the rhPEPD-dependent increase in the expression of  $\beta$ 1-integrin receptor and p-FAK, it down-regulated Grb2 and ERK1/2. This suggests that the activation of  $\beta$ 1-integrin by rhPEPD could be EGFR-dependent. Whether it is the effect of EGFR and  $\beta$ 1-integrin cross-talk requires to be explored. However, a recent report provided evidence for the key role of EGFR in the regulation of integrin tension and the spatial organisation of focal adhesions, suggesting EGFR/ $\beta$ 1-integrin cross-talk [45]. The functional significance of the process was found in the fibroblast model of radiation-induced cell cycle inhibition, suggesting that EGFR signaling counteracts resistance to radiotherapy by the co-activation of  $\beta$ 1-integrin signaling [46].

Previously, we have found that the  $\beta$ 1 integrin receptor signaling cascade stimulates the synthesis of collagens [26,47,48]. These data were also confirmed by other authors [49–51]. The main collagen-synthesizing cells are fibroblasts. They participate in the development of and maintaining the proper structure of all organs by synthesizing the essential components of the extracellular matrix (ECM), including glycosaminoglycans and proteoglycans [20]. During the wound healing process, fibroblasts migrate to the inflammatory site, where they proliferate and produce ECM.

It is well known that degenerative diseases and joint inflammation lead to the loss of key matrix macromolecules, including collagen [52–54]. The underlying mechanism is related to the deregulation of metabolism in cells responsible for collagen synthesis, especially chondrocytes and fibroblasts. Treatment of cells with the inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is a widely accepted experimental inflammatory model [31–34]. It leads to a reduction in the production of collagen [49] and proteoglycans [50,51]. In this report, we showed that IL-1 $\beta$  inhibited collagen biosynthesis, although rhPEPD or epidermal growth factor (EGF) not only abolished IL-1 $\beta$ 's inhibitory activity on collagen biosynthesis but stimulated the process in a dose- and time-dependent manner. The stimulatory effect of EGF on collagen biosynthesis has been demonstrated in many studies [55–57]. Therefore, we conclude that the PEPD-dependent activation of EGFR signaling leads to the stimulation of collagen biosynthesis in an inflammatory model of fibroblasts.

Interestingly, in this study, we found that MMP-2 and MMP-9 were also activated by rhPEPD in the presence of IL-1 $\beta$ , suggesting an enhanced ability of fibroblasts to digest the surrounding ECM and migrate. MMPs are secreted by fibroblasts to digest components of the ECM in response to external stimuli. The activation of MMPs is essential during the inflammatory phase and re-epithelialization of wound healing [58]. In fact, in an experimental model of wound healing and inflammation, we found that rhPEPD stimulated the migration of fibroblasts.

The application value of the results presented in this article has obvious limitations due to *in vitro* studies that should be confirmed by *in vivo* experiments. Although cell line models have several limitations (e.g., the inability to observe systemic phenomena), they are a powerful tool that offers several advantages. Certainly, the cell models allow strict control of the conditions of the experiment in order to establish the critical factors affecting the studied processes in a relatively short time. They are especially helpful in the case of the limited availability of clinical samples or *in vivo* models. Therefore, results on cell models allow us to predict the consequences of pharmacotherapeutic manipulation in humans and provide a rationale for clinical studies on dose-dependent effects. Different treatment regimens and combinations of therapies have been tested using cell lines that have yielded interesting and potentially promising results, demonstrating that some of them could have an application value. Whether prolidase will find clinical application requires further *in vivo* study.

The functional significance of the presented studies could provide a new approach to treating abnormalities of wound healing and possibly prolidase deficiency (PD). PD is a rare autosomal recessive disorder caused by a mutation in the PEPD gene. As a result, PEPD activity decreases or completely disappears [12,59,60]. PD is characterized by an increased level of dipeptides containing proline in blood and is manifested by skin lesions such as macular rash, extensive telangiectasia, progressive ulcerative dermatitis, and erythematous scabs [5–11]. Previous studies on PD have focused on the intracellular role of PEPD since the extracellular function of PEPD was described just a few years ago. Our results allow us to hypothesize that the clinical outcome of PD may be associated with the deprivation of the extracellular function of PEPD, since the supplementation of PD patients with proline or with proline-convertible amino acids was ineffective [61]. The results presented in this report demonstrate that rhPEPD significantly increased EGFR-dependent proliferation and collagen biosynthesis in an experimental model of inflammation in fibroblasts. The engagement of inflammation in PEPD-dependent wound healing is the key finding of this report. It is probable that, in PD, the inflammatory phase does not occur, resulting in the disruption of the wound healing process. This possibility is supported by a recent report showing that PEPD induces inflammation in macrophages and the transition of fibroblasts into mio-fibroblast-like cells mediated fibrosis [38]. Whether this is the case in PD requires to be explored. This suggests that both the intracellular and extracellular PEPD may be involved in the mechanism underlying PD. This report shows for the first time cross-talk between rhPEPD and IL-1 $\beta$  inducing EGFR signaling and contributing to the stimulation of cell proliferation, migration and collagen biosynthesis in an experimental model of inflammation and wound healing in fibroblasts.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Fibroblasts Cell Cultures

The fibroblasts from human skin (CRL-2072) were purchased from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA and maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The medium was replaced every 3 days until 80% confluency. For different applications, cells were seeded on various culture dishes. All treatments used medium 0 (FBS-free DMEM) as previously described [62]. Cells between passages 5 and 8 were treated with human recombinant prolidase (rhPEPD) at working concentrations of 1, 10, 50, and 100 nM and human recombinant IL-1 $\beta$  (10 ng/mL; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for selected assays and time intervals. In some experiments, fibroblasts were preincubated with gefitinib (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), an EGFR inhibitor, at a final concentration of 45  $\mu$ M for 2 h before treatment with rhPEPD prior to Western blot analysis.

#### 4.2. Production of Recombinant Human Prolidase

Constructs for rhPEPD were prepared as previously described [63,64]. *E. coli* BL21 (DE3) cells from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) were transferred with the specific rhPEPD vector by the heat shock method. Bacteria were grown in broth (Bioshop, Burlington, ON, Canada) supplemented with 100 g/mL ampicillin (Bioshop, Burlington, ON, Canada) at 37 °C with shaking for 13 h (200 rpm). Cells were then stimulated with 0.2 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (Bioshop, Canada) at 18 °C for 18 h, centrifuged (15 min, 4500 rpm, 4 °C), and resuspended in lysis buffer. After re-centrifugation, the supernatant containing the recombinant protein was purified twice as previously described [15]. The obtained protein of recombinant human prolidase was activated with  $Mn^{2+}$  (1 mM) at 37 °C for 1 h and then dialyzed in PBS for 12 h at 4 °C. The concentration of protein was determined by the Lowry method [65]. The sample size was determined by a protein assay. For the assessment of rhPEPD-dependent fibroblasts' viability, proliferation, migration, and collagen biosynthesis, the amount of recombinant PEPD protein was reported as nM concentration.

#### 4.3. Cell Viability Assay

The viability of human fibroblast cells treated with the selected concentrations of rhPEPD (0, 1, 10, 50, 100 nM) was measured by the MTT assay as previously described [62]. Cell survival is shown as the percentage of viable cells compared to the control (0 nM rhPEPD).

#### 4.4. Cell Proliferation Assay

The effect of recombinant human prolidase (0, 10, 50, 100 nM) on the proliferation of fibroblasts was assessed using a commercial CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After 24 or 48 h of incubation, the culture medium was removed, and then the cell plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and frozen at  $-80$  °C. Plates were thawed at room temperature prior to analysis. CyQUANT dye mix was added sequentially for cell lysates. Nucleic acid content was assessed by a fluorimeter at the wavelength indicated by the manufacturer (480/520 nm) using a VICTOR X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, MA, USA). The results are presented as a percentage of the control value.

#### 4.5. Western Blot

Fibroblasts were treated with rhPEPD (0, 10, 50 nM) for 24 h (for the detection of total protein expression) or for 40 min (for the detection of protein phosphorylation). Cells were washed three times with cold PBS prior to harvesting. Lysis buffer solution (Cell Signaling, USA) was then added to the cells with protease inhibitors (Protease G inhibitor mix, SERVA, Heidelberg, Germany) and incubated for 15 min on ice. The scraped lysates were sonicated (15 s on and 5 s off—three times), centrifuged (10 min,  $12,000 \times g$ ) at 4 °C, and the collected supernatant was transferred to tubes and stored at  $-80$  °C for Western blotting. Total protein concentration was measured by the method of Lowry et al. [65]. The procedure for Western blot analysis has been described previously [66]. Equal amounts (30  $\mu$ g/well) of protein were diluted in lysis buffer. Before loading the samples on the gel, they were denatured at 95 °C for 10 min. Cell lysates were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE gels. Then, a dry transfer was made and blocked with 5% skim milk powder. After washing three times with TBS-T, membranes were incubated with primary antibodies for 24 h. The membranes were then washed (TBS-T) and incubated with anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies for 2 h. Finally, an Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Helsinki, Finland) was applied to the membranes, and the image was captured using a BioSpectrum Imaging System UVP (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK). The band intensity was measured using the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/> accessed on 26 April 2022). Western blot analysis was performed in triplicate.

#### 4.6. Antibodies

The membranes were incubated with the following primary antibodies at a 1:1000 dilution (Cell Signaling, Danvers, MA, USA): anti-EGF receptor, anti-phospho-EGF receptor, anti-PI3 p85 kinase, anti-p85 phospho-PI3 kinase, anti-AKT, anti-phospho-AKT, anti-mTOR, anti-phospho-mTOR, anti-Integrin  $\beta$ , anti-FAK, anti-phospho-FAK, anti-Grb2 (Becton, Dickson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2), anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2), and anti-GAPDH. Secondary anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated antibodies diluted to 1:7500 were from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

#### 4.7. Cell Migration Assay

Confluent fibroblasts plated in a 6-well plate were scratched with a sterile 200  $\mu$ L pipette tip. Then, they were washed with PBS and incubated with rhPEPD (50 nM) for 24 h. The scratched area was monitored with an inverted optical microscope at 40 $\times$  magnification (Nikon; Minato, Tokyo, Japan). rhPEPD-stimulated fibroblast migration was calculated using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/> accessed on 26 April 2022) vs. control (0 nM of rhPEPD without IL-1 $\beta$ ).

#### 4.8. Gelatin Zymography Assay

The activities of MMP-2 and MMP-9 were assessed by the gelatin zymography protease assay as previously described [67]. A total of 5 mL of the medium was processed and concentrated using a Vivaspinn 2-centrifuge concentrator (Vivaproducts Inc., Littleton, MA, USA). Protein concentration was assessed by the Lowry method [65]. Then, 30  $\mu$ g of protein per well was applied to gelatin 10% SDS-PAGE gels (1 mg/mL gelatin). After the electrophoretic separation of proteins, the gels were washed three times with gelatinase renaturation buffer and then incubated in gelatinase reaction buffer at 37  $^{\circ}$ C (20 h). The Coomassie Brilliant Blue dye was used for staining. The resulting changes in activity between MMP-2 and MMP-9 were scanned.

#### 4.9. Evaluation of Collagen Biosynthesis

Collagen biosynthesis was measured according to the method of Peterkofsky et al. [68] by the measurement of the incorporation of radioactive proline into proteins sensitive to degradation by purified *Clostridium histolyticum* collagenase. Cells were grown in 6-well plates and incubated with 5 [3H] proline (5  $\mu$ Ci/mL) and rhPEPD (0, 10, 50 nM) for 24 and 48 h. The incorporation of the radioactive tracer into the total and collagenase-digestible proteins was measured in cell pellets and the supernatant of TCA-treated sonicated homogenate. The results are presented as combined values for cell fraction and medium.

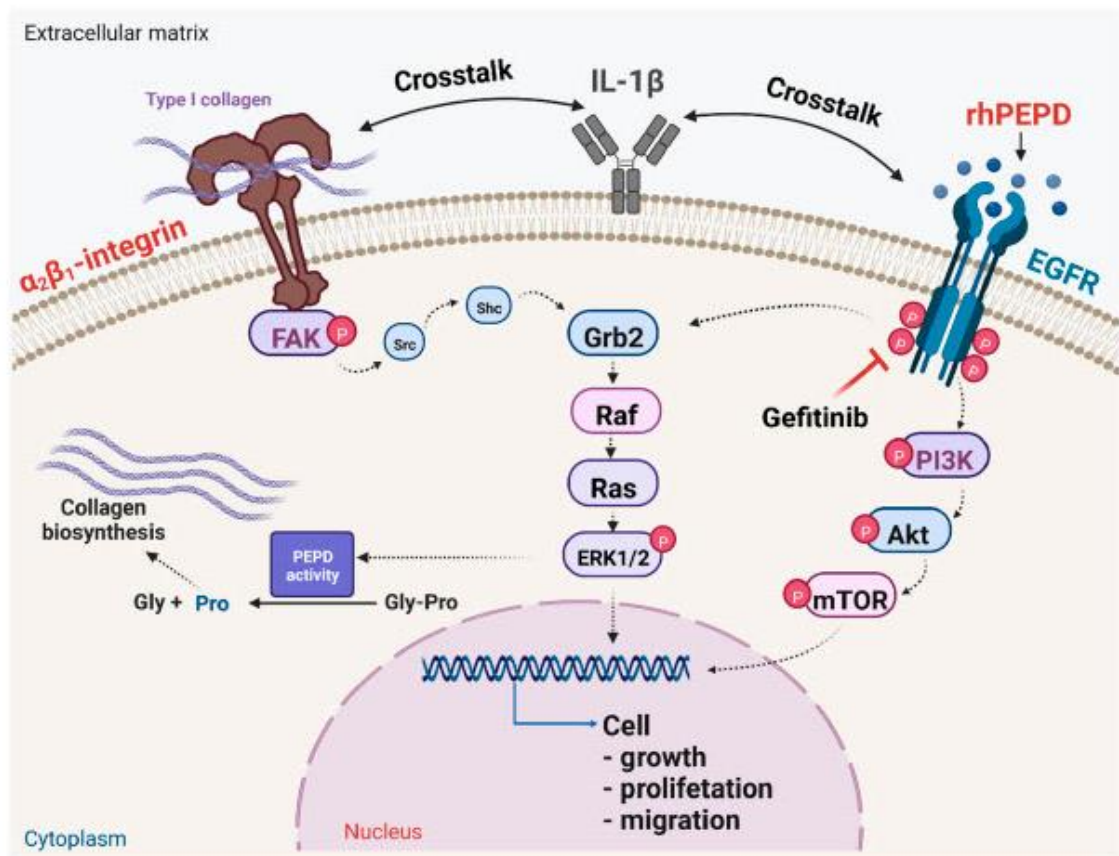
#### 4.10. Statistical Analysis

All experiments were carried in three independent studies with a minimum of two replications. The results obtained are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). One-way ANOVA with Dunnett's correction and two-way ANOVA with Tukey's correction were used to calculate statistical differences using GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistically significant differences are marked as  $\wedge$ ,  $\ast$ , # at  $p < 0.05$  and described in the legend to figures.

### 5. Conclusions

The data presented in this report suggest that rhPEPD, in inflammatory conditions, induces cell growth, proliferation, migration and collagen biosynthesis in human fibroblasts, facilitating wound healing. The mechanism of this process undergoes via EGFR-dependent signaling and involves cross-talk between EGFR,  $\beta$ 1-integrin receptor and IL-1 $\beta$  (Figure 9). This knowledge may be useful in further approaches to the treatment of wound healing disorders.





**Figure 9.** Schematic illustration of rhPEPD-dependent EGFR and  $\beta$ 1-integrin receptor downstream signaling. Under an experimental model of IL-1 $\beta$ -induced inflammation in human fibroblasts, rhPEPD activates PI3K/Akt/mTOR and ERK1/2 pathways, resulting in stimulation of cell proliferation, migration and collagen biosynthesis. Created with BioRender.com.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28020851/s1>. Supplementary data analysis presented—representative blots from Western blotting on Figures 3A,B and 4A,B.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.P. and W.M.; data curation, I.O., W.B. and M.N.; funding acquisition, W.M.; investigation, W.B. and I.O.; methodology, I.O., W.B., M.N. and J.C.-H.; visualization, M.N., W.B. and I.O.; writing—original draft, W.B. and I.O.; writing—review and editing, J.P. and W.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received was funded by the National Centre of Science, Poland, grant no. 2017/25/B/NZ7/02650.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Yaron, A.; Naider, F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 31–81. [\[CrossRef\]](#)
2. Jackson, S.H.; Dennis, A.W.; Greenberg, M. Iminodipeptiduria: A genetic defect in recycling collagen; a method for determining prolydase in erythrocytes. *Can. Med. Assoc. J.* **1975**, *113*, 759–762–763.
3. Palka, J.A.; Milytk, W.; Karna, E.; Wolczynski, S. Modulation of prolydase activity during in vitro aging of human skin fibroblasts the role of extracellular matrix collagen. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1996**, *21*, 207–213.
4. Yang, L.; Li, Y.; Ding, Y.; Choi, K.S.; Kazim, A.L.; Zhang, Y. Prolidase directly binds and activates epidermal growth factor receptor and stimulates downstream signaling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 2365–2375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Scriver, C.R. Glycyl-Proline in Urine of Humans with Bone Disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1964**, *42*, 357–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Goodman, S.I.; Solomons, C.C.; Muschenheim, F.; McIntyre, C.A.; Miles, B.; O'Brien, D. A syndrome resembling lathyrism associated with iminodipeptiduria. *Am. J. Med.* **1968**, *45*, 152–159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Powell, G.E.; Maniscalco, R.M. Bound hydroxyproline excretion following gelatin loading in prolydase deficiency. *Metabolism* **1976**, *25*, 503–508. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Umemura, S. Studies on a patient with iminodipeptiduria. II. Lack of prolydase activity in blood cells. *Physiol. Chem. Phys.* **1978**, *10*, 279–283.
9. Isemura, M.; Hanyu, T.; Gejyo, F.; Nakazawa, R.; Igarashi, R.; Matsuo, S.; Ikeda, K.; Sato, Y. Prolidase deficiency with iminodipeptiduria. A familial case with and without clinical symptoms. *Clin. Chim. Acta* **1979**, *93*, 401–407. [\[CrossRef\]](#)
10. Freij, B.J.; Levy, H.L.; Dudin, G.; Mutasim, D.; Deeb, M.; Der Kaloustian, V.M. Clinical and biochemical characteristics of prolydase deficiency in siblings. *Am. J. Med. Genet.* **1984**, *19*, 561–571. [\[CrossRef\]](#)
11. Pierard, G.E.; Cornil, F.; Lapiere, C.M. Pathogenesis of ulcerations in deficiency of prolydase. The role of angiopathy and of deposits of amyloid. *Am. J. Dermatopathol.* **1984**, *6*, 491–497. [\[CrossRef\]](#)
12. Misiura, M.; Guszczyn, T.; Oscilowska, I.; Baszanowska, W.; Palka, J.; Milytk, W. Platelet-Rich Plasma Promotes the Proliferation of Human Keratinocytes via a Progression of the Cell Cycle. A Role of Prolidase. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 936. [\[CrossRef\]](#)
13. Misiura, M.; Baszanowska, W.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Milytk, W. Prolidase Stimulates Proliferation and Migration through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Human Keratinocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9243. [\[CrossRef\]](#)
14. Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Milytk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta$ 1-integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 942. [\[CrossRef\]](#)
15. Nizioł, M.; Oscilowska, I.; Baszanowska, W.; Palka, J.; Besio, R.; Forlino, A.; Milytk, W. Recombinant Prolidase Activates EGFR-Dependent Cell Growth in an Experimental Model of Inflammation in HaCaT Keratinocytes. Implication for Wound Healing. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 876348. [\[CrossRef\]](#)
16. Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **2008**, *453*, 314–321. [\[CrossRef\]](#)
17. Rose, L.F.; Chan, R.K. The Burn Wound Microenvironment. *Adv. Wound Care* **2016**, *5*, 106–118. [\[CrossRef\]](#)
18. Gonzalez, A.C.; Costa, T.F.; Andrade, Z.A.; Medrado, A.R. Wound healing—A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*, 614–620. [\[CrossRef\]](#)
19. Nguyen, A.T.; Kim, K.Y. Inhibition of Proinflammatory Cytokines in Cutibacterium Acnes-Induced Inflammation in HaCaT Cells by Using Buddleja Davidii Aqueous Extract. *Int. J. Inflamm.* **2020**, *2020*, 8063289. [\[CrossRef\]](#)
20. Palka, J.; Adelman-Grill, B.C.; Franz, P.L.; Bayreuther, K. Differentiation stage and cell cycle position determine the chemotactic response of fibroblasts. *Folia Histochem. Cytobiol.* **1996**, *34*, 121–127.
21. DesJardins-Park, H.E.; Foster, D.S.; Longaker, M.T. Fibroblasts and Wound Healing: An Update. *Regen. Med.* **2018**, *13*, 491–495. [\[CrossRef\]](#)
22. Wee, P.; Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* **2017**, *9*, 52. [\[CrossRef\]](#)
23. Yarden, Y.; Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 127–137. [\[CrossRef\]](#)
24. Lurje, G.; Lenz, H.J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* **2009**, *77*, 400–410. [\[CrossRef\]](#)
25. Labat-Robert, J.; Robert, L. Interaction between cells and extracellular matrix: Signaling by integrins and the elastin-laminin receptor. *Prog. Mol. Subcell Biol.* **2000**, *25*, 57–70.
26. Palka, J.A.; Phang, J.M. Prolidase activity in fibroblasts is regulated by interaction of extracellular matrix with cell surface integrin receptors. *J. Cdl Biochem.* **1997**, *67*, 166–175. [\[CrossRef\]](#)
27. Ivaska, J.; Reunanen, H.; Westermarck, J.; Koivisto, L.; Kähäri, V.M.; Heino, J. Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the  $\alpha$ 2 cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 401–416. [\[CrossRef\]](#)
28. Juliano, R.L.; Haskill, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cdl Biol.* **1993**, *120*, 577–585. [\[CrossRef\]](#)
29. Seger, R.; Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **1995**, *9*, 726–735. [\[CrossRef\]](#)
30. Surazynski, A.; Liu, Y.; Milytk, W.; Phang, J.M. Nitric oxide regulates prolydase activity by serine/threonine phosphorylation. *J. Cdl Biochem.* **2005**, *96*, 1086–1094. [\[CrossRef\]](#)
31. Tyler, J.A.; Bolis, S.; Dingle, J.T.; Middleton, J.F.S. Mediators of matrix catabolism. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*; Kuettner, K.E., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., Hascall, V.C., Eds.; Raven Press: New York, NY, USA, 1992; pp. 251–264.

32. Tyler, J.A. Articular cartilage cultured with catabolin (pig interleukin I) synthesized a decreased number of normal proteoglycan molecules. *Biochem. J.* **1985**, *227*, 869–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Aydelotte, M.; Raiss, R.; Caterson, B.; Kuettner, K. Influence of interleukin-1 on the metabolism of proteoglycans and morphology of cultured bovine articular chondrocytes. *Connect. Tissue Res.* **1992**, *8*, 59–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Beekman, B.; Verzijl, N.; de Roos, J.A.; TeKoppele, J.M. Matrix degradation by chondrocytes cultured in alginate: IL-1 beta induces proteoglycan degradation and proMMP synthesis but does not result in collagen degradation. *Osteoarthr. Cartil.* **1998**, *6*, 330–340. [[CrossRef](#)]
35. Ardito, E.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Muzio, L.L. The Crucial Role of Protein Phosphorylation in Cell Signaling and its Use as Targeted Therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 271–280. [[CrossRef](#)]
36. Palka, J.A.; Karna, E.; Miltyk, W. Fibroblast chemotaxis and prolidase activity modulation by insulin-like growth factor II and mannose 6-phosphate. *Mol. Cell Biochem.* **1997**, *168*, 177–183.
37. Miltyk, W.; Palka, J.A. Potential role of pyrroline 5-carboxylate in regulation of collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2000**, *125*, 265–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pellegrinelli, V.; Rodriguez-Cuenca, S.; Rouault, C.; Figueroa-Juarez, E.; Schilbert, H.; Virtue, S.; Moreno-Navarrete, J.M.; Bidault, G.; Vázquez-Borrego, M.C.; Dias, A.R.; et al. Dysregulation of macrophage PEPD in obesity determines adipose tissue fibro-inflammation and insulin resistance. *Nat. Metab.* **2022**, *4*, 476–494. [[CrossRef](#)]
39. Eming, S.A.; Martin, P.; Tomic-Canic, M. Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling, and Translation. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 265–266. [[CrossRef](#)]
40. Oscilowska, I.; Huynh, T.Y.L.; Baszanowska, W.; Prokop, I.; Surazynski, A.; Galli, M.; Zabielski, P.; Palka, J. Proline oxidase silencing inhibits p53-dependent apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Amino Acids* **2021**, *53*, 1943–1956. [[CrossRef](#)]
41. Barrientos, S.; Stojadinovic, O.; Golinko, M.S.; Brem, H.; Tomic-Canic, M. Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 585–601. [[CrossRef](#)]
42. Yoshida, A.; Kanno, H.; Watabe, D.; Akasaka, T.; Sawai, T. The Role of Heparin-Binding EGF-like Growth Factor and Amphiregulin in the Epidermal Proliferation of Psoriasis in Cooperation with TNF $\alpha$ . *Arch. Dermatol. Res.* **2008**, *300*, 37–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hynes, N.E.; Lane, H.A. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 341–354. [[CrossRef](#)]
44. Lee, S.H.; Zahoor, M.; Hwang, J.K.; Min, D.S.; Choi, K.Y. Valproic acid induces cutaneous wound healing in vivo and enhances keratinocyte motility. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48791. [[CrossRef](#)]
45. Rao, T.C.; Ma, P.Y.; Blanchard, A.; Urner, T.M.; Mattheyses, A.L. EGFR activation attenuates the mechanical threshold for integrin tension and focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, jcs238840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Vehlou, A.; Cordes, N. Growth factor receptor and  $\beta$ 1 integrin signaling differentially regulate basal clonogenicity and radiation survival of fibroblasts via a modulation of cell cycling. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2022**, *58*, 169–178. [[CrossRef](#)]
47. Surazynski, A.; Miltyk, W.; Palka, J.; Phang, J.M. Prolidase-dependent regulation of collagen biosynthesis. *Amino Acids* **2008**, *35*, 731–738. [[CrossRef](#)]
48. Guszczyn, T.; Surazynski, A.; Zareba, I.; Rysiak, E.; Popko, J.; Palka, J. Differential effect of platelet-rich plasma fractions on  $\beta$ 1-integrin signaling, collagen biosynthesis, and prolidase activity in human skin fibroblasts. *Drug Des. Dev. Ther.* **2017**, *11*, 1849–1857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Pujol, J.P.; Brisset, M.; Jourdan, C.; Bocquet, J.; Jouis, V. Effect of a mononuclear cell factor (MCF) on collagen production in cultured articular chondrocytes: Role of prostaglandin E2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *119*, 499–508. [[CrossRef](#)]
50. Benton, H.P.; Tyler, J.A. Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *154*, 421–428. [[CrossRef](#)]
51. Gowen, M.; Wood, D.D.; Ihrie, E.J.; Meats, J.E.; Russel, R.G.G. Stimulation by human interleukin-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *797*, 186–193. [[CrossRef](#)]
52. Dingle, J.T. Mechanism of cartilage destruction and repair: The outlook. *Clinique Rheum.* **1993**, *3*, 1–5.
53. Martel-Pelletier, J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **1998**, *6*, 374–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hamerman, D. Aging and osteoarthritis: Basic mechanisms. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1993**, *41*, 760–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sen, S.; Basak, P.; Prasad Sinha, B.; Maurye, P.; Kumar Jaiswal, K.; Das, P.; Kumar Mandal, T. Anti-inflammatory effect of epidermal growth factor conjugated silk fibroin immobilized polyurethane ameliorates diabetic burn wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *143*, 1009–1032. [[CrossRef](#)]
56. Liu, L.; Song, S.; Zhang, Y.P.; Wang, D.; Zhou, Z.; Chen, Y.; Jin, X.; Hu, C.F.; Shen, C.X. Amphiregulin promotes cardiac fibrosis post myocardial infarction by inducing the endothelial-mesenchymal transition via the EGFR pathway in endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **2020**, *390*, 111950. [[CrossRef](#)]
57. Overstreet, J.M.; Wang, Y.; Wang, X.; Niu, A.; Gewin, L.S.; Yao, B.; Harris, R.C.; Zhang, M.Z. Selective activation of epidermal growth factor receptor in renal proximal tubule induces tubulointerstitial fibrosis. *FASEB J.* **2017**, *31*, 4407–4421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Yang, H.L.; Tsai, Y.C.; Korivi, M.; Chang, C.T.; Hseu, Y.C. Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI3K/AKT, Wnt/beta-catenin and NF-kappaB Signaling Pathways. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 151–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Marx, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* **2001**, *10*, 225–228. [[CrossRef](#)]
60. Amable, P.R.; Carias, R.B.; Teixeira, M.V.; da Cruz Pacheco, I.; Corrêa do Amaral, R.J.; Granjeiro, J.M.; Borojevic, R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem. Cell Res. Ther.* **2013**, *4*, 67. [[CrossRef](#)]
61. Kitchener, R.L.; Grunden, A.M. Prolidase function in proline metabolism and its medical and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 233–247. [[CrossRef](#)]
62. Karaszewski, J.; Zareba, I.; Guszczyn, T.; Darewicz, B.; Palka, J. Verapamil and collagenase differentially affect collagen metabolism in experimental model of Peyronie's disease. *Mol. Cell Probes.* **2020**, *49*, 101488. [[CrossRef](#)]
63. Lupi, A.; Rossi, A.; Campari, E.; Pecora, F.; Lund, A.M.; Elcioglu, N.H.; Gultepe, M.; Di Rocco, M.; Cetta, G.; Forlino, A. Molecular characterisation of six patients with prolidase deficiency: Identification of the first small duplication in the prolidase gene and of a mutation generating symptomatic and asymptomatic outcomes within the same family. *J. Med. Genet.* **2006**, *43*, e58. [[CrossRef](#)]
64. Besio, R.; Gioia, R.; Cossu, F.; Monzani, E.; Nicolis, S.; Cucca, L.; Profumo, A.; Casella, L.; Tenni, R.; Bolognesi, M.; et al. Kinetic and Structural Evidences on Human Prolidase Pathological Mutants Suggest Strategies for Enzyme Functional Rescue. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58792. [[CrossRef](#)]
65. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Zareba, I.; Surazynski, A.; Chrusciel, M.; Miltyk, W.; Doroszko, M.; Rahman, N.; Palka, J. Functional Consequences of Intracellular Proline Levels Manipulation Affecting PRODH/POX-Dependent Pro-Apoptotic Pathways in a Novel In Vitro Cell Culture Model. *Cell Physiol. Biochem.* **2017**, *43*, 670–684. [[CrossRef](#)]
67. Wechselberger, C.; Doppler, C.; Bernhard, D. An Inexpensive Staining Alternative for Gelatin Zymography Gels. *Methods Protoc.* **2019**, *2*, 61. [[CrossRef](#)]
68. Peterkofsky, B.; Diegelmann, R. Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* **1971**, *10*, 988–994. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

#### **11.4. Material uzupełniający – publikacja II**

**Do publikacji II.** „Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts”.

Molecules 2023, 28, 851.

<https://doi.org/10.3390/molecules28020851>. IF: 4.927, MEiN: 140 punktów.

# Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation Through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts

Weronika Baszanowska <sup>1</sup>, Magdalena Nizioł <sup>2</sup>, Ilona Oscilowska <sup>3</sup>, Justyna Czyrko-Horczak<sup>3</sup>, Wojciech Miltyk <sup>2</sup> and Jerzy Palka <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicinal Chemistry, Medical University of Białystok, Kilinskiego 1, 15-089 Białystok, Poland, phone: +48-85-748-5706; e-mail: w.baszanowska22@wp.pl (W.B.), ilona.zareba@gmail.com (I.O.), pal@umb.edu.pl (J.P.)

<sup>2</sup> Department of Analysis and Bioanalysis of Medicines, Medical University of Białystok, Kilinskiego 1, 15-089 Białystok, Poland, phone: +48-85-748-5845; e-mail: magdalena.misiura@umb.edu.pl (M.M.); wojciech.miltyk@umb.edu.pl (W.M.)

<sup>3</sup> Department of Structural Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Białystok, Ciołkowskiego 1K, Białystok, 15-245 Poland, phone: 85-738-8062; e-mail: czyrko.justyna@gmail.com (J.C.H.)

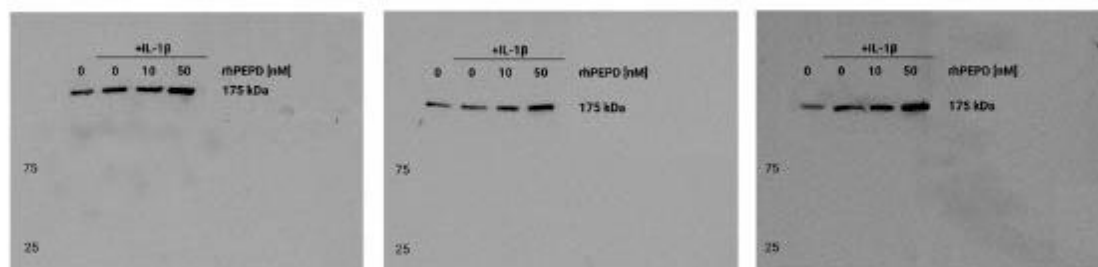
\* Correspondence: pal@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-748-5706

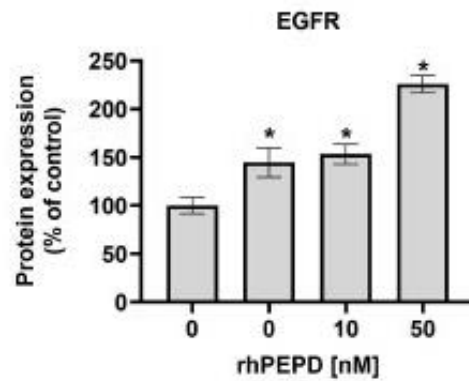
**Description of data:** The blots and images are described in the result section.

Supplementary data analysis presented- representative blots from Western blotting on Figures 3A,B and 4A,B.

## 1. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 3A.

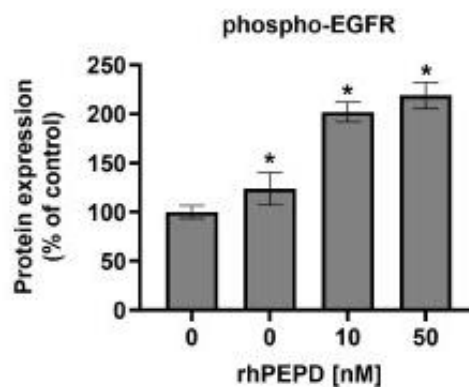
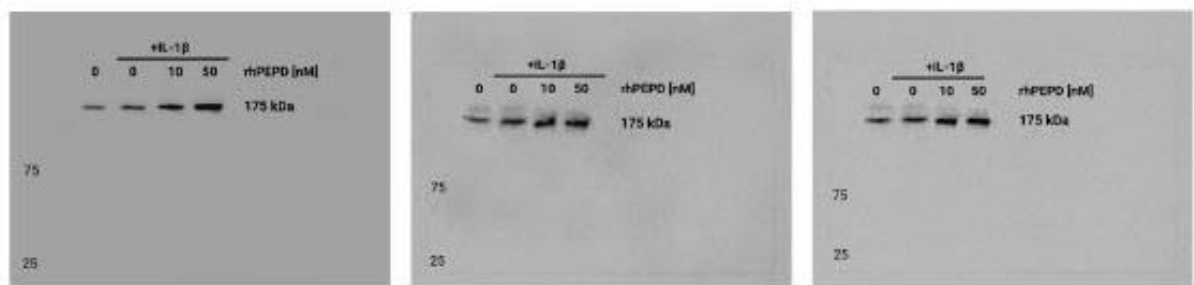
### 1.1. EGFR expression





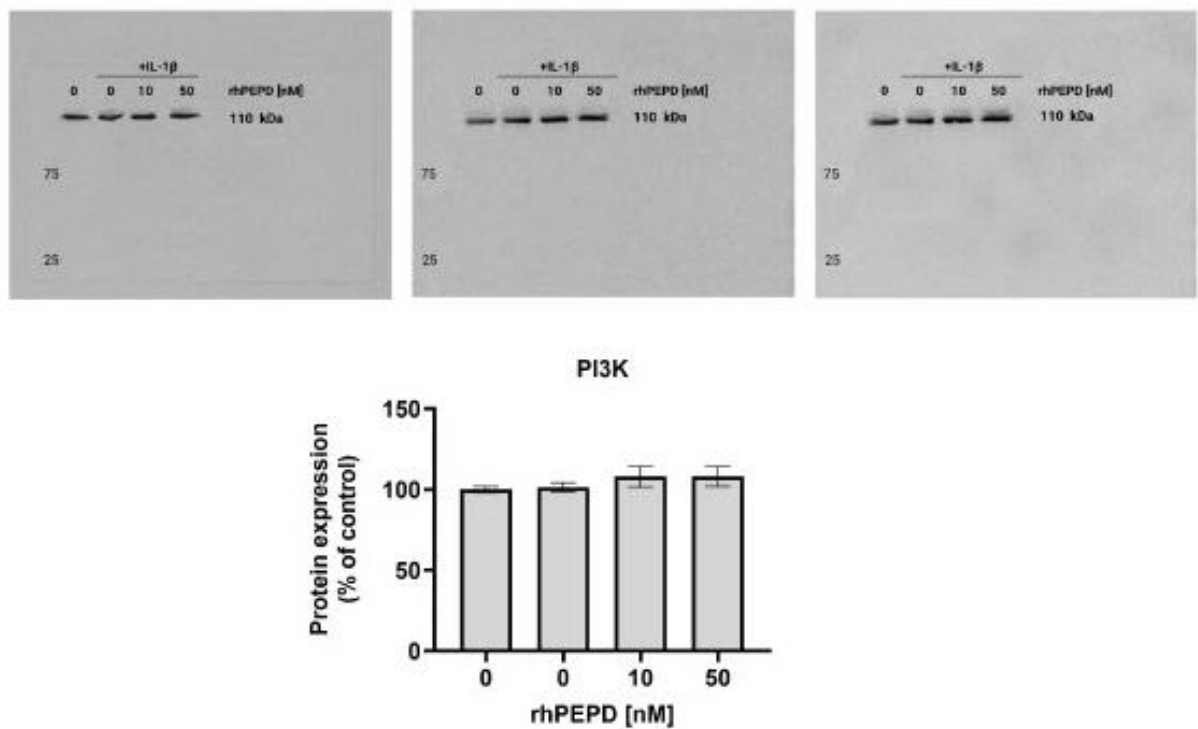
**Figure S1.** The EGFR expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 1.2. Phospho-EGFR expression



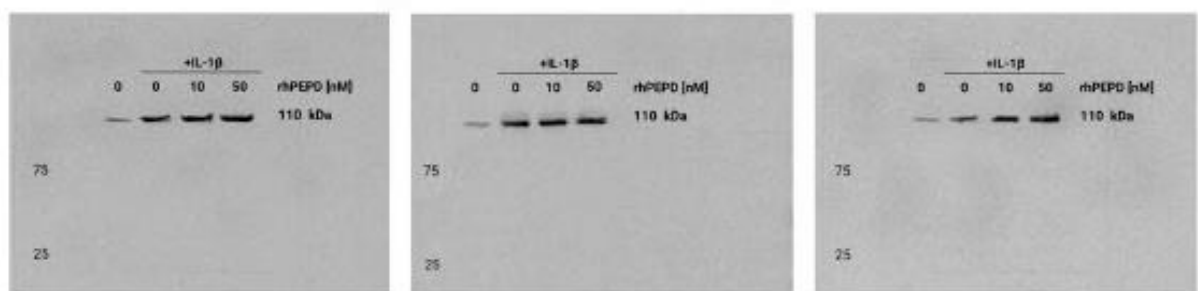
**Figure S2.** The phospho-EGFR expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 40 min in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### 1.3. PI3K expression

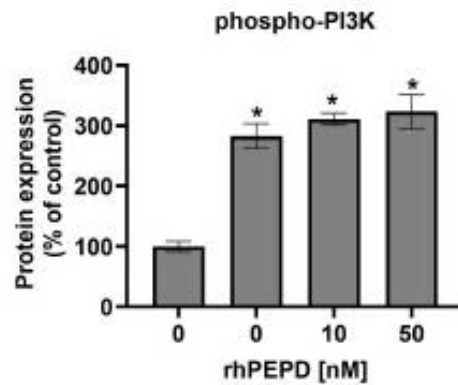


**Figure S3.** The PI3K expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### 1.4. Phospho-PI3K expression

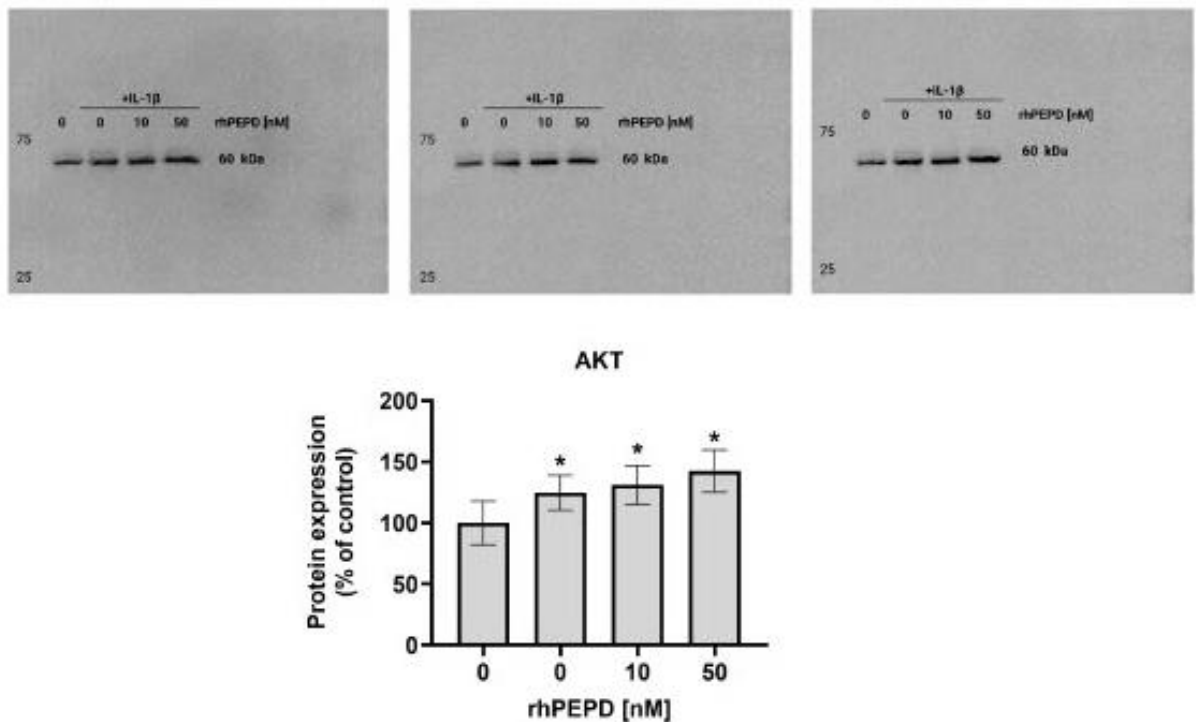






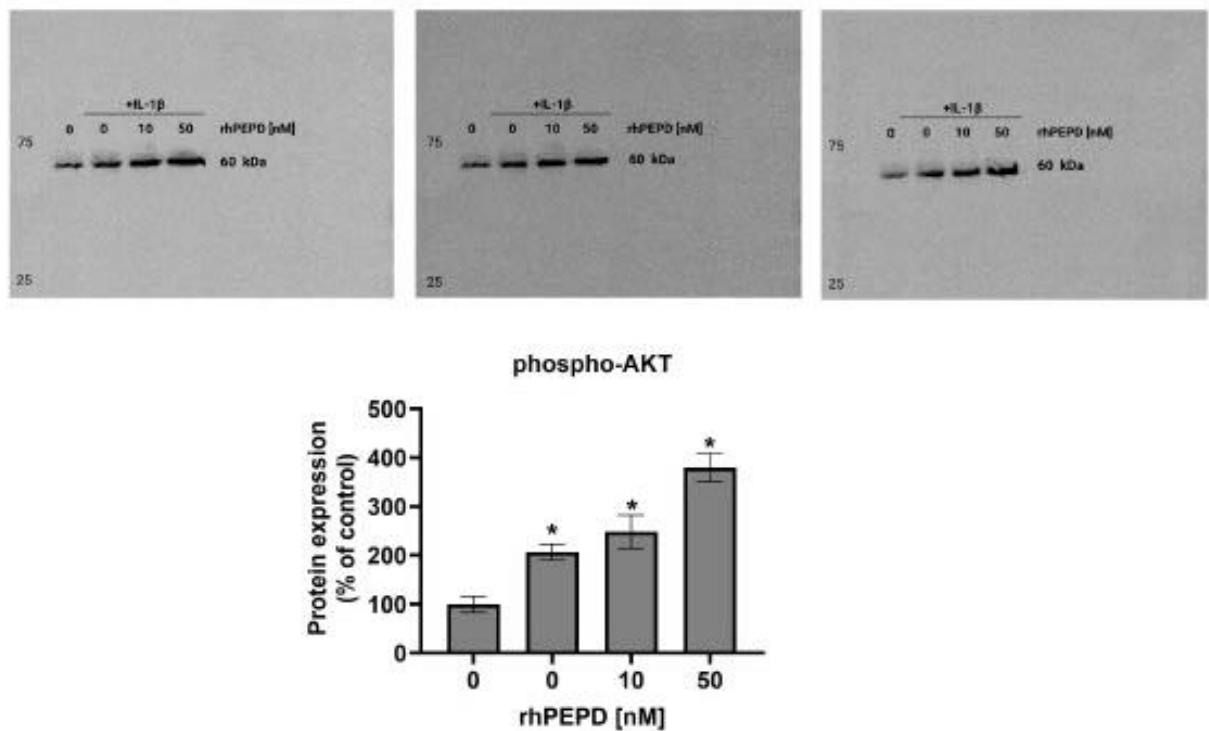
**Figure S4.** The phospho-PI3K expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 40 min in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P$  < 0.05; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### 1.5. AKT expression



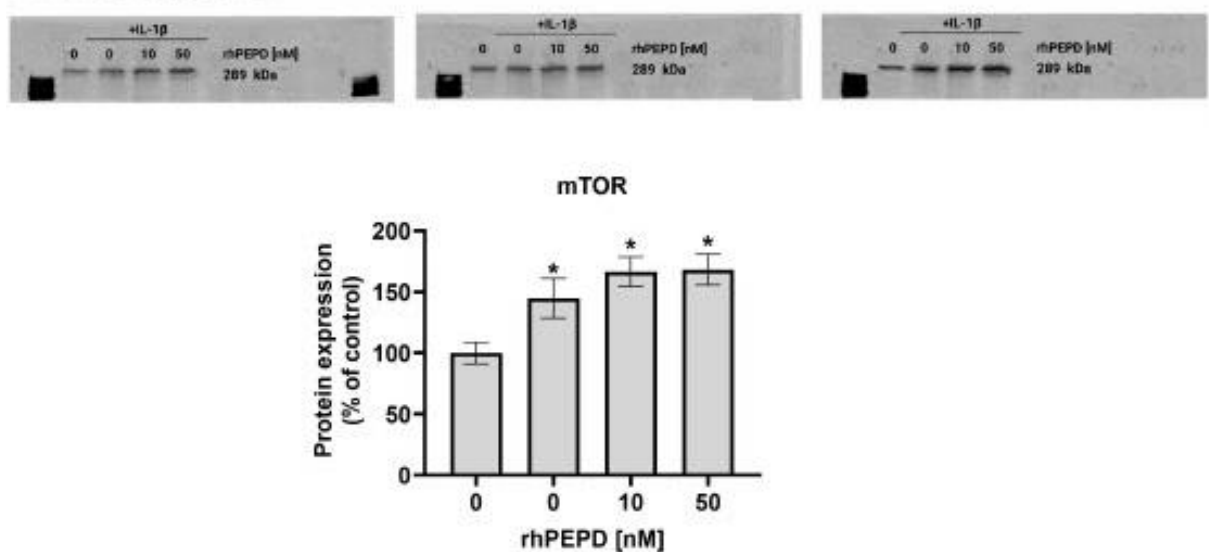
**Figure S5.** The AKT expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P$  < 0.05; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 1.6. Phospho-AKT expression



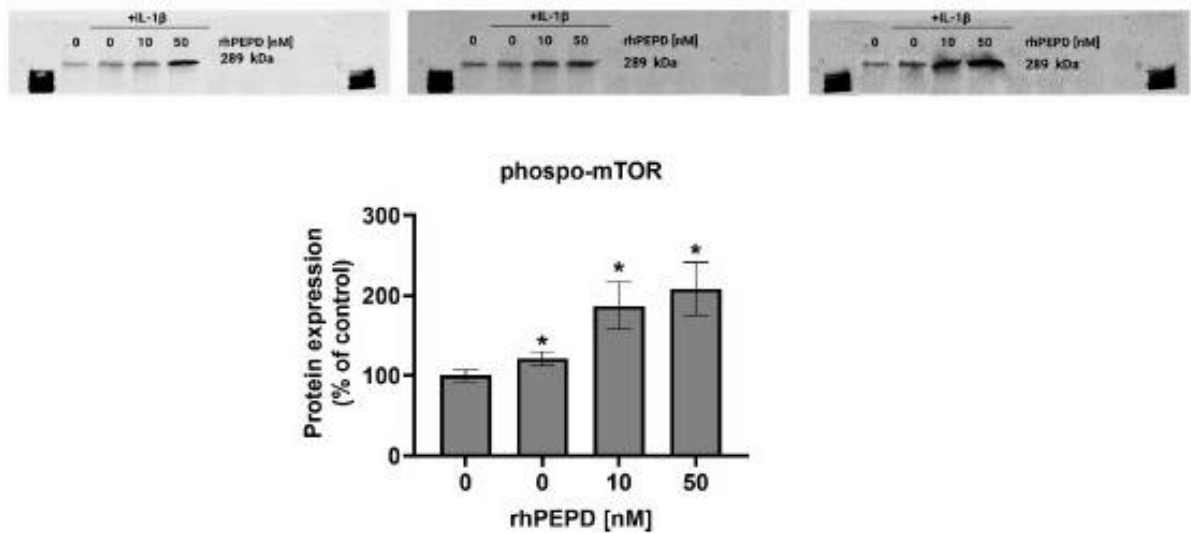
**Figure S6.** The phospho-AKT expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 40 min in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 1.7. mTOR expression



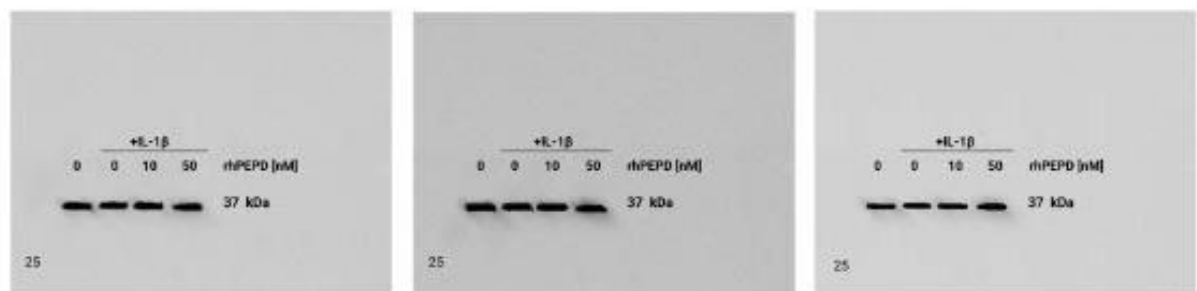
**Figure S7.** The mTOR expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

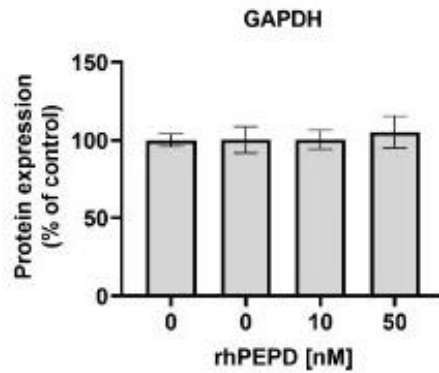
### 1.8. Phospho-mTOR expression



**Figure S8.** The phospho-mTOR expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 40 min in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### 1.9. GAPDH expression

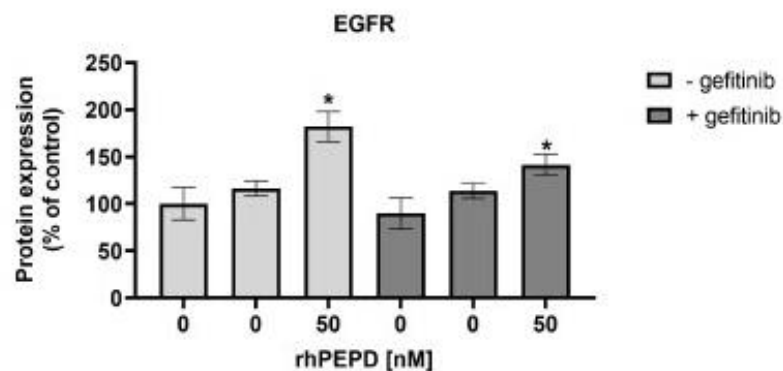
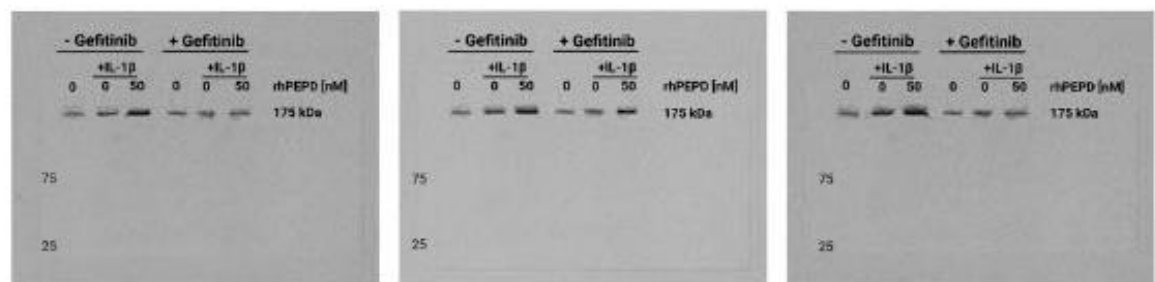




**Figure S9.** The GAPDH expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 2. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 3B.

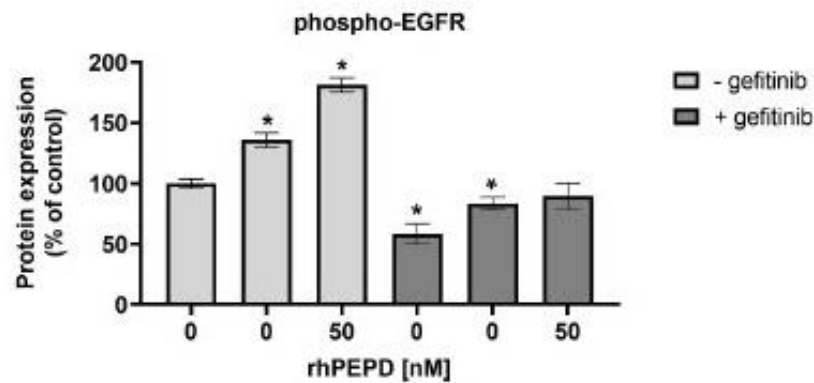
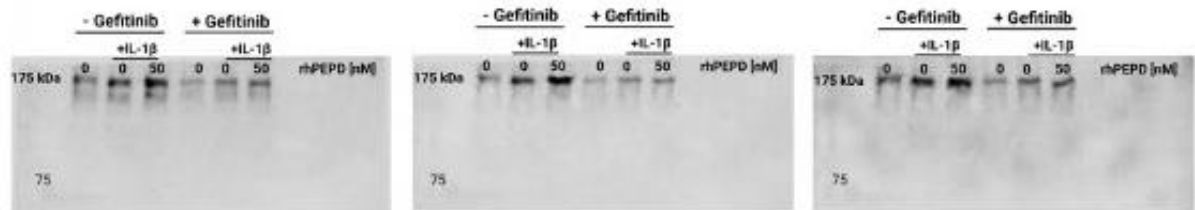
### 2.1. EGFR expression



**Figure S10.** The EGFR expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The

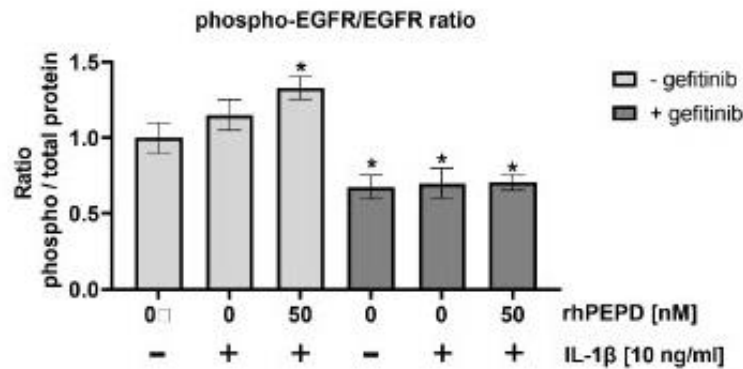
densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as  $*P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 2.2. Phospho-EGFR expression

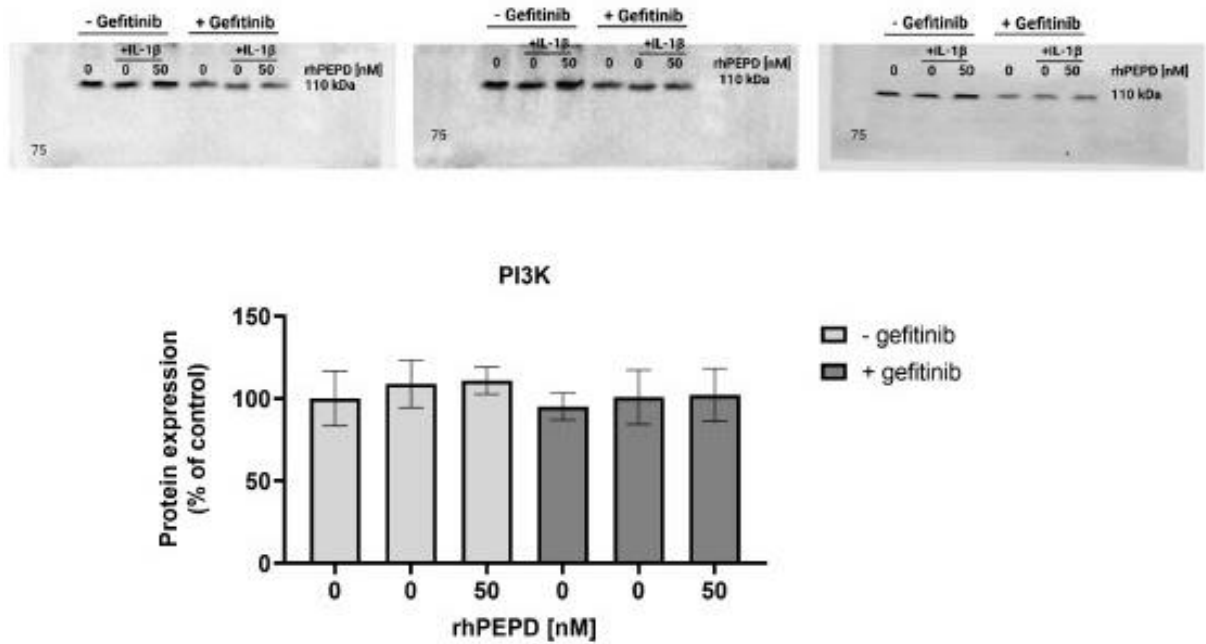


**Figure S11.** The phospho-EGFR expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 40 min in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as  $*P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## Ratio of phospho-EGFR/EGFR expression

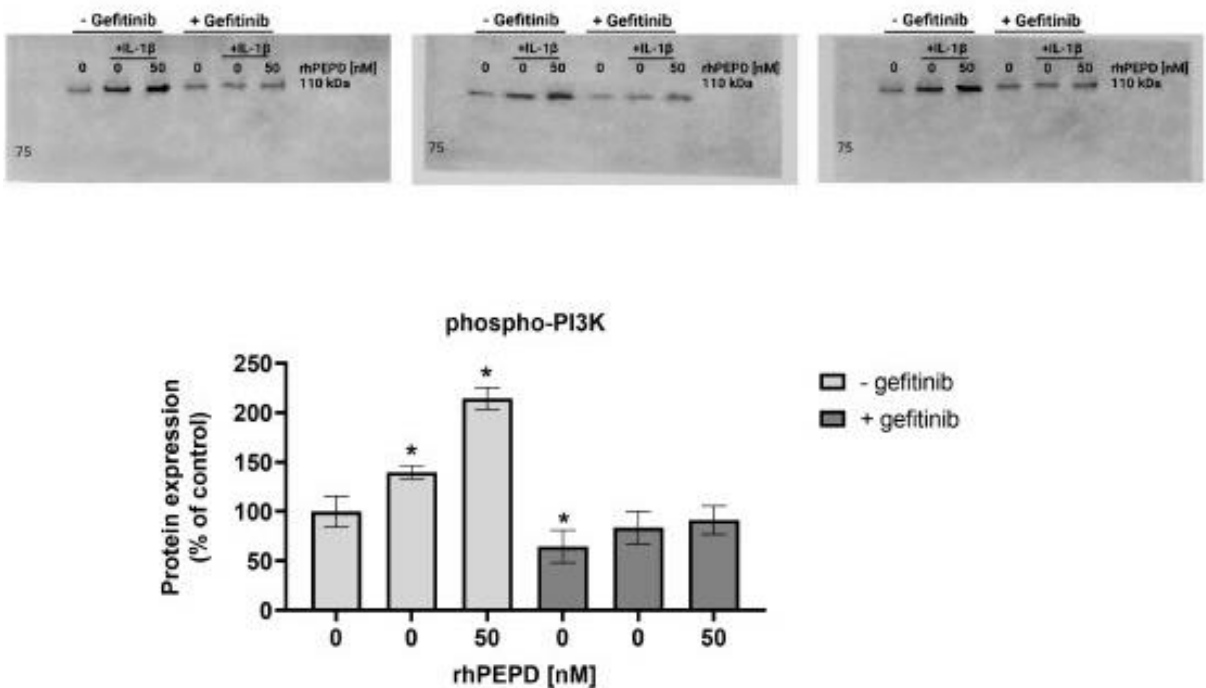


### 2.3. PI3K expression

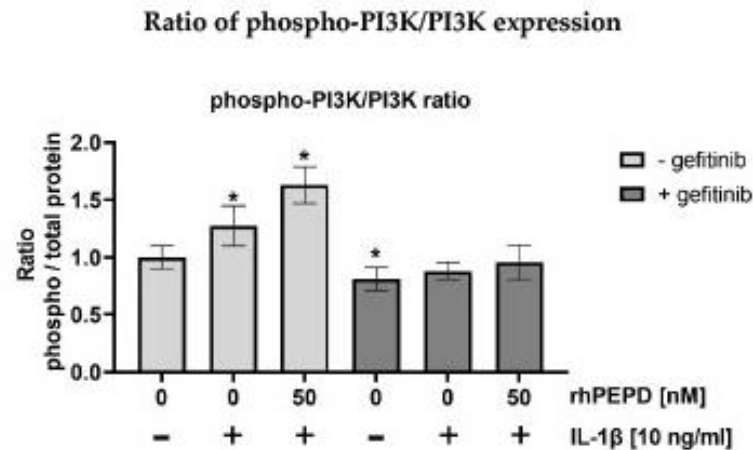


**Figure S12.** The PI3K expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as  $*P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

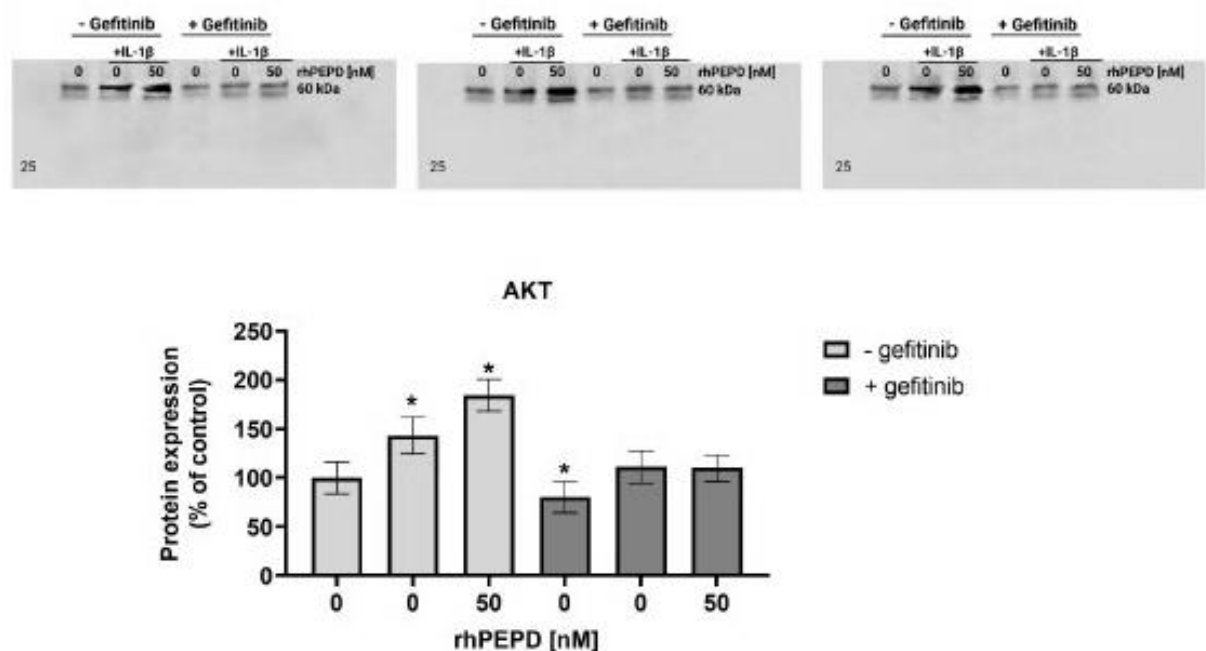
### 2.4. Phospho-PI3K expression



**Figure S13.** The phospho-PI3K expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 40 min in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

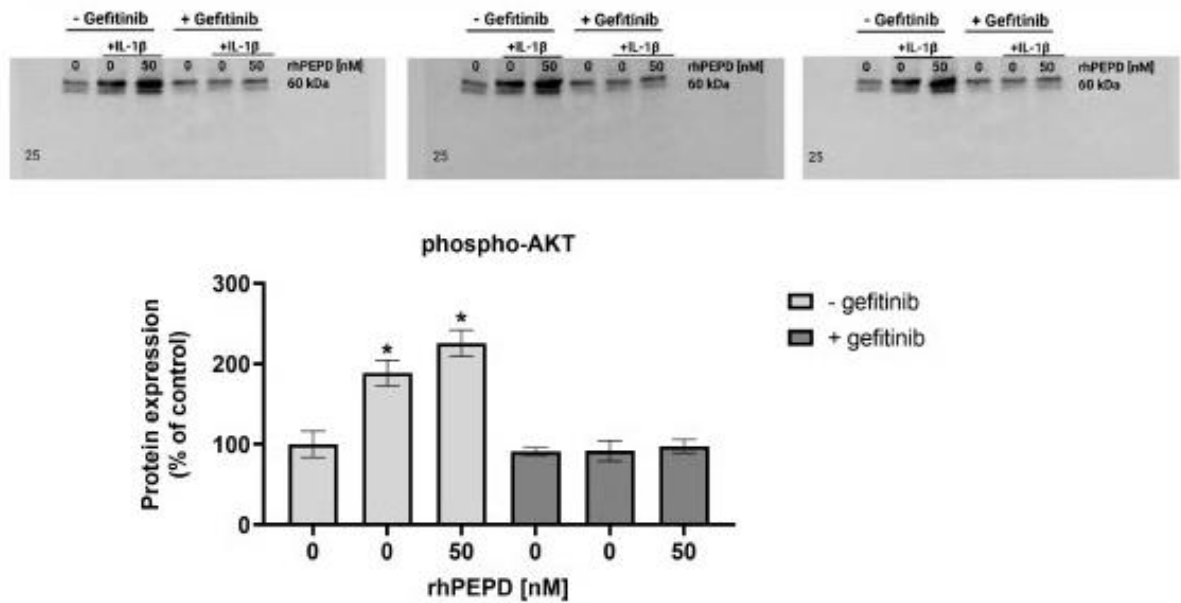


## 2.5. AKT expression



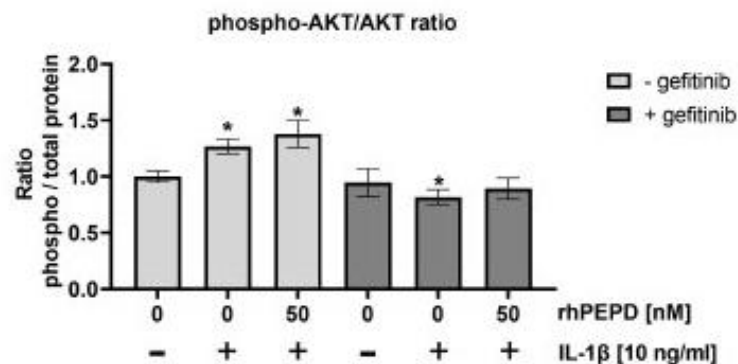
**Figure S14.** The AKT expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 2.6. Phospho-AKT expression

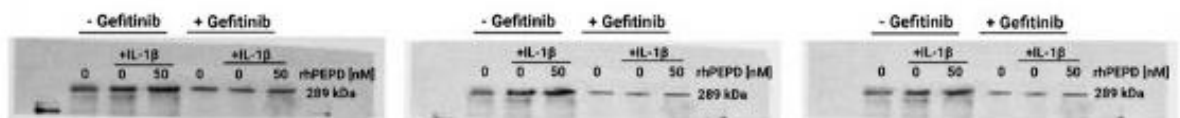


**Figure S15.** The phospho-AKT expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 40 min in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as  $*P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

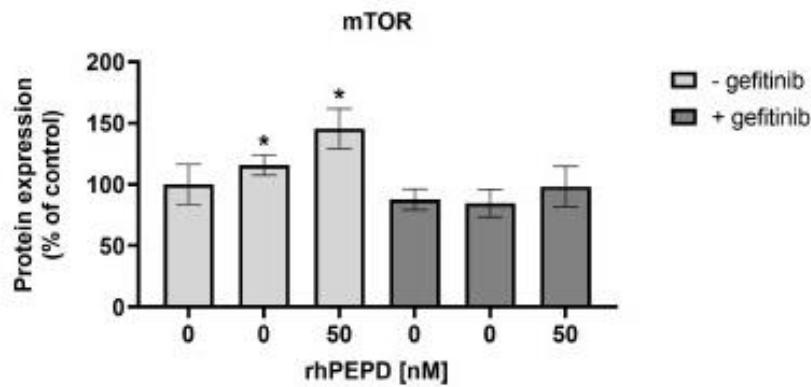
## Ratio of phospho-AKT/AKT expression



## 2.7. mTOR expression

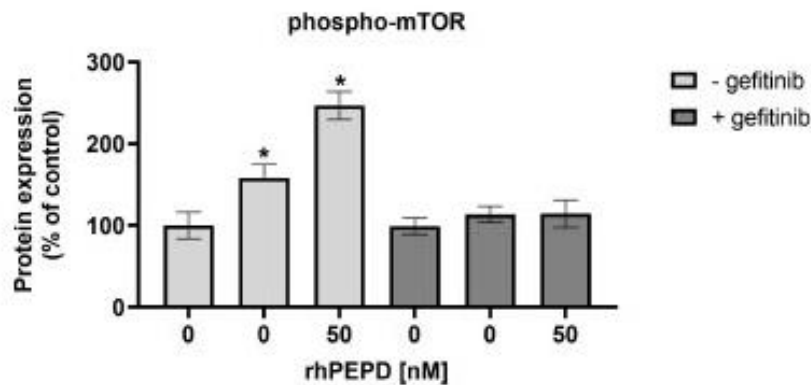
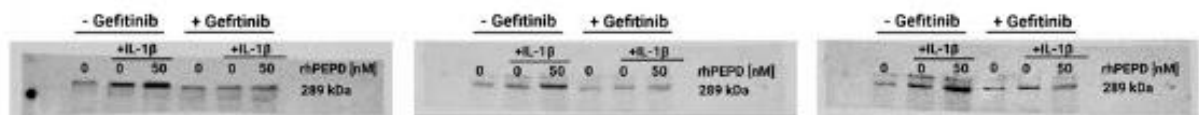






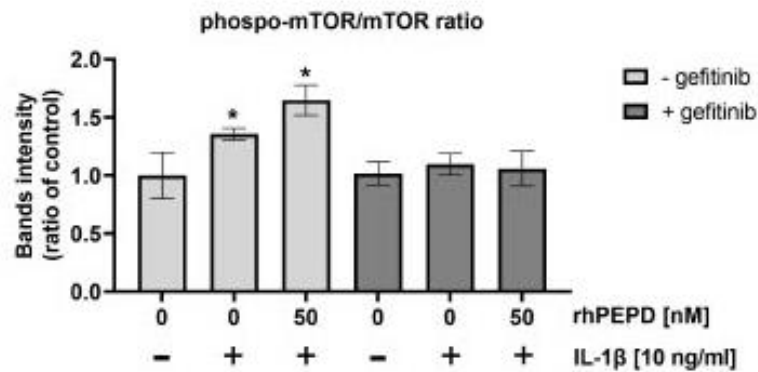
**Figure S16.** The mTOR expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 2.8. Phospho-mTOR expression

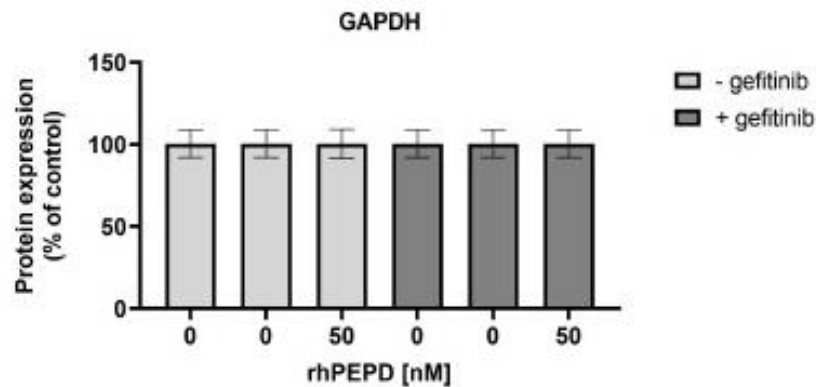
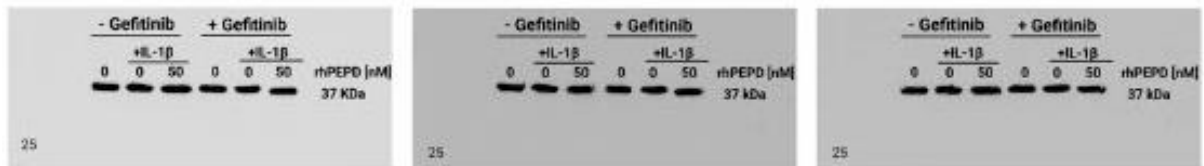


**Figure S17.** The phospho-mTOR expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 40 min in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### Ratio of phospho-mTOR/mTOR expression



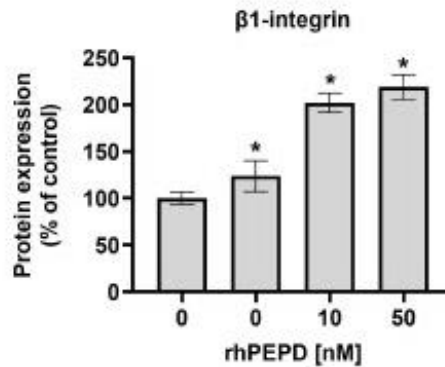
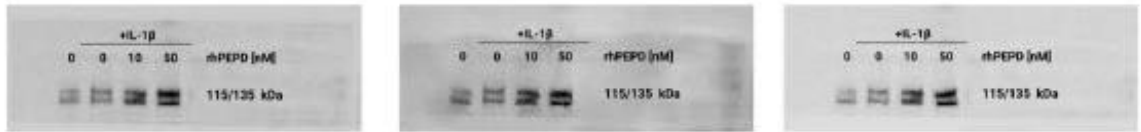
### 2.9. GAPDH expression



**Figure S18.** The GAPDH expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

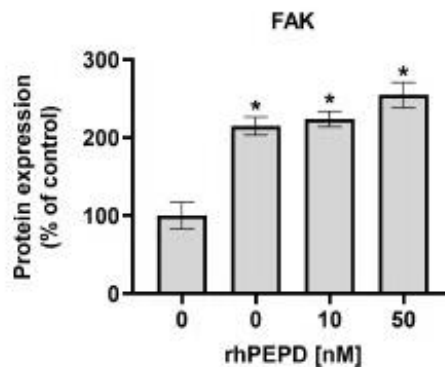
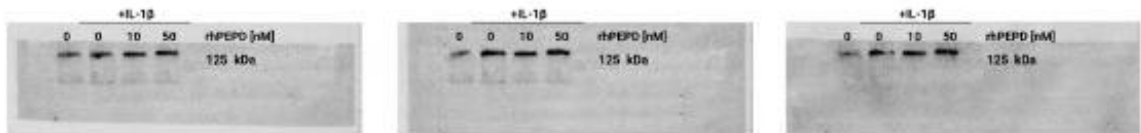
### 3. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 4A.

#### 3.1. $\beta$ 1 integrin expression



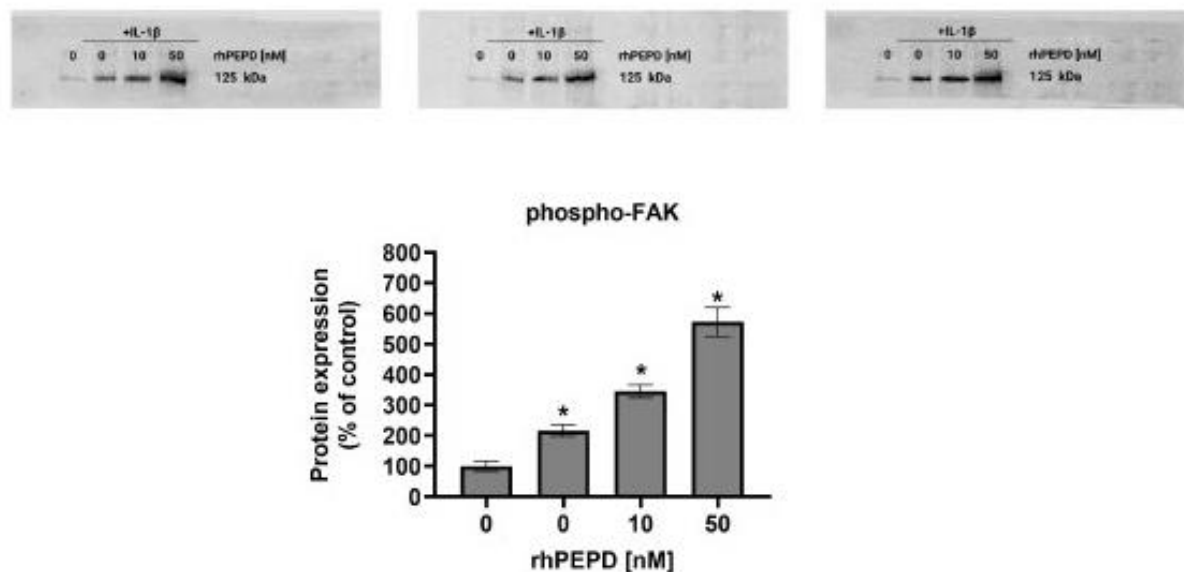
**Figure S19.** The  $\beta$ 1 integrin expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

#### 3.2. FAK expression



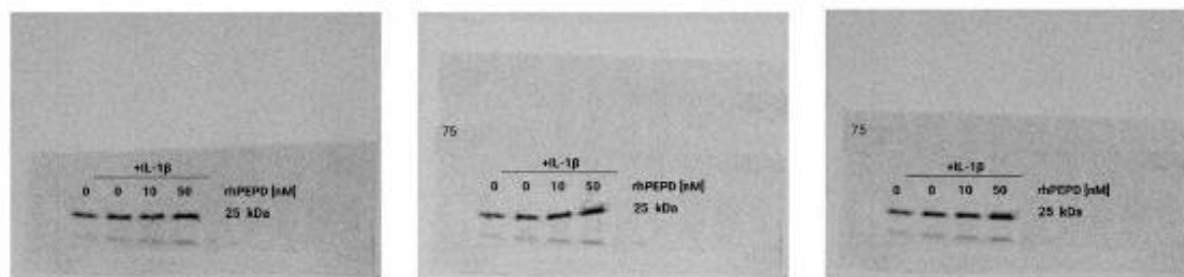
**Figure S20.** The FAK expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

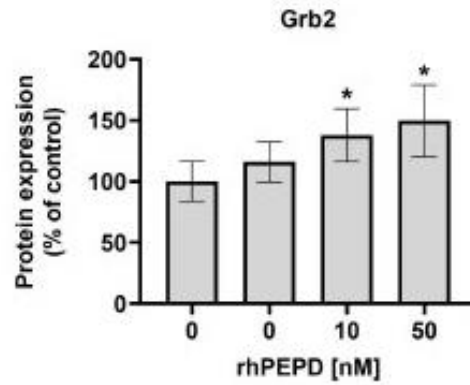
### 3.3. Phospho-FAK expression



**Figure S21.** The phospho-FAK expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 40 min in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

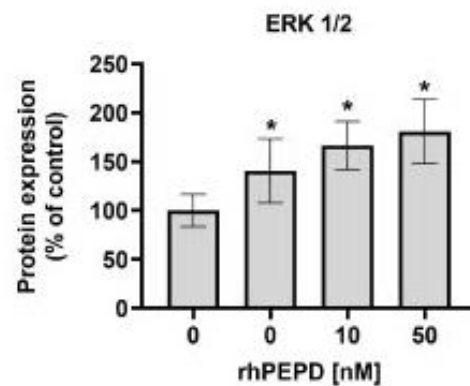
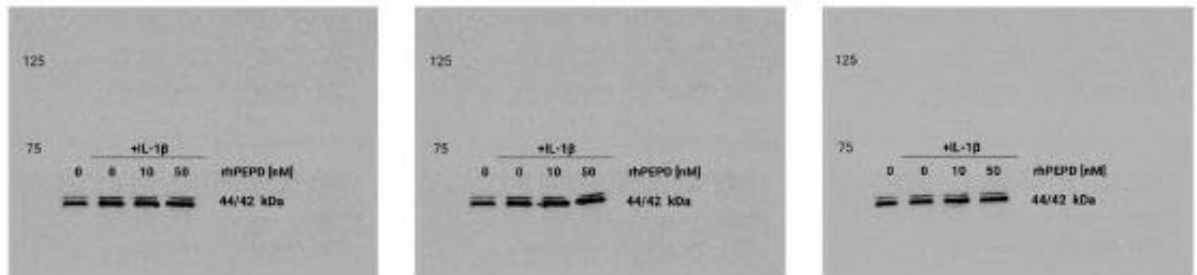
### 3.4. Grb2 expression





**Figure S22.** The Grb2 expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### 3.5. ERK 1/2 expression



**Figure S23.** The ERK 1/2 expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 40 min and 24 h in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### 3.6. Phospho-ERK 1/2 expression

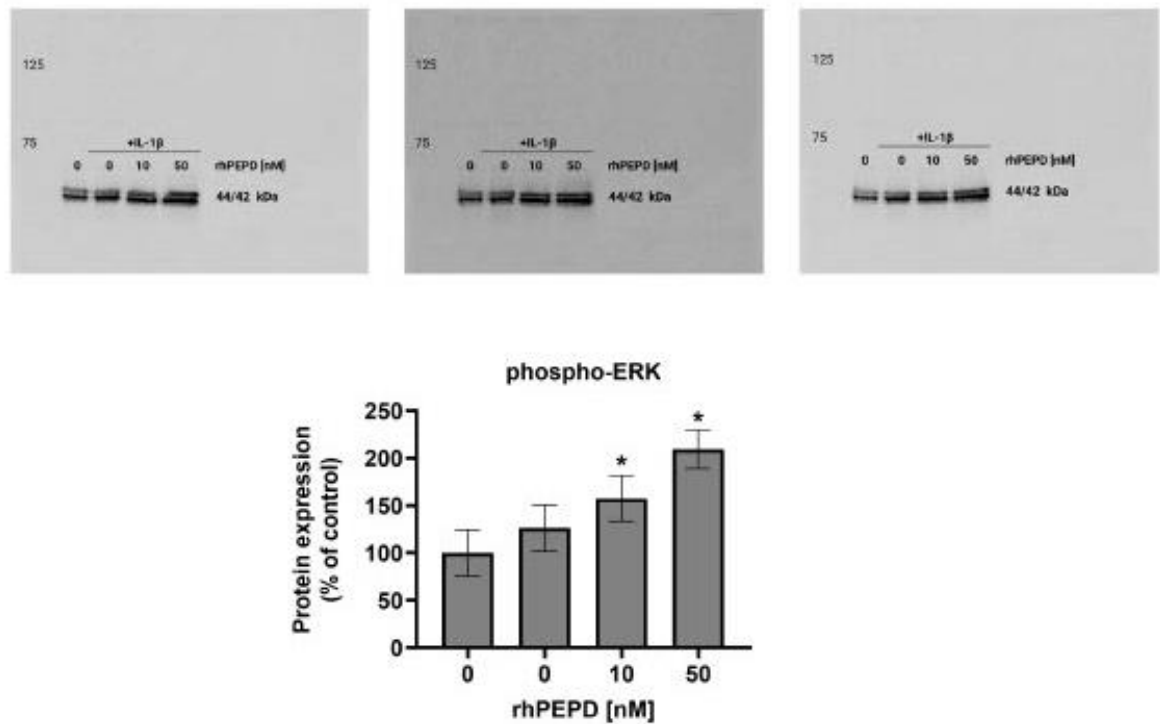
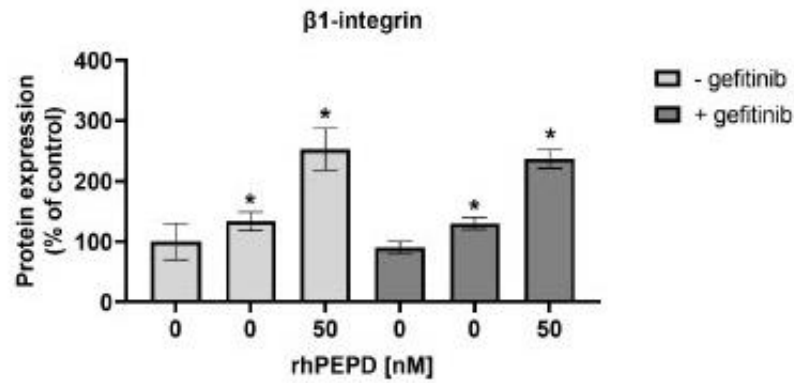


Figure S24. The phospho-ERK 1/2 expressions in rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 10, 50 nM) for 40 min in presence or absence of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 4. Representative blots from Western blotting analysis presented in Figure 4B.

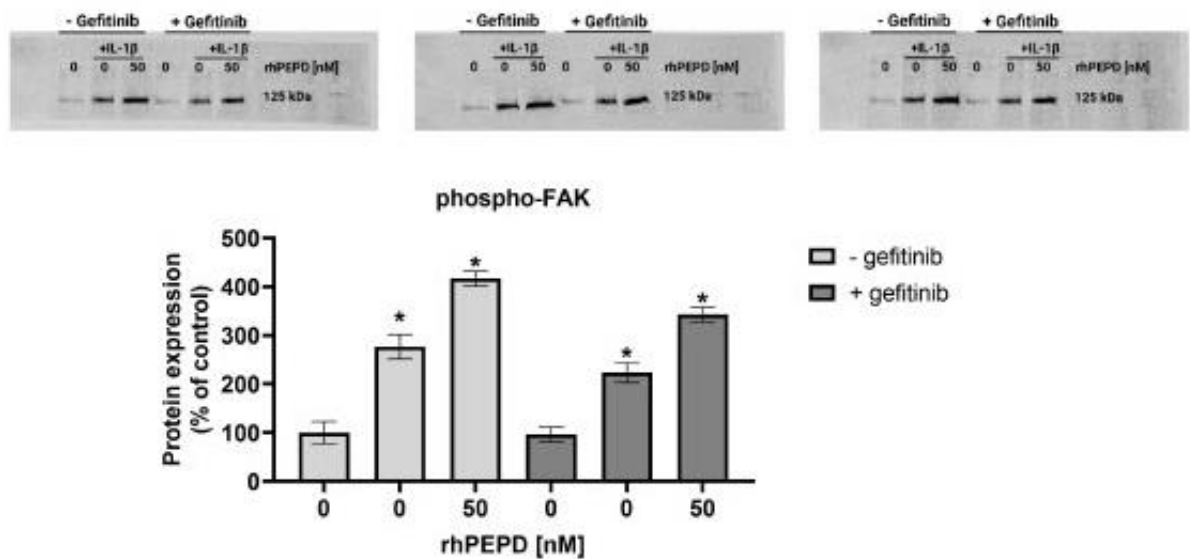
### 4.1. $\beta$ 1 integrin expression





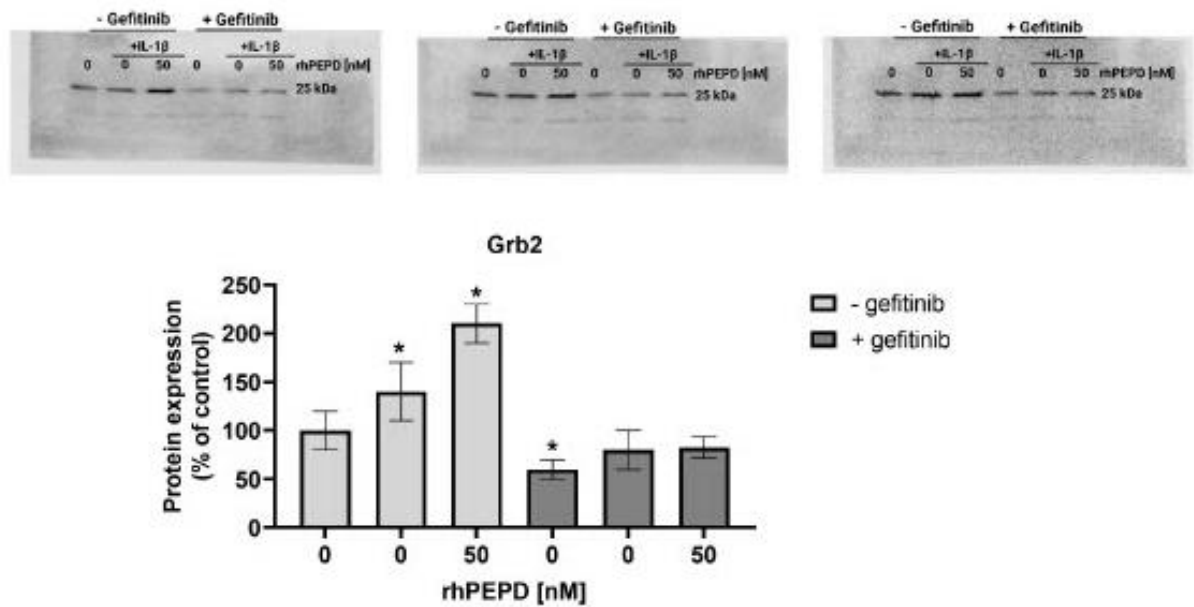
**Figure S25.**  $\beta$ 1 integrin expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P$  < 0.05; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

#### 4.2. Phospho-FAK expression



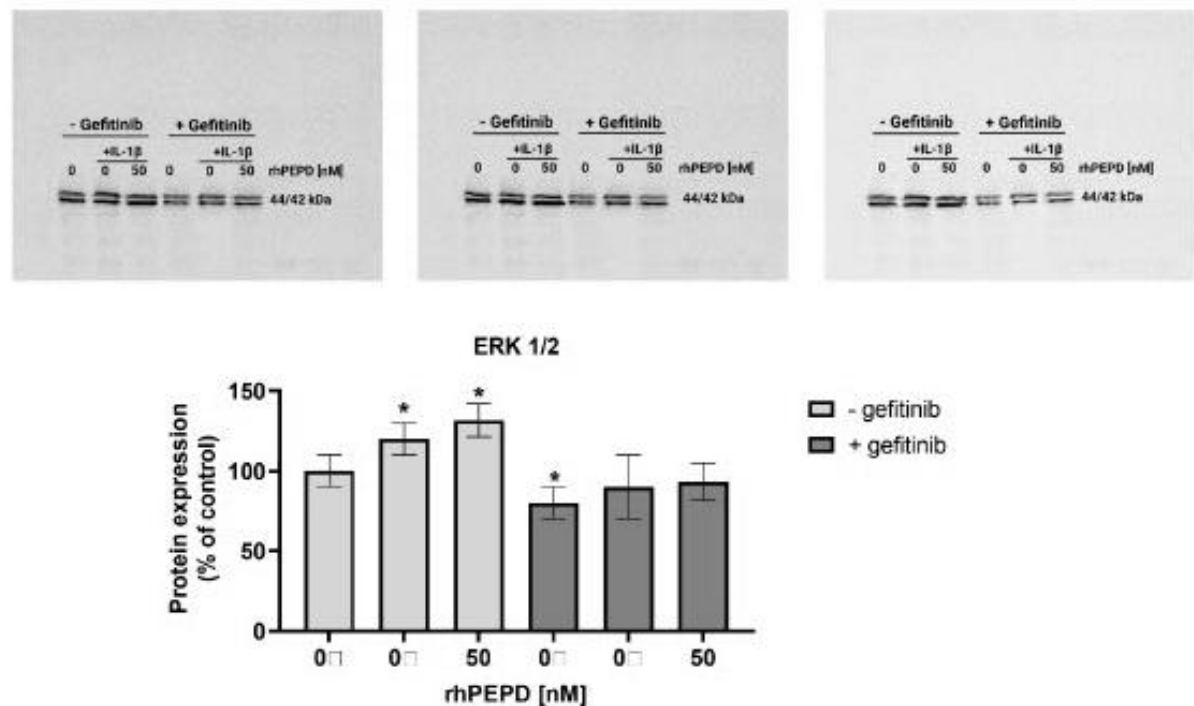
**Figure S26.** Phospho-FAK expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 40 min in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P$  < 0.05; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

### 4.3. Grb2 expression



**Figure S27.** Grb2 expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as \* $P$  < 0.05; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

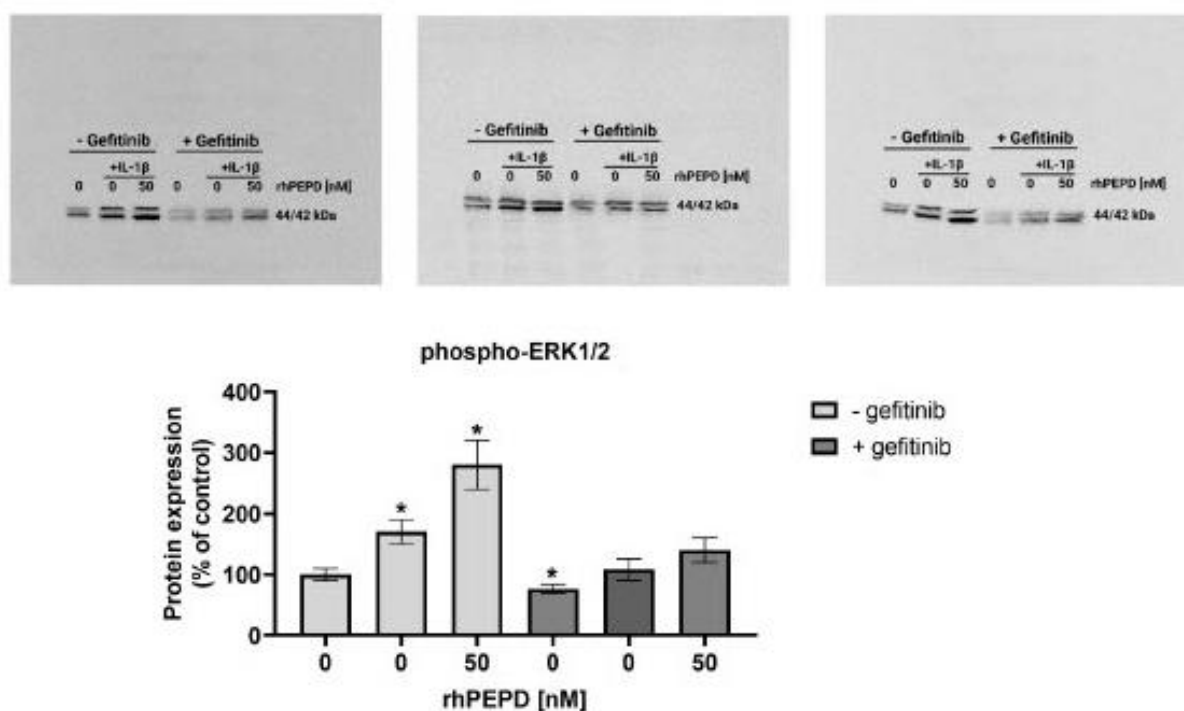
### 4.4. ERK 1/2 expression





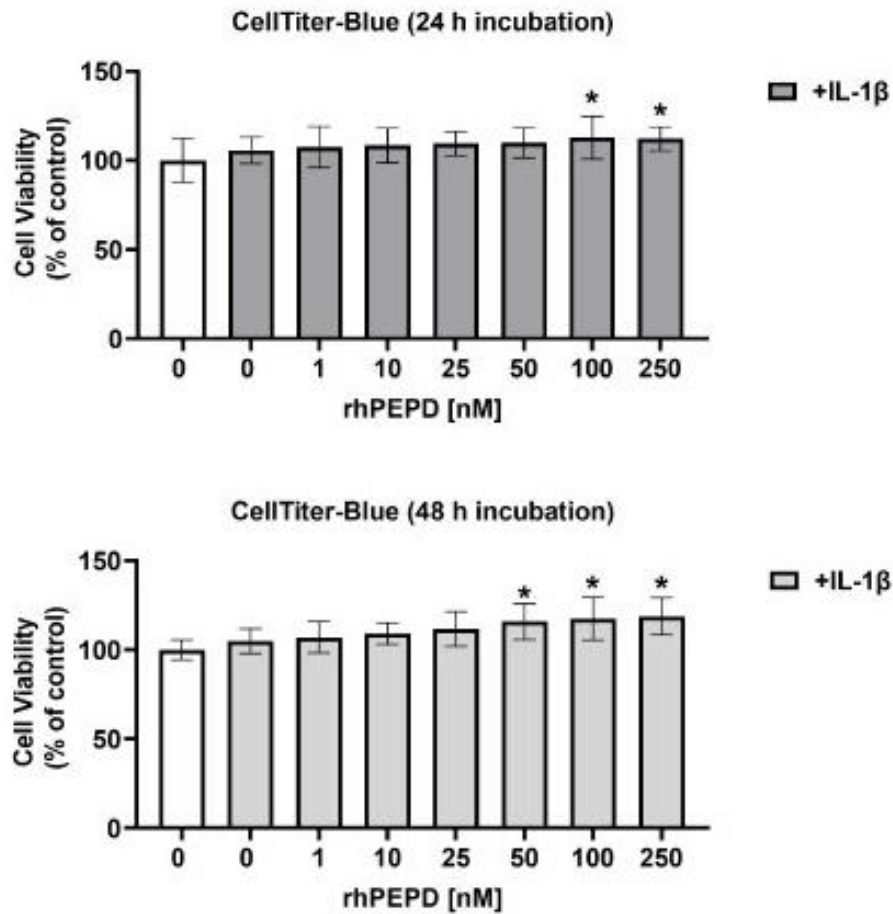
**Figure S28.** Erk1/2 expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 24 h in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as  $*P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

#### 4.5. Phospho-ERK 1/2 expression



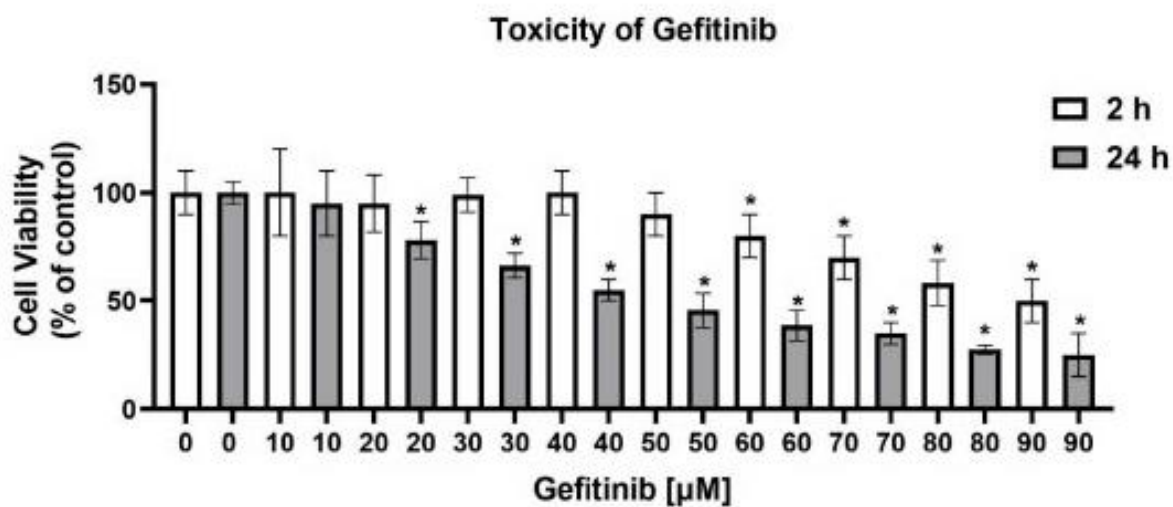
**Figure S29.** Phospho-Erk1/2 expressions in lysates of rhPEPD-treated fibroblasts (rhPEPD, 50 nM) and pretreated with an inhibitor of EGFR (gefitinib, 45  $\mu$ M for 2 h) cultured for 40 min in presence or absence IL-1 $\beta$ . (10ng/ml). GAPDH expression was used as a loading control. The WB bands intensity of representative gels was quantified by densitometry and normalized to GAPDH. The densitometry values represent the mean (% of control)  $\pm$  SD of three experiments. Statistical significances were expressed as  $*P < 0.05$ ; vs. control cells (0 nM of PEPD, without IL-1 $\beta$ ).

## 5. CellTiter-Blue Cell Viability Assay



**Figure S30.** Cell viability of fibroblasts was measured using Cell Titer Blue assay as described in the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI, United States). Cells, seeded at  $5 \times 10^3$  cells/well in a 96-well plate, were submitted to rhPEPD treatment at concentrations of 1–250 nM and IL-1 $\beta$  (10 ng/ml)-for 24 h and 48 h. Briefly, cells were incubated with a resazurin-containing solution at 37°C for 2 h. Absorbance was read on TECAN Infinite® M200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) at 570 and 600 nm as a reference wavelength. The results were presented as a percent of the control value. The mean values  $\pm$  S.D. of three experiments done in duplicates are presented. The statistical significance was calculated vs. control (0 nM of rhPEPD, without IL-1 $\beta$ ) and the results were considered significant at  $*P < 0.05$ .

## 6. The influence of Gefitinib on the viability of fibroblasts



**Figure S31.** The influence of gefitinib on the viability of fibroblasts was measured using MTT test. Cells were treated of Gefitinib at concentrations of 0-90 µM for 2 h and 24 h. The results were presented as a percent of the control value. The mean values  $\pm$  S.D. of three experiments done in duplicates are presented. The statistical significance was calculated vs. control (0 µM Gefitinib) and the results were considered significant at  $*P < 0.05$ .

## Rozdział 12. Zgoda Komisji Bioetycznej

**KOMISJA BIOETYCZNA  
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1

15-089 Białystok

tel. 85 748 54 07

komisjabioetyczna@umb.edu.pl

---

Białystok, dn. 20.10.2022 r.

APK.002.328.2022

Sz. P.

prof. dr hab. Jerzy Pałka

Zakład Chemii Leków

W nawiązaniu do pisma z dn. 18.10.2022 r. dotyczącego doktoratu mgr Weroniki Baszanowskiej o tytule: „*Wpływ pozakomórkowej prolidazy na procesy regeneracyjne w eksperymentalnym modelu gojenia ran oraz zapalenia indukowanego IL-1 $\beta$  w fibroblastach skóry ludzkiej*” informuję, że nie ma w tym przypadku konieczności uzyskiwania zgody Komisji Bioetycznej.

Przedstawiony certyfikat autentyczności i czystości komercyjnej linii komórkowej gwarantuje dochowanie należytej staranności w przestrzeganiu przepisów pozyskania materiału biologicznego, jak też przestrzegania norm etycznych.

Z poważaniem

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej przy UMB

dr n. farm. Krzysztof Chrzanoński



## Rozdział 13. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Białystok, 04.04.2023

**Weronika Baszanowska**

Zakład Chemii Leków  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Mickiewicza 2d, 15-222 Białystok

### Oświadczenie autora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Milyk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>.*

wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na opracowaniu metod badawczych, prowadzeniu części eksperymentalnej badań, analizie statystycznej wyników i ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu, co określam jako 70% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

2. *Baszanowska, W.; Niziol, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horczak, J.; Milyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. Molecules 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>.*

wchodzącej w skład mojej rozprawy doktorskiej polegał na opracowaniu koncepcji metod badawczych, prowadzeniu części eksperymentalnej badań, analizie statystycznej wyników i ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu, co określam jako 70% udziału w przygotowaniu wyżej wymienionej publikacji.

.....

Podpis autora rozprawy doktorskiej (czytelny)

.....  
Podpis promotora (czytelny)

*\*W przypadku każdej z włączonych do cyklu prac zaleca się złożenie oświadczenia przez autora wskazujące na jego merytoryczny oraz procentowy wkład w powstanie pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie danych, wykonanie zestawień statystycznych itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu autora powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej z prac.*

## Rozdział 14. Oświadczenia współautorów rozprawy doktorskiej

Białystok, 04.04.2023

**Prof. dr hab. Jerzy Palka**

Zakład Chemii Leków  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Mickiewicza 2d, 15-222 Białystok

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

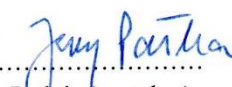
1. *Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Miltyk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu koncepcji pracy, interpretacji uzyskanych wyników oraz edycji manuskryptu.\*

2. *Baszanowska, W.; Nizioł, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horczak, J.; Miltyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. Molecules 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu koncepcji pracy, interpretacji uzyskanych wyników oraz edycji manuskryptu.\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez Panią mgr Weronikę Baszanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

  
.....  
Podpis (czytelny)

\*W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich zaleca się złożenie oświadczenia przez współautora wskazujące na jego merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie danych, wykonanie zestawień statystycznych itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego współautora powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Białystok, 04.04.2023

**Prof. dr hab. Wojciech Miłyk**

Zakład Analizy i Bioanalizy Leków  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Mickiewicza 2d, 15-222 Białystok

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

1. *Baszanowska W., Misiura M., Oscilowska I., Palka J., Miłyk W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu koncepcji pracy, uzyskaniu finansowania przeprowadzonych badań oraz edycji manuskryptu. \*

2. *Baszanowska W., Nizioł M., Oscilowska I., Czyrko-Horczak J., Miłyk W., Palka J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. Molecules 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu koncepcji pracy, uzyskaniu finansowania przeprowadzonych badań oraz edycji manuskryptu. \*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez Panią mgr Weronikę Baszanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

  
.....  
Podpis (czytelny)

*\*W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich zaleca się złożenie oświadczenia przez współautora wskazujące na jego merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie danych, wykonanie zestawień statystycznych itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego współautora powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.*

Białystok, 04.04.2023

**Dr hab. Iłona Ościłowska**

Zakład Analizy i Bioanalizy Leków  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Mickiewicza 2d, 15-222 Białystok

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

*1. Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Miltyk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu metod badawczych, prowadzeniu części eksperymentalnej badań i interpretacji uzyskanych wyników badań oraz przygotowaniu manuskryptu.\*

*2. Baszanowska, W.; Nizioł, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horczak, J.; Miltyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. Molecules 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu metod badawczych, interpretacji uzyskanych wyników badań oraz przygotowaniu manuskryptu.\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez Panią mgr Weronikę Baszanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

*Iłona Ościłowska*

Podpis (czytelny)

*\*W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich zaleca się złożenie oświadczenia przez współautora wskazujące na jego merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie danych, wykonanie zestawień statystycznych itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego współautora powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.*



Rzeszów, 04.04.2023 r.

**Dr n. med. Magdalena Nizioł**

Pracownia Biologii Molekularnej  
Klinika Hematologii  
Uniwersytet Szpital Kliniczny im. F. Chopina w Rzeszowie  
ul. Szopena 2, 35-055 Rzeszów

### Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

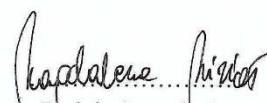
1. *Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Milyk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu metod badawczych, prowadzeniu części eksperymentalnej badań oraz interpretacji uzyskanych wyników badań.\*

2. *Baszanowska, W.; Nizioł, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horeczak, J.; Milyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. Molecules 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na współuczestniczeniu w opracowaniu metod badawczych oraz interpretacji uzyskanych wyników badań.\*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez Panią mgr Weronikę Baszanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopismach naukowych.

  
Podpis (czytelny)

\*W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich zaleca się złożenie oświadczenia przez współautora wskazujące na jego merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie danych, wykonanie zestawień statystycznych itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego współautora powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Białystok, 04.04.2023

**dr Justyna Czyrko-Horczał**

Zakład Chemii Strukturalnej  
Uniwersytet w Białymstoku  
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok

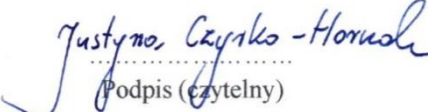
### Oświadczenie współautora

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

*I. Baszanowska, W.; Nizioł, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horczał, J.; Milyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. Molecules 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>.*

wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Baszanowskiej polegał na wyprodukowaniu i oczyszczeniu preparatu rekombinowanej ludzkiej prolidazy wykorzystanej do dalszych badań. \*

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez Panią mgr Weronikę Baszanowską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie cyklu prac opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

  
.....  
(Podpis (czytelny))

*\*W przypadku prac dwu- lub wieloautorских zaleca się złożenie oświadczenia przez współautora wskazujące na jego merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie danych, wykonanie zestawień statystycznych itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego współautora powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.*

## Rozdział 15. Dorobek naukowy

Łączna wartość Impact Factor: 59.914

Łączna liczba punktów MEiN: 1580

### 15.1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. **Praca oryginalna:** Baszanowska, W.; Misiura, M.; Oscilowska, I.; Palka, J.; Milyk, W. Extracellular Prolidase (PEPD) Induces Anabolic Processes through EGFR,  $\beta_1$ -integrin, and IGF-1R Signaling Pathways in an Experimental Model of Wounded Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22, 942. <https://doi.org/10.3390/ijms22020942>. IF: 6.208, MEiN: 140 punktów.
2. **Praca oryginalna:** Baszanowska, W.; Niziol, M.; Oscilowska, I.; Czyrko-Horczak, J.; Milyk, W.; Palka, J. Recombinant Human Prolidase (rhPEPD) Induces Wound Healing in Experimental Model of Inflammation through Activation of EGFR Signalling in Fibroblasts. *Molecules* 2023, 28, 851. <https://doi.org/10.3390/molecules28020851>. IF: 4.927, MEiN: 140 punktów.

Łączna wartość Impact Factor dla cyklu publikacji: 11.135

Łączna liczba punktów MEiN dla cyklu publikacji: 280

### 15.2. Wykaz innych publikacji naukowych

1. Huynh, T.Y.L.; Oscilowska, I.; Szoka, L.; Piktel E., Baszanowska, W.; Bielawska, K.; Bucki, R.; Milyk, W.; Palka, J. Metformin Induces PRODH/POX-Dependent Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022 Jun 6;9:869413. doi: 10.3389/fmolb.2022.869413. IF: 6.113, MEiN: 140 punktów.
2. Niziol, M.; Oscilowska, I.; Baszanowska, W.; Palka, J.; Besio, R.; Forlino, A.; Milyk, W. Recombinant Prolidase Activates EGFR-Dependent Cell Growth in an Experimental Model of Inflammation in HaCaT Keratinocytes. Implication for Wound Healing. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022 Mar 30;9:876348. doi: 10.3389/fmolb.2022.876348. IF: 6.113, MEiN: 140 punktów.

3. Oscilowska, I.; Rolkowski, K.; **Baszanowska, W.**; Huynh, T.Y.L.; Lewoniewska, S.; Niziol, M.; Sawicka, M.; Bielawska, K.; Szoka, P.; Miltyk, W.; Palka, J. Proline Dehydrogenase/Proline Oxidase (PRODH/POX) Is Involved in the Mechanism of Metformin-Induced Apoptosis in C32 Melanoma Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Feb; 21;23(4):2354. doi: 10.3390/ijms23042354. IF: 6.208, MEiN: 140 punktów.
4. Oscilowska, I.; Huynh, T.Y.L.; **Baszanowska, W.**; Prokop, I.; Surazynski, A.; Galli, M.; Zabielski, P.; Palka, J. Proline oxidase silencing inhibits p53-dependent apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Amino Acids*. 2021 Dec;53(12):1943-1956. doi: 10.1007/s00726-021-03013-8. IF: 3.789, MEiN: 100 punktów.
5. Huynh, T.Y.L.; Oscilowska, I.; Sáiz, J.; Niziol, M.; **Baszanowska, W.**; Barbas, C.; Palka, J. Metformin Treatment or PRODH/POX-Knock out Similarly Induces Apoptosis by Reprograming of Amino Acid Metabolism, TCA, Urea Cycle and Pentose Phosphate Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Biomolecules*. 2021 Dec 15;11(12):1888. doi: 10.3390/biom11121888. IF: 6.064, MEiN: 100 punktów.
6. Misiura, M.; Guszczyn, T.; Oscilowska, I.; **Baszanowska, W.**; Palka, J.; Miltyk, W. Platelet-Rich Plasma Promotes the Proliferation of Human Keratinocytes via a Progression of the Cell Cycle. A Role of Prolidase. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan 19;22(2):936. doi: 10.3390/ijms22020936. IF: 6.208, MEiN: 140 punktów.
7. Lewoniewska, S.; Oscilowska, I.; Huynh, T.Y.L.; Prokop, I.; **Baszanowska, W.**; Bielawska, K.; Palka, J. Troglitazone-Induced PRODH/POX-Dependent Apoptosis Occurs in the Absence of Estradiol or ER $\beta$  in ER-Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Clinical Medicine*. 2021 Oct 10;10(20):4641. doi: 10.3390/jcm10204641. IF: 4.964, MEiN: 140 punktów.
8. Misiura, M.; **Baszanowska, W.**; Oscilowska, I.; Palka, J.; Miltyk, W. Prolidase Stimulates Proliferation and Migration through Activation of the PI3K/Akt/mTOR

Signaling Pathway in Human Keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Dec 3;21(23):9243. doi: 10.3390/ijms21239243. IF: 6.208, MEiN: 140 punktów.

9. Huynh, T.Y.L.; Zareba, I.; **Baszanowska, W.**; Lewoniewska, S.; Palka, J. Understanding the role of key amino acids in regulation of proline dehydrogenase/proline oxidase (prodh/pox)-dependent apoptosis/autophagy as an approach to targeted cancer therapy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020 Mar;466(1-2):35-44. doi: 10.1007/s11010-020-03685-y. IF: 3.396, MEiN: 70 punktów.

### 15.3. Wykaz doniesień zjazdowych

1. Huynh T. Y. L., Ościłowska I., Nizioł M., Saiz Jorge, Barbas C., **Baszanowska W.**, Lewoniewska S., Palka J. Multi-omics approach to understand the role of PRODH/POX in regulation of apoptotic pathway in MCF-7 breast cancer cells. Next-Generation Protein Analysis and Detection, Ghent, Belgium, 30-31.05.2022.
2. Nizioł M., Oscilowska I., **Baszanowska W.**, Palka J., Miltyk W. Recombinant human prolidase wild-type and mutants differentially activate EGFR-mediated cell proliferation of HaCaT keratinocytes under conditions of IL-1 $\beta$ -induced inflammation. EMBO Workshop 2022. Reversible phosphorylation, signal integration and drug discovery. Vouliagmeni Greece. 22-26.05.2022.
3. Nizioł M., Oscilowska I., **Baszanowska W.**, Palka J., Miltyk W. Recombinant human prolidase stimulates EGFR-dependent keratinocytes proliferation in the presence of IL-1 $\beta$ . EMBO Workshop. Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology. Virtual. 26-29.04.2022.
4. Huynh T.Y.L., **Baszanowska W.**, Lewoniewska S., Oscilowska I., Palka J. Proline dehydrogenase/ Proline Oxidase knockdown inhibits p53dependent

apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. EMBO Workshop "Systems approaches in cancer". Split, Croatia 21-26.09.2021.

5. Lewoniewska S., Oscilowska I., Huynh TYL., **Baszanowska W.**, Prokop I., Palka J. The impact of estrogen receptor activation on troglitazone- induced apoptosis in breast cancer cells. 4th European Life Sciences | PhD & Postdocs Symposium "Exploring Life Dynamics: in and out of equilibrium", Milan on-line, 12-14.05.2021.
6. **Baszanowska W.**, Huynh T.Y.L., Lewoniewska S., Zaręba I., Palka J. Metformina indukuje PRODH/POX-zależną apoptozę/autofagię w komórkach raka piersi MCF-7. III Poznańska Konferencja "Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia". Poznań, konferencja on-line, 04-05.05.2020.
7. Lewoniewska S., Prokop I., Huynh T.Y.L., **Baszanowska W.**, Zareba I. Estrogens regulate PRODH/POX-dependent apoptosis. III Poznańska Konferencja "Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia". Poznań, konferencja on-line, 04-05.05.2020.
8. Huynh T.Y.L., **Baszanowsk W.**, Lewoniewska S., Zareba I., Palka J. The mechanism for proline dehydrogenase/proline oxidase-dependent regulation of apoptosis/autophagy in MCF-7 breast cancer cells. III Poznańska Konferencja "Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia". Poznań, konferencja on-line, 04-05.05.2020.
9. **Baszanowska W.**, Huynh T.Y.L., Zareba I., Lewoniewska S., Cywoniuk A., Petelska E., Palka J. Metformin inhibits collagen biosynthesis facilitating proline availability for PRODH/POX-dependent apoptosis/autophagy in MCF-7 breast cancer cells. XVIII International Congress of Medical Sciences. Sofia, Bulgaria. 09-12.05.2019.
10. Lewoniewska S., **Baszanowska W.**, Huynh TYL., Zareba I., Petelska E., Surazyński A., Palka J. AMPK induces apoptosis/autophagy in breast cancer

MCF-7 cells through proline dehydrogenase/proline oxidase (PRODH/POX). XVIII International Congress of Medical Sciences. Sofia, Bulgaria. 09-12.05.2019.

11. Zaręba I., **Baszanowska W.**, Lewoniewska S., Huynh T.Y.L., Prokop I., Rysiak, E., Palka J. Down-regulation of estrogen receptor function facilitate proline dehydrogenase/proline oxidase-dependent apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. XVIII International Congress of Medical Sciences. Sofia, Bulgaria. 09-12.05.2019.

12. Huynh T. Y. L., Lewoniewska S., **Baszanowska W.** POX-dependent inhibition of P53 expression in MCF-7 breast cancer cell. XVIII International Congress of Medical Sciences. Sofia, Bulgaria. 09-12.05.2019.

13. Huynh T.Y.L., **Baszanowska W.**, Lewoniewska S., Zareba I., Palka J. Down-regulation of p53 expression in proline dehydrogenase/proline oxidase (PRODH/POX) - dependent pathways in MCF-7 breast cancer cell. 2019 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB), Seoul, 09.30-10.02.2019.

14. Zaręba I., Prokop I., **Baszanowska W.**, Celinska-Janowicz K., Surazynski A., Milyk W., Petelska E., Cywoniuk A., Palka J. The effect of estradiol on proline dehydrogenase/proline oxidase-mediated apoptosis in breast cancer MCF-7 cells. IX Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 13-15.09.2018.

#### **15.4. Wykaz innych aktywności naukowych**

1. Współwykonawca projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (N/NCN/OP/18/001/2214) pt. „Identyfikacja mechanizmu przeciwnowotworowego działania metforminy, jako eksperymentalny kierunek doskonalenia farmakoterapii raka”. Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska 2018-2022.

2. Kierownik projektu statutowego (SUB/2/DN/19/002/2214/2020) pt. „Ocena mechanizmu proapoptotycznego działania witaminy D3 i witaminy K w komórkach czerniaka”. Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska 2019-2020.
3. Współwykonawca projektu statutowego (SUB/2/DN/19/001/2214) pt. „Ocena mechanizmu proapoptotycznego działania metforminy w komórkach czerniaka”. Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Polska 2019-2020.
4. Staż w Centrum Neuronauki i Biologii Komórki. Uniwersytet w Coimbrze, Portugalia 01.10-30.11.2019.