

Streszczenie w języku polskim

Mgr Weronika Baszanowska

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-IR 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 gefitinib 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 obecności 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.