

Lublin, 24.06.2022

Prof. Anna Gumieniczek

Opinion for the thesis for acquiring scientific degree doctor
on the topic

"The effect of extracellular prolidase on repair processes in experimental models of
inflammation and mechanical damage in HaCaT keratinocytes"

of Magdalena Nizioł

Faculty of Medicine with the Division of Dentistry and Division of Medical Education in English

Medical University of Białystok

Magdalena Nizioł's doctoral thesis was prepared under the NCN OPUS grant no. 2017/25/B/NZ7/02650 and the EU project no. PO WER.03.02.00-00-I051/16 (Operational Program Knowledge Education Development 2014-2020). The dissertation is dedicated to examining the influence of extracellular prolidase on repair processes in the experimental model of inflammation and mechanical damage in the HaCaT keratinocytes. The assessed dissertation consists of 3 scientific articles: the first is a review based on the literature while the next two are original papers presenting the results of the experiments conducted by the PhD candidate.

The presented review (P1) is a good introduction to the experiments planned by the Doctoral student. This work presents a conscientious analysis of the literature on the biological roles of prolidase and the possible use of prolidase-related pathways in the treatment of various diseases. Prolidase hydrolyzes the imide linkages of peptides containing C-terminal proline or hydroxyproline, and its physiological substrates are peptides derived mainly from the proline-containing proteins, including collagen. Thus, the enzymatic function of prolidase enables the delivery of proline or hydroxyproline, which play important roles in intracellular signaling and energy processes, promoting DNA synthesis and proliferation. Moreover, prolidase presents biological properties independent of its enzymatic activity and plays an important regulatory role in the function of other biological molecules. It is, inter alia, a ligand for EGFR and HER2 receptors that regulate signaling pathways dependent on these receptors, such as PI3K/Akt/mTOR, ERK1/2 and JAK/STAT3. Prolidase is also a regulator of the p53 protein, which is a key tumor suppressor protein in cancer cells. It has been shown to regulate both the transcriptional and non-transcriptional functions of p53. Consequently, the research on the roles and functions of prolidase may be important in the

development of new therapeutic approaches in many diseases, including prolidase deficiency, certain cancers, metabolic disorders and viral infections. Prolidase also plays a regulatory role in the regeneration processes of tissues in inflammation or after their damage that can be important, for example, in regenerative medicine.

Two original publications included in the dissertation (P2 and P3) present the results of the PhD student's research on prolidase activity in experimental models of wound repairing in inflammation induced by interleukin 1 β (IL-1 β) and in mechanical damage, using HaCaT keratinocytes. Wound repairing begins with haemostasis, then inflammation, followed by tissue proliferation and remodeling. In the microenvironment of the damaged tissue, many biological factors and types of cells are involved in these processes. These include keratinocytes which proliferate under the influence of growth factors and migrate to the "wounded" area. Prolidase plays a significant role in cell proliferation, migration and collagen biosynthesis, as has been demonstrated in many cells and experimental models. These processes are regulated, inter alia, by the signaling pathway induced by the $\beta 1$ -integrin receptor, as well as insulin-like growth factor 1 (IGF-1), the strongest stimulator of collagen biosynthesis. The literature also includes studies confirming the role of prolidase as a ligand of the EGFR receptor responsible for the activation of pro-survival signaling pathways.

The aim of the research conducted by the PhD candidate was to elucidate the molecular mechanisms of prolidase action in regenerative processes in HaCaT keratinocytes in experimental models of inflammation and mechanical cell damage. The biological effects of prolidase on skin cells were assessed in relation to its potential use in wound healing and in the diseases caused by prolidase deficiency, and the development of a possible therapy for these conditions. The effects of prolidase on cell proliferation, cell cycle, collagen biosynthesis and proteins in signaling pathways were assessed. RT-qPCR techniques, Western immunoblotting and immunocytochemical techniques with the confocal microscopy were used in the conducted experiments. In order to assess the effect of extracellular prolidase on the metabolism of amino acids in keratinocytes, chromatographic and metabolomic analyzes were also performed. Recombinant prolidase and its mutated variants were used as the basis for the project.

In the conducted researches, the PhD student found that prolidase in the presence of IL-1 β significantly increases the proliferation of keratinocytes through EGFR signaling. Through the use of an EGFR inhibitor, gefitinib, it has been demonstrated that prolidase binds to EGFR on the surface of keratinocytes and that activation of EGFR by prolidase is essential in keratinocyte migration. By analyzing the expression of selected proteins, the Doctoral

student confirmed the prolidase-dependent increase in the expression of $\beta 1$ and IGF-1R integrin receptors, and, at the same time, the decrease in the expression of the nuclear factor NF- $k\beta$, which is an inhibitor of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ expression of the type I collagen subunits. Thus, the obtained results indicate a significant role of prolidase in cell proliferation, migration and collagen biosynthesis. In her dissertation, the PhD candidate unequivocally states that this is the first report on the relationship between prolidase and IL-1 β in the proliferation of keratinocytes, a process that may be very important in wound healing. The presented results bring new information to science and constitute a valuable contribution to the development of preclinical research aimed at developing new therapies for patients with prolidase deficiency, which confirms the purposefulness of the presented research.

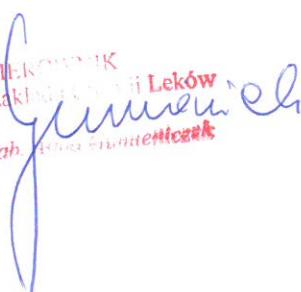
The assessed doctoral dissertation has a volume of 118 pages. It includes an essay prepared in English (abstract also in Polish) and 3 scientific articles published in English. The articles come from journals with a high impact factor of a total of 17,092 and a total of MEiN points equal to 420. The total scientific output of the PhD student includes 27 scientific articles with a total value of IF 73.484 and 1867 MEiN points, as well as 22 reports presented at scientific conferences.

The text of the essay has been divided into chapters, and then into sub-chapters, in a manner typical for scientific papers, which organizes the content and facilitates reading. In the introduction, the Author describes the most important functions of prolidase, including its participation in the regulation of various signaling pathways, especially those related to EGFR, and their clinical implications. Then, She discusses the main purpose of the work and describes 4 specific goals. The entire introduction is written legibly and clearly, in a way focused on the main topic of the work. As a whole it is coherent and understandable, the aim of the work is clearly and legibly formulated, and the consecutive stages are logically planned. In the next part, the Doctoral student describes the materials and methods, including the antibodies, the procedures for obtaining the recombinant prolidase, culturing the HaCaT keratinocytes, assessment the viability and proliferation of keratinocytes, and the immunocytochemical, microscopic and statistical techniques used during experiments. In the following parts: "Results", "Discussion" and "Conclusions", the Author discusses the results of her experiments, extending the scope of information presented in the previous chapters of the essay. The description is correct, legible and thoughtful. Conclusions are directly derived from the results obtained. They are clearly formulated and, undoubtedly, bring novelty to both science and practice.

The next part of the thesis contains printouts of 3 works (P1-P3) that are the basis of the doctoral dissertation and abstracts in English and Polish, which contain the most important information about the conducted research. The bibliography contains 106 items of scientific articles arranged in the order of their quotation in the essay, half of which have appeared in the last 10 years. The PhD student's participation in the preparation of the presented works is leading. In all three works She is the first author, and her percentage share ranges from 65% to 85%. The first two articles were written with the support of one promoter, and the third with the support of both promoters. Relevant statements of the Author and Co-authors of the works included in the dissertation, meeting the criteria of including multi-author publications in the cycle presented as a doctoral dissertation, were placed successively.

Summing up, I would like to emphasize that the assessed dissertation makes a very positive impression. It is based on publications in high-impact journals and brings important novelty to the medical and health sciences. I would like to conclude that the Doctoral Student, while conducting research, and then during the preparation of her dissertation, demonstrated the ability to plan and conduct the research, critically interpret the results obtained and describe them in the form of scientific publications. I would like to state that the doctoral dissertation submitted for my opinion brings important aspects to science, meeting all the requirements set out in art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r., poz. 478) and may be the basis for awarding a doctoral degree in the field of medical and health sciences, and in the discipline of medical sciences. Therefore, I present to the Senate of the Medical University of Białystok a request for admission of Magdalena Nizioł to further stages of the procedure aimed at awarding the academic degree of doctor.

Lublin, 24-06-2022

Kierownik Katedry i Zakładu Leków
Katedry i Zakładu Leków
Prof. dr hab. Anna Gnatkowska


Lublin, 24.06.2022

Prof. dr hab. Anna Gumieniczek

OCENA

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Nizioł

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lublin, 24.06.2022

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemicii Lekowej
Anna Gumieniczek
Prof. dr hab. Anna Gumieniczek