



Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania

Wrocław, 14. września 2022 r.

Dr hab. inż. Marcin Poręba, prof. uczelni

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej

Łukasiewicza 2, 401A, 50-371 Wrocław

Tel: 795 350 888; E-mail: marcin.poreba@pwr.edu.pl

Rada Dyscypliny Nauki Biologiczne
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Laury Moskalik pt. „Analyzing the effects of tissue kallikrein 14 on wound healing by modulating the skin fibroblast secretome”

Praca doktorska Pani mgr Laury Moskalik została wykonana w Katedrze Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod opieką Pana profesora Jana Potempy oraz Pana doktora Tomasza Kantyki. Celem recenzowanej przez mnie pracy była analiza wpływu ludzkiej proteazy serynowej, kalikreiny 14 (KLK14) na proces gojenia się ran poprzez modulację sekretomu fibroblastów ludzkiej skóry w badaniach *in vitro*.

Praca doktorska została napisana w języku angielskim i liczy 191 stron. Od strony edytorskiej praca została sporządzona bardzo starannie. Na 3. stronie Autorka umieściła spis treści, który informuje czytelnika, że praca, poza wspomnianym spisem, składa się z dwunastu rozdziałów, tj. Słowniczek, Abstrakt, Streszczenie w języku polskim, Wstęp teoretyczny, Cel pracy, Materiały, Metodologia badawcza, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Wyniki uzupełniające oraz Bibliografia. Ponadto praca liczy 51 rycin przedstawiających schematy badawcze, wyniki badań oraz proponowane mechanizmy badanych procesów biologicznych. Ponadto praca zawiera 10 tabel; wszystkie umieszczone w Metodologii badawczej. Na uwagę zasługuje fakt, że praca zawiera aż 427 pozycji bibliograficznych, co świadczy o doskonałym przygotowaniu merytorycznym Autorki i jej rozległej wiedzy w badanej tematyce. Co więcej, wiele z tych pozycji bibliograficznych jest umiejętnie wpleciona w dyskusję wyników, gdyż nierzadko stanowią one punkt wyjścia do badań Autorki, o czym napiszę w dalszej części recenzji.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie najpierw ocenić pracę pod kątem edytorskim. Praca napisana jest bardzo starannie i w sposób przejrzysty i logiczny



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



przeprowadza czytelnika przez badania Autorki. Opisywane eksperymenty oraz wyniki ilustrowane są wysokiej jakości rycinami. Zgodnie z dobrym zwyczajem edytorskim, ryciny są dokładnie podpisane, dzięki czemu są zrozumiałe, nawet jeśli miałyby być analizowane i interpretowane w oderwaniu od głównego tekstu. Autorka nie uniknęła jednak drobnych potknięć językowych i edytorskich, które pozwalam sobie wymienić poniżej. Spieszę jednak podkreślić, że potknięcia te w żaden sposób nie wpływają na przejrzystość pracy i jej pozytywny odbiór.

- **strona 10** – W Słowniczku zabrakło pełnego rozwinięcia skrótu qPCR. Jest „real-time quantitative” a powinno być np. „real-time quantitative reverse transcription PCR”.

- **strona 13** – Odniosłem wrażenie, że duża część tego Streszczenia (w języku polskim) została automatycznie przetłumaczona z Abstraktu napisanego nienaganną angielszczyzną. Efektem tego jest pojawienie się kilku niefortunnych wyrażen, jak np. „kalikreiny tkankowe (...) składają się z piętnastu członków”, „Nasza analiza cytometrii przepływowej”, „w sposób stężeniowo-zależy”, „KLK14 jest regulowana w górę i w dół”, „zdarzenie sygnalizacyjne”. Dodatkowo w przypadku określenia „KLK14 jest regulowana w górę i w dół” warto napisać czy ta regulacja dotyczy poziomu mRNA, ilości białka czy jego aktywności katalitycznej; a może wszystkich czynników jednocześnie?

- **strona 18** – Napisano „lamina” a powinno być „laminA”

- **strona 40** – Autorka wymieniła m.in. odczynniki chemiczne i biochemiczne użyte w trakcie badań, jednak brak informacji o ich czystości. Zakładam się, że były to odczynniki z przeznaczeniem do biologii molekularnej.

- **strona 45** – „rcf” jako skrót od Relative Centrifugal Force powinien być napisany wielkimi literami: RCF

- **strona 45** – „When full cell confluency was reached...” Zazwyczaj w literaturze można spotkać zwrot: „Cells were grown until confluent” lub „Cells (were harvested) at confluency” co zazwyczaj oznacza, że komórki zostały zebrane/pasażowane kiedy zajmowały 70-80% powierzchni płytki, a więc nadal były w fazie logarytmicznego wzrostu. Wyrażenie „full cell confluency” może mylnie oznaczać, że komórki były zebrane w momencie kiedy zajmowały 100% powierzchni płytki, a więc już po zakończeniu fazy logarytmicznego wzrostu, co nierzadko wpływa na ich morfologię i biochemię. Jednak Autorka tylko dwukrotnie w pracy użyła takiego sformułowania (strona 46).



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



- **strona 45** – Wyrażenie „...by adding 200 nM KLK14 (...) and 10 μ M PAR-1 substrate” może oznaczać, że te reagenty zostały zmieszane w takich właśnie stężeniach i ich końcowe stężenie jest inne. Konwencja takiego zapisu nie musi być jednak niepoprawna, jeśli Autorka zaznaczy, że wartości stężeń umieszczonych w pracy dotyczą stężeń końcowych.

- **strona 46** (i inne) – Jest „in 37°C” a powinno być „at 37°C”, ponieważ wartość temperatury jest punktem na skali, więc stosujemy przyimek „at”.

- **strona 46** – „Subsequently, the RFU/second values at 60 min were recorded and used for analysis” Czy te wykresy przyrostu fluorescencji w funkcji czasu były liniowe? Czasami przy wydłużonym czasie pomiaru, wykres się zakrzywia i lepiej jest wyznaczyć wartość RFU/s obliczając pochodną tego przyrostu na jego liniowym odcinku, niż mierzyć wartości RFU/s na początku i na końcu pomiaru. *Uwaga bardziej merytoryczna, niż edytorska.*

- **strona 46** – Nie ma potrzeby za każdym razem wspominać, że komórki HSF otrzymano of Pani prof. Justyny Drukali. Autorka określiła pochodzenie i źródła materiałów w Rozdziale 7 (Materiały). Podobnie z inhibitorami od prof. Adama Lesnera.

- **strona 47** – Jest „0.3 rcf” a powinno być „300 RCF”.

- **strona 70** – Jest „if KLK may able to induce...”, a można napisać “whether KLK might be able to induce...”.

- **strona 71** – W ostatnim zdaniu Autorka napisała „KLK may be able to release (...)”, a przecież przeprowadzony eksperyment pokazał, że „KLK is able to release (...)”.

- **strona 83** – Brak odnośników w tekście do ryciny 21A. I podobnie dla 22A, 28A, 28C, 28E, 29A oraz kilku innych.

- **strona 84** – Rycina 21A przedstawia te same dane (zbiorczo), które przedstawiono na rycinach od 21B do 21E. W mojej ocenie powinno się unikać dublowania prezentowanych danych, choć w pełni rozumiem motywację Autorki, gdyż zbiorcza rycina 21A nie pokazuje danych tak dokładnie jak Ryciny 21B-21D. Podobnie sytuacja wygląda na rycinach 14, 15, 22, 23, 24, 30, 31

- **strona 96** – Rycina 26. Moim zdaniem nie ma potrzeby dublowania podpisów poszczególnych wykresów. Należy je podpisać albo A, B, C, albo TOP PANEL, MIDDLE PANEL, BOTTOM PANEL – w zależności od odnośników wykorzystanych w tekście głównym. Ta ogólna uwaga dotyczy kilku rycin, np. ryciny 27 gdzie mamy LEFT (A) oraz RIGHT (B).



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



- **strona 103** – Brak odnośnika do ryciny 30A. Poza tym odnośnik do ryciny 30E pojawia się w tekście przed odnośnikami do rycin 30B-30D.

W warstwie edytorskiej zabrakło mi podsumowania dorobku naukowego Autorki, tj. informacji czy wyniki zamieszczone w pracy doktorskiej zostały już opublikowane lub przedstawione na konferencjach naukowych oraz czy Autorka odbyła staże naukowe lub nawiązała współpracę z innymi ośrodkami.

W drugiej części recenzji pragnę odnieść się do merytorycznej części pracy. Badania Autorki skupiają się na poznaniu roli kalikreiny 14 w procesie gojenia się ran poprzez modulację sekretomu fibroblastów. Hipoteza badawcza zakłada, że proces ten zachodzi na drodze pobudzania uwalniania (sekrecji) interleukin 6 (IL-6) i 8 (IL-8) oraz chemokiny CXCL1 w fibroblastach ludzkiej skóry przez katalitycznie aktywną KLK14. Modelem badawczym były m.in. komórki fibroblastów ludzkiej skrót (HSF), unieśmiertelnione keratynocyty HaCaT oraz katalitycznie aktywna i nieaktywna kalikreina 14. Zestaw narzędzi badawczych uzupełniły rekombinowane białka, agoniści i antagoniści receptorów aktywowanych proteazami (ang. PAR), przeciwciała oraz wybrane odczynniki chemiczne. Pracę rozpoczyna obszerny wstęp literaturowy, w którym Autorka opisuje podstawy molekularne procesu gojenia się ran, a następnie przedstawia rolę wybranych cytokin w tym procesie. Autorka nie pominęła również roli receptorów aktywowanych przez proteazy (ang. PAR, protease-activated receptors) w procesie naprawy tkanek. W kolejnym podrozdziale czytelnik spotyka się z opisem kalikrein, czyli grupy 15 strukturalnie podobnych proteaz serynowych, które wykazują chymo- i trypsyno-podobną specyficzność substratową. Enzymy te odgrywają ogromną rolę w fizjologii narządu skóry. Na szczególną uwagę zasługuje jednak kalikreina 14, która charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji w skórze w porównaniu do innych narządów. Mimo że kalikreiny są ważnymi graczami w procesie gojenia się ran, ich nadprodukcja i co za tym idzie nadaktywność katalityczna może wspomagać proces nowotworzenia, o czym Autorka również wspomina. Należy zaznaczyć, że we wstępie teoretycznym Autorka odnosi się do oryginalnych prac naukowych, które stanowiły kamienie milowe w opisywanej tematyce. Autorka podjęła więc trud dotarcia do tych prac, co wskazuje na Jej solidny warsztat badawczy. W następnym rozdziale Autorka



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



przedstawia cel pracy oraz wymienia siedem zadań badawczych, od analizy poziomu ekspresji KLK14 po badania funkcjonalne z wykorzystaniem różnych wariantów tej proteazy. Realizacja tych zadań pozwoliła na rzetelną weryfikację hipotezy badawczej. Metodologia pracy opisana jest z dużą starannością. Protokoły badawcze przygotowane są bardzo dokładnie, więc przeprowadzenie wybranych eksperymentów nie stanowiłoby problemu dla innych naukowców.

Rozdział „Wyniki” rozpoczyna się od określenia poziomu ekspresji KLK14 w wybranych modelach badawczych (HSF, PGHF, HaCaT oraz TIGK) oraz określeniem wpływu katalitycznie aktywnej KLK14 na morfologię komórek fibroblastów oraz lokalizację wybranych białek strukturalnych (F-aktyna oraz wimentyna). Następnie Autorka wykorzystała cytometrię przepływową, by pokazać, że KLK14 potrafi odzepiać od powierzchni płytki adherentne komórki fibroblastów nie wywołując w nich apoptozy, ani żadnej innej programowanej ścieżki śmierci. Co więcej, zastosowanie nieaktywnej KLK14 pozwoliło stwierdzić, że proces odzepiania komórek jest w pełni zależny od katalitycznej aktywności proteazy. Dalej pokazano, że odzepione komórki potrafią z powrotem zasiedlić płytkę oraz proliferować pod wpływem czynników wzrostu, co oznacza, że zachowują swoją funkcjonalność. W następnym etapie Autorka badała wpływ KLK14 na sekrecję i poziom ekspresji wybranych cytokin, o których wiadomo, że biorą udział w procesie gojenia się ran, tj. IL-6, IL-8 oraz CXCL1. Do analizy wybrano katalitycznie aktywną wersję KLK14 oraz jej nieaktywną formę z mutacją punktową w miejscu aktywnym (Ser220Ala). W badaniach wykorzystano także KLK14, której aktywność zahamowano przy pomocy nieodwracalnego, kowalencyjnego inhibitora. Badania pokazały, że katalitycznie aktywna KLK14 wpływa zarówno na zwiększenie poziomu ekspresji, jak i na sekrecję badanych cytokin i co więcej proces ten jest zależny od stężenia użytego enzymu. W kolejnych krokach, Autorka podjęła próbę określenia wpływu hydrolizy receptorów typu PAR przez KLK14 na sekrecję badanych cytokin. Doskonałym narzędziem badawczym było tutaj również wykorzystanie agonistów i antagonistów poszczególnych receptorów PAR. W efekcie prowadzonych badań okazało się, że KLK14 w kombinacji z antagonistami może osłabiać (IL-6, IL-8) lub zwiększać (CXCL1) sekrecję (oraz poziom ekspresji) badanych cytokin. W kolejnych badaniach Autorka określiła wpływ poszczególnych cytokin na kinetykę procesu gojenia się ran w modelu migracji komórkowej *in vitro* z wykorzystaniem komórek HaCaT. Do tego celu wykorzystano ludzkie



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



rekombinowane cytokiny: rhIL-6, rhIL-8 oraz rhCXCL1. Autorka pokazała, że proces migracji komórkowej jest niemal liniowo zależny od stężenia IL-6, przy czym najlepsze efekty uzyskano dla stężenia 10 ng/ml. Zastosowanie IL-8 również dało pozytywną korelację, ale tylko do stężenia 5 ng/ml. Przy wyższym stężeniu proces nie zachodził. Podobne wyniki uzyskano dla CXCL1, ale tylko w zakresie stężenia 0.01-0.1 ng/ml. Dla wyższych stężeń CXCL1 proces migracji zachodził wolniej lub nie zaszedł wcale. Badania te wykonano także z wykorzystaniem medium hodowlanego, które pobrano z hodowli fibroblastów inkubowanych z KLK14. Badania pokazały, że migracja komórkowa zaszła w tych dołkach, gdzie wykorzystano medium inkubowane z katalitycznie aktywną KLK14 czego wynikiem była sekrecja badanych cytokin. Eksperyment ten zakończył badania Doktorantki. W następnym rozdziale Autorka przeprowadza obszerną dyskusję i analizę wyników, odnosząc się do badań literaturowych, dzięki czemu wyniki uzyskane przez Autorkę są umieszczone we właściwym kontekście i z przyjemnością czyta się ten rozdział. Pracę doktorską kończą Wnioski oraz Badania uzupełniające dotyczące wpływu poszczególnych agonistów receptorów PAR na sekrecję IL-6.

Pomimo faktu, że praca została napisana bardzo czytelnie a uzyskane wyniki zostały obszernie skomentowane przez Doktorantkę, poniżej przedstawiam listę pytań do dyskusji podczas publicznej obrony pracy.

Pytania:

1. **Strona 46.** Czy komórki były traktowane 400 nM KLK14 oraz 600 nM SPINK6 w tym samym czasie, czy sekwencyjnie, tj. najpierw inhibitor SPINK6 a następnie KLK14? A może KLK14 i SPINK6 były najpierw razem pre-inkubowane?
2. Czy fizjologiczne stężenie KLK14 uzasadnia zastosowanie stężeń 50 nM, 100 nM i 200 nM w badaniach *in vitro*?
3. Sekrecja IL-6 wzrasta proporcjonalnie do stężenia KLK14 (rycina 14), jednak sekrecja IL-8 dla 200 nM KLK14 i 100 nM KLK14 znacząco się różni (ok. 5-6-krotnie; rycina 24). Czy Autorka mogłaby wyjaśnić skąd taka różnica? Dlaczego ten proces nie jest liniowy?



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Wrocław, 14. września 2022 r.

4. Dlaczego badania opisane w punktach 9.1. do 9.3. nie zostały również wykonane na mutancie katalitycznym KLK14 Ser220Ala, a jedynie na enzymie poddanym dezaktywacji termicznej? Czy ten model został stworzony w trakcie badań?
5. Czy Autorka pracy może podjąć próbę wyjaśnienia dlaczego KLK14 w parze z antagonistą PAR-1 osłabia sekrecję (i ekspresję) IL-6 i IL-8, jednocześnie zwiększając sekrecję CXCL1?
6. Dlaczego wyniki migracji komórkowej dla poszczególnych cytokin tak bardzo się różnią? Czy IL-8 oraz CXCL1 mogą pełnić plejotropową funkcję w tych procesach, zależną od ich stężeń?

Podsumowując, praca Pani mgr Laury Moskalik stanowi istotny wkład w zrozumienie roli kalikreiny 14 w parakrynej sygnalizacji komórkowej w kontekście sekrecji cytokin IL-6, IL-8 oraz CXCL1 w procesie gojenia się ran. W związku z tym proszę Wysoką Radę o dopuszczenie Pani Moskalik do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Z poważaniem,



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51

Nr konta:
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434