

Kraków, 20.05.2022

Rozprawa doktorska:
**Analiza wpływu kallikreiny tkankowej 14 na gojenie się ran
i sekretom fibroblastów skóry**

Laura Moskalik

Streszczenie

Kalikreiny tkankowe (KLK) z rodziny proteaz serynowych, składają się z piętnastu członków oznaczonych jako KLK1-KLK15, o aktywności podobnej do trypsyny lub chymotrypsyny. KLK-y są zlokalizowane w całym ciele, ale KLK14 występuje szczególnie obficie w skórze i wiadomo, że uczestniczy w złuszczeniu się skóry i gojeniu się ran dzięki swojej proteolitycznej zdolności do rozszczepiania składników macierzy zewnątrzkomórkowej i cząsteczek adhezyjnych komórek. Celem naszych badań była ocena wpływu KLK14 na gojenie się ran w nowej perspektywie, wykorzystując jej zdolność oddziaływania na sekretom fibroblastów ludzkiej skóry (HSF) poprzez pobudzenie uwalniania IL-6, IL-8 i CXCL1, które wspomagają gojenie się ran w warunkach *in vitro* w keratynocytach skóry HaCaT poprzez sygnalizację parakrynną.

Zabarwienie fluorescencyjne wimentyny i F-aktyny w HSF po stymulacji KLK14 przedstawiło wizualne zmiany w wyglądzie HSF wywołane przez KLK14. Nasza analiza cytometrii przepływowej wykazała, że KLK14 była w stanie odczepiać HSF-y *in vitro* bez wpływu na ich żywotność, umożliwiając im ponowne przyłączenie się do nowej powierzchni. Wyniki te sugerują, że KLK14 może wpływać na gojenie się ran skóry poprzez odczepianie fibroblastów, co jest niezbędne do przebudowy tkanki i relokacji fibroblastów w miejscu rany. Ponadto analiza PCR w czasie rzeczywistym i wyniki ELISA wykazały, że proteolitycznie aktywna KLK14 indukuje wzrost ekspresji genów i sekrecji IL-6, IL-8 i CXCL1 w HSF w sposób zależny od czasu i stężenia KLK14 i że wzrost produkcji IL-6 i IL-8 za pośrednictwem KLK14 jest zależna od aktywności PAR-1.

Wiadomo, że każdy z trzech czynników, IL-6, IL-8 i CXCL1 uczestniczy w procesach gojeniu się ran, a nasze badania wykazały, że rhIL-6, rhIL-8 i rhCXCL1 były w stanie wywołać gojenie ran w HaCaT *in vitro* w sposób stężeniowo-zależnym. Gdy pożywka hodowlana HSF stymulowana przez KLK14 została przeniesiona do modelu rany HaCaT *in vitro*, pożywka

hodowlana HSF traktowana KLK14 promowała gojenie się ran w HaCaT. Odkrycia te wskazują, że rzeczywiście KLK14 wspomaga gojenie się ran w HaCaT poprzez modulację sekretomu HSF uczestniczącego w parakrynnym zdarzeniu sygnalizacyjnym między keratynocytami skóry a fibroblastami skóry.

Wiadomo, że KLK14 jest regulowana w górę lub w dół w różnych nowotworach, dzięki czemu jest cenna jako potencjalny biomarker raka. W roku 1986 Harold F. Dvorak zaproponował, że „rak jest raną, która nigdy się nie zagoi”. W 2012 roku Kolář i in. udowodnili, że IL-6, IL-8 i CXCL1 indukują fenotyp raka w ludzkich keratynocytach. Dlatego IL-6, IL-8 i CXCL1 biorą udział zarówno w procesach gojeniu się ran, jak i karcynogenezie. Ponieważ KLK14 indukowała uwalnianie IL-6, IL-8 i CXCL1 w HSF i promowała gojenie się ran HaCaT *in vitro*, jest to przykładem możliwego parakrynnego zdarzenia sygnalizacyjnego między keratynocytami a fibroblastami w skórze i dowodzi to, że ścisła regulacja KLK14 jest konieczna w celu kontrolowania jej przeciwstawnej funkcji jako „bohater” kontra „złoczyńca” w fizjologii, ukazując cienką granicę między zdrowiem a chorobą; gojeniem się ran i karcynogenezą.



Laura Moskalik



Jan Potempa
Promotor

Kraków, 20.05.2022

PhD thesis entitled:

**Analyzing the effects of tissue kallikrein 14 on wound healing by
modulating the skin fibroblast secretome**

Laura Moskalik

Abstract

The tissue kallikrein (KLK) family of serine proteases consist of 15 members labelled as KLK1-KLK15 comprising of either trypsin- or chymotrypsin-like activity. KLKs are located throughout the body, but KLK14 is especially abundant in the skin and is known to participate in skin desquamation and wound healing through its proteolytic ability to cleave extracellular matrix components and cell-cell adhesion molecules. The purpose of our research was to assess the implications of KLK14 in wound healing in a novel perspective, by proposing its ability to affect the human skin fibroblast (HSF) secretome by inducing the release of IL-6, IL-8 and CXCL1 that promote *in vitro* wound healing in HaCaT skin keratinocytes through paracrine signaling.

Fluorescence staining of vimentin and F-actin in HSF after KLK14 stimulation presented visual changes in HSF appearance induced by KLK14. Our flow cytometry analysis demonstrated that KLK14 was able to detach HSF *in vitro* without affecting the HSF viability allowing them to re-attach to a new surface. These results proposed the possibility of KLK14 influencing skin wound healing through fibroblast detachment that is necessary for tissue remodeling and fibroblast relocation in the wounded site. Furthermore, real-time PCR and ELISA analysis indicated that proteolytically active KLK14 induces an increase in IL-6, IL-8 and CXCL1 gene expression and secretion in HSF in a time and concentration dependent manner and that the KLK14-mediated increase in IL-6 and IL-8 production is dependent on PAR-1 activity.

Each of the three factors, IL-6, IL-8 and CXCL1 are known to participate in wound healing. Our research has demonstrated that rhIL-6, rhIL-8 and rhCXCL1 were able to induce HaCaT *in vitro* wound healing. Furthermore, when KLK14-stimulated HSF culture media was transferred to a HaCaT *in vitro* wound model, the KLK14-treated HSF culture media promoted HaCaT *in vitro* wound healing. These findings indicate that KLK14 induces HaCaT wound

healing through the modulation of the HSF secretome participating in a paracrine signaling event between skin keratinocytes and skin fibroblasts.

KLK14 is also known to be either upregulated or downregulated in various tumors therefore rendering it valuable as a potential cancer biomarker. In 1986, Harold F. Dvorak proposed that “cancer is a never healing wound” and in 2012, Kolář et al. proved that IL-6, IL-8 and CXCL induce a cancer phenotype in human keratinocytes. Therefore, IL-6, IL-8 and CXCL1 are involve in both wound healing and carcinogenesis. Since KLK14 induced the release of IL-6, IL-8 and CXCL1 in HSF and promoted HaCaT *in vitro* wound healing exemplifying a possible paracrine signaling event between the keratinocytes and fibroblasts in the skin, this suggests that a tight regulation of KLK14 is necessary in order to control its opposing functions as a “hero” vs “villain” in physiology demonstrating the fine line between health and disease; wound healing and carcinogenesis.



Laura Moskalik



Jan Potempa
Supervisor