



Łódź, dn. 12.09.2023

Prof. dr hab. Magdalena Klink
Kierownik Pracowni Biologii Molekularnej i Komórkowej
Instytutu Biologii Medycznej PAN, w Łodzi

Ocena osiągnięcia naukowego, pozostałego dorobku naukowo-badawczego oraz działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej Pani dr Anny Ciesielskiej w związku z postępowaniem o nadanie Jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne

Sylwetka Habilitantki

Pani doktor Anna Ciesielska ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej na kierunku Biotechnologia. W latach 2007-2013 była słuchaczką studiów doktoranckich na tym samym Wydziale i pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Koziołkiewicz wykonywała pracę doktorską. W tym samym czasie odbyła roczny staż, na Uniwersytecie Strathclyde (Glasgow, UK). Stopień doktora nauk technicznych w dyscyplinie biotechnologia uzyskała w 2013 roku na Politechnice Łódzkiej. Praca doktorska została nagrodzona nagrodą ufundowaną przez Polmos Żyrardów i wnioskowaną przez Kolegium Dziekańskie Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ. Po obronie dr Ciesielska rozpoczęła karierę naukową w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Początkowo odbyła 3-letni staż podoktorski realizowany w ramach grantu Fuga i pracowała na stanowisku specjalisty, a od 2021 jest adiunktem w w/w Instytucie. Habilitantka wykazała się zatem aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej jednostce w tym zagranicznej.

Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe Habilitantki zatytułowane „**Białka i lipidy błonowe jako regulatory odpowiedzi zapalnej indukowanej w makrofagach przez lipopolisacharyd bakteryjny**” tworzy cykl powiązanych tematycznie sześciu publikacji, czterech prac oryginalnych oraz dwóch artykułów przeglądowych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych w latach 2015-2022. W pięciu publikacjach Habilitantka jest pierwszym, a w trzech korespondencyjnym autorem. Sumaryczny wskaźnik Impact Factor (IF) publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi 31,805, a łączna liczba punktów MEiN wynosi 680. Doktor Anna Ciesielska miała istotny udział w powstawaniu tych prac głównie jako ich współpomysłodawca i wykonawca badań oraz osoba odpowiedzialna za analizę wyników, przygotowanie manuskryptów, opracowanie ich ostatecznej wersji i opracowanie odpowiedzi dla recenzentów. Prace osiągnięcia habilitacyjnego zostały zauważone przez środowisko naukowe i dobrze cytowane, liczba cytowani równa jest 284. Zarówno wkład Habilitantki w publikacje jak i ich poziom naukowy nie budzą moich wątpliwości. Doktor Ciesielska przedstawiła wymagane zgody pozostałych współautorów na wykorzystanie artykułów w swoim procesie habilitacyjnym.

Osiągnięcie habilitacyjne dotyczy niezwykle istotnego zagadnienia regulacji aktywności receptora Toll-podobnego typu 4 (TLR4), który odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi zapalnej komórek wrodzonego układu odpornościowego takich jak makrofagi. Receptor ten rozpoznaje lipopolisacharydy (LPS) bakterii Gram-ujemnych i uruchomienia wewnątrzkomórkowe sygnały aktywacji prowadzące do produkcji cytokin, chemokin, metabolitów bójczych i w konsekwencji do zainicjonowania stanu zapalnego. Niestety nadmierna i niekontrolowana aktywacja TLR4 może prowadzić do sepsy, która często kończy się śmiercią. Receptor ten coraz częściej jest również rozważany jako kluczowy stymulator przewlekłego stanu zapalnego inicjującego choroby układu krążenia czy reumatoidalne zapalenie stawów. Co ciekawe TLR4 jest receptorem nietypowym, który uruchamia dwie ścieżki sygnałowe, pierwszą z powierzchni błony komórkowej, która aktywuje czynniki transkrypcyjne NF- κ B, AP-1, CREB oraz drugą wewnątrz makrofaga z błon endosomów prowadzącą do aktywacji NF- κ B, oraz IRF3/7. Konsekwencją pobudzenia pierwszej ścieżki sygnałowej jest produkcja TNF- α i IL-6, natomiast drugiej RANTES i inflammasomu NLRP3.

Mając powyższe na uwadze doktor Ciesielska postanowiła zgłębić mechanizmy regulujące aktywność TLR4, aby móc wzmacniać lub wyhamowywać prozapalną odpowiedź makrofagów na LPS. Wybór tematu badań uważam za bardzo interesujący, trafny i niezwykle ważny w kontekście leczenia sepsy czy innych schorzeń związanych z zapaleniem i aktywnością TLR4. Co warto podkreślić nowatorstwo charakteru hipotez stawianych przez Habilitantkę został doceniony przez przyznanie jej finansowania w postaci grantów FUGA, SONATA, OPUS. W skład cyklu publikacji wchodzi:

1. **Ciesielska A.**, Kwiatkowska K. Modification of pro-inflammatory signaling by dietary components: The plasma membrane as a target. *Bioessays* 2015, 37(7):789-801.
2. **Ciesielska A.**, Sas-Nowosielska H., Kwiatkowska K. Bis(monoacylglycerol)phosphate inhibits TLR4-dependent RANTES production in macrophages. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2017, 83:15-26.
3. Prymas K., Świątkowska A., Traczyk G., Ziemińska E., Dziewulska A., **Ciesielska A.**, Kwiatkowska K. Sphingomyelin synthase activity affects TRIF-dependent signaling of Toll-like receptor 4 in cells stimulated with lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids.* 2020, 1865(2): 158549.
4. **Ciesielska A.**, Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021 78(4):1233-1261.
5. **Ciesielska A.**, Hromada-Judycka A., Ziemińska E., Kwiatkowska K. Lysophosphatidic acid up-regulates IL-10 production to inhibit TNF- α synthesis in M ϕ s stimulated with LPS. *J. Leukoc. Biol.* 2019, 106(6):1285-1301.
6. **Ciesielska A.**, Krawczyk M., Sas-Nowosielska H., Hromada-Judycka A., Kwiatkowska K. CD14 recycling modulates LPS-induced inflammatory responses of murine macrophages. *Traffic* 2022, 23(6):310-330.

Poszukiwania mechanizmów regulujących aktywność TLR4 i próby ingerencji w te mechanizmy Habilitantka rozpoczęła od przygotowania ciekawego artykułu przeglądowego (publikacja #1) na temat roli polifenoli, tokoferoli, cholesterolu i jego pochodnych oraz kwasów tłuszczowych (obecnych w naszej diecie) w modulacji uporządkowania błon komórkowych. Wiadomym jest, że w uruchomieniu obu ścieżek sygnałowych TLR4 istotna

jest odpowiednia organizacja błon, w tym przede wszystkim tzw. tratw lipidowych. Bardzo ciekawym spostrzeżeniami wynikającymi z przedstawionego przeglądu literatury jest stwierdzenie, że odpowiedź TLR4 na LPS może znacząco ulegać zmianie pod wpływem składników codziennej diety. Lipidy z resztami nasyconych kwasów tłuszczowych zmniejszają płynność błon i nasilają aktywację TLR4, a tym samym inicjują stan zapalny. Lipidy z resztami nienasyconych kwasów tłuszczowych, zwiększające płynność błon komórkowych mają przeciwstawne działanie. Za ochronę błon komórkowych przed oksydacyjnym atakiem rodników tlenowych odpowiadają natomiast tokoferole i polifenole.

Poszukując nowych modulatorów aktywacji szlaków sygnałowych inicjowanych przez TLR4, Habilitantka zdecydowała się na przebadanie bis(monoacyloglicerol)fosforanu (BMP). Wykazała, że BMP (niezależnie od izomeru) blokował stymulowaną LPS aktywność transkrypcyjną IRF3 w makrofagach i produkcję RANTES, co wskazuje na zahamowanie endosomalnej ścieżki sygnałowej TLR4. Aktywność BMP jak ustaliła Habilitantka była związana z wbudowywaniem się tego związku w błony komórkowe (powierzchni komórki i endosomów) i zaburzaniem ich uporządkowanej organizacji. Co niezwykle ciekawe, odkryła, że przeciwzapalne właściwości BMP były znoszone przez cholesterol, który najprawdopodobniej przywracał korzystną dla TLR4 organizację błon komórkowych (publikacja #2).

W publikacji #3 Habilitantka pokazała, że aktywacja endosomalnej ścieżki sygnałowej TLR4 jest ściśle uzależniana od zmian w składzie lipidów błonowych. W mojej ocenie kluczowym wynikiem było udowodnienie, że zahamowanie syntezy sfingomieliny (składnik tratw lipidowych) poprzez obniżenie aktywności enzymów ją syntetyzujących (SMS1/2) prowadziło do zahamowania aktywności prozapalnych czynników transkrypcyjnych NF-κB oraz IRF3, w makrofagach stymulowanych LPS. Poszukując mechanizmu, doktor Ciesielska jednoznacznie wykazała, że makrofagi z wyciszonym genami SMS charakteryzowały się obniżoną ekspresją CD14 na poziomie białka i genu. Idąc dalej Habilitantka wysunęła hipotezę, że syntetyzowana sfingomielina ułatwia tworzenie tratw lipidowych i zakotwiczenie CD14 w błonie. Wiadomym jest natomiast, że cząsteczka ta odpowiada za wiązanie LPS z surowicy krwi, a następnie przekazywanie go TLR4. W konsekwencji brak CD14 skutkuje osłabieniem sygnałów aktywacji TLR4 na LPS w makrofagach.

Szersze omówienie zależności między sfingomieliną CD14 i TLR4 w odpowiedzi prozapalnej indukowanej LPS Habilitantka zawarła w znakomitym artykule przeglądowym, który spotkał się z dużym uznaniem środowiska naukowego i osiągnął 251 cytowań (publikacja #4).

Badania własne i przegląd literatury zainspirowały dr Ciesielską do dalszych poszukiwań mechanizmów regulacji ścieżek sygnałowych TLR4 zależnych od CD14, gdyż jak się okazało w literaturze niewiele miejsca poświęca się tej ostatniej cząsteczce w kontekście prozapalnej aktywności TLR4. W swoich badaniach Habilitantka wykazała, że CD14 dynamicznie przemieszczał się między zewnętrzną błoną komórkową, a



endosomami w sposób odmienny niż TLR4. Receptor toll-podobny typu 4 był wyraźnie endocytyowany pod wpływem stymulacji makrofagów LPS i jego ubytek w błonie powierzchniowej korelował z aktywnością kinazy TBK1. CD14 natomiast był stale endocytyowany niezależnie od obecności LPS. Część zinternalizowanej cząsteczki CD14 ulegała degradacji lizosomalnej, ale znacząca pula powracała na powierzchnię błony komórkowej makrofagów. Habilitantka po raz pierwszy wykazała, że ekspresja CD14 w błonie powierzchniowej makrofagów nie zależy od LPS i obejmuje transport nowopowstałych cząsteczek jak i recykling endocytyowanego białka. Oba procesy jak słusznie zauważyła doktor Ciesielska mają na celu zoptymalizowanie powierzchniowej ekspresji CD14. Kontynuując wątek odzyskiwania CD14 z endosomów Habilitantka postanowiła poszukać jakie białka odpowiadają za ten proces i wykazała, że brak białek sortujących neksyn (SNX) w makrofagach obniżył poziom CD14 w błonie komórkowej oraz znacząco zredukował liczbę endosomów zawierających tę cząsteczkę. Wykazała również, że ubytek CD14 przełożył się na zahamowanie ścieżki sygnałowej TLR4 mimo braku zmian w powierzchniowej ekspresji tego receptora (publikacja #6). W opinii recenzenta opisany przez doktor Ciesielską recykling CD14 w makrofagach stymulowanych LPS jest nowatorskim odkryciem, które jest istotnym wkładem w wiedzę na temat współdziałania CD14 i TLR4.

W kolejnych badaniach Habilitantka powróciła do wątku lipidów jako modulatorów odpowiedzi zapalnej indukowanej TLR4. Lipidy nie tylko wpływają na płynność i organizację błon komórkowych, ale mogą również oddziaływać z licznymi białkami (receptorami) błony komórkowej, które aktywują własne szlaki sygnałowe krzyżowo działające ze szlakiem TLR4. Idąc tym tropem doktor Ciesielska postanowiła ocenić czy kwas lizofosfatydowy (LPA), związek o znanych właściwościach przeciwzapalnych, ingeruje w szlak sygnałowy indukowany TLR4. Habilitantka jednoznacznie wykazała, że LPA osłabiał aktywację ścieżki sygnałowej zależnej od powierzchniowej ekspresji TLR4 w makrofagach, co w konsekwencji prowadziło do zahamowania produkcji TNF- α w odpowiedzi na LPS. Poszukując mechanizmu dr Anna Ciesielska odkryła, że LPA w obecności LPS stymulował makrofagi do produkcji IL-10, która hamowała syntezę TNF- α . Co więcej Habilitantka po raz pierwszy wykazała, że LPA aktywował swoiste receptory LPA5 i LPA6 uruchamiające szlaki sygnałowe, które krzyżują się ze szlakiem TLR4 i regulują aktywność prozapalną makrofagów stymulowanych LPS (publikacja #5).

Podsumowując osiągnięcie habilitacyjne doktor Ciesielskiej ma charakter faktycznych odkryć naukowych i wniosło kluczowe informacje na temat lepszego zrozumienia ścieżki sygnałowej TLR4 w makrofagach stymulowanych LPS oraz możliwości jej regulacji. Prace są bardzo spójne tematycznie i mają istotne walory poznawcze. Do najważniejszych/kluczowych dokonań przedstawionego cyklu publikacji zaliczam:

- Odkrycie, że stała recyrkulacja cząsteczki CD14, która jest kluczowa w aktywacji TLR4, jest zależna od neksyn i zahamowanie ich aktywności prowadzi do osłabienia odpowiedzi zapalnej makrofagów na LPS.

- Wykazanie, że bis(monoacyloglicerol)fosforan wbudowując się w błony komórkowe makrofagów zmienia ich organizację, co prowadzi do zaburzenia aktywności TLR4 i osłabienia odpowiedzi zapalnej.
- Odkrycie, że wyciszenie enzymów syntetyzujących sfingomielinę prowadzi do redukcji ekspresji CD14, a tym samym osłabionej odpowiedzi TLR4 na LPS.
- Wykazanie, że kwas lizofosfatydowy aktywuje szlak sygnałowy w makrofagach, który krzyżuje się z szlakiem TLR4 i w konsekwencji osłabia prozapalną aktywność tego ostatniego.

Ocena działalności naukowo-badawczej

Na całkowity dorobek publikacyjny Habilitantki składa się 29 prac, w tym 6 stanowi osiągnięcia habilitacyjne. 26 artykułów znajduje się w bazie Journal Citation Report/Thomson Reuter. Łączny IF wynosi 68,470. Liczba cytowań bez autocytowań w bazie Clarivate Web of Sciences (Core Collection) wynosi 538. Sumaryczna liczba punktów MEiN równa jest 1710, Index H równy jest 9. Jak wynika z tytułów, zamieszczonego w dokumentacji, spisu publikacji zainteresowania naukowe Habilitantki (po doktoracie) są koherentne i dotyczą poznawania ścieżek sygnałowych inicjowanych przez różne lipidy w tym cholesterol oraz LPS. Wielokrotnie prezentowała Ona swoje osiągnięcia na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Pani doktor Anna Ciesielska ma doświadczenie we współpracy z różnymi ośrodkami w tym zagranicznymi. Odbiła roczny staż w Uniwersytecie Strathclyde w Glasgow. Będąc na stażu podoktorskim w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, współpracowała z grupą prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz z Instytutu Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ.

Wysoko oceniam umiejętność Habilitantki do zdobywania funduszy na badania i współpracę z zespołami badawczymi. Po uzyskaniu stopnia doktora była kierownikiem grantu NCN Sonata oraz grantu NCN Fuga. Obecnie kieruje projektem NCN OPUS. Co warto podkreślić dr Anna Ciesielska będąc słuchaczką studium doktoranckiego na PŁ uzyskała „Stypendium wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów”, które było finansowane w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego. Przed i po obronie doktoratu uczestniczyła w pracach zespołów badawczych jako wykonawca grantów uzyskanych z funduszy krajowych (NCN, NCBiR oraz MNiSW).

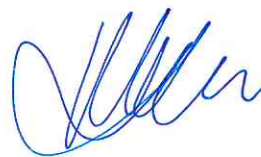
Ocena działalność dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzującej naukę

Habilitantka po obronie pracy doktorskiej związała się z jednostką Polskiej Akademii Nauk, która nie prowadzi zajęć dydaktycznych wzorem Uczelni. Niemniej jednak doktor Ciesielska ma doświadczenie w kształceniu młodej kadry. Była promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej zakończonej w 2019 roku oraz promotorem pracy magisterskiej realizowanej we współpracy z Zakładem Cytologii Wydziału Biologii

Uniwersytetu Warszawskiego. Opiekowała się studentami odbywającymi praktyki w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego oraz stażystami programu „Sukces z natury – kompleksowy program podniesienia jakości zarządzania procesem kształcenia i jakości nauczania Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie” oraz „Młodzi, kompetentni, zatrudnieni – program aktywizacji zawodowej osób niepełnosprawnych w wieku 18-24 r.ż. z województwa mazowieckiego”. Habilitantka wielokrotnie brała czynny udział w działalności popularyzującej naukę prowadząc warsztaty i zajęcia dla uczniów liceów warszawskich jak również wygłaszając wykłady w ramach Festiwalu Nauki. Uważam zatem, że Pani doktor Ciesielska ma doświadczenie dydaktyczne.

Wniosek końcowy

Całkowity dorobek naukowy jak i osiągnięcie habilitacyjne doktor Anny Ciesielskiej stanowią znaczący wkład w rozwoju nauki i w pełni odpowiadają kryteriom stawianym przy ubieganiu się o stopień doktora habilitowanego określony w art. 219 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”. Pozytywnie oceniam również Jej działalność organizatorską, dydaktyczną i popularyzującą naukę. Habilitantka, w mojej ocenie, jest dojrzałym naukowcem stawiającym celne hipotezy i umiejącym zdobywać środki finansowe na badania. Z pełnym przekonaniem przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN wniosek o dopuszczenie dr Anny Ciesielskiej do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Prof. dr hab. Magdalena Klink