

Warszawa, 26 września 2023 r.

Prof. dr hab. Grażyna Gromadzka  
Katedra Nauk Biomedycznych  
Wydział Medyczny. Collegium Medicum  
Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie  
ul. Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa  
e-mail: [gragrom@gmx.com](mailto:gragrom@gmx.com)

**Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej doktor nauk technicznych Anny Ciesielskiej (de domo Grzelczyk) w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne; tytuł cyklu prac, przedstawionych jako osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego: „Białka i lipidy błonowe jako regulatory odpowiedzi zapalnej indukowanej w makrofagach przez lipopolisacharyd bakteryjny”.**

#### **Podstawa do opracowania**

Formalną podstawą do przygotowania niniejszej oceny osiągnięć naukowych dr Anny Ciesielskiej jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego z dnia 27 lipca 2023 r. (nr uchwały 128/RN/GE/2023), w sprawie powołania i włączenia mnie w skład komisji habilitacyjnej dr Anny Ciesielskiej w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia doktora habilitowanego.

Ocena została przeze mnie przeprowadzona na podstawie elektronicznej wersji dokumentacji przygotowanej przez Habilitantkę, obejmującej:

- autoreferat w języku polskim (zał. 3) i angielskim (zał. 4),
- wykaz osiągnięć naukowych w języku polskim (zał. 5) i angielskim (zał. 6),
- oświadczenia współautorów (zał. 7),
- dyplom stwierdzający posiadanie stopnia doktora nauk technicznych w dyscyplinie biotechnologia, w języku polskim (zał. 8),
- kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe,

a także dodatkowych informacji dostępnych w bazach naukowych (Web of Science i Scopus) oraz na stronach internetowych czasopism, w których ukazały się publikacje Habilitantki.

#### **Sylwetka naukowa dr Anny Ciesielskiej**

Dr Anna Ciesielska jest absolwentką Politechniki Łódzkiej. Na tej uczelni w roku 2007 uzyskała tytuł magistra inżyniera; jej praca magisterska nosiła tytuł „Fizykochemiczna i biochemiczna charakterystyka wybranych próbek gleby antarktycznej”.

W latach 2007-2013 dr Anna Ciesielska była uczestniczką studiów doktoranckich na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, po ukończeniu których – w 2013 r - otrzymała stopień naukowy doktora nauk technicznych w dyscyplinie biotechnologia

na podstawie rozprawy zatytułowanej „Aktywność przeciwnowotworowa tiofosforanowych i ditiofosforanowych analogów cyklicznego kwasu fosfatydowego wobec ludzkich komórek raka prostaty”.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora Habilitantka podjęła zatrudnienie w Instytucie Biochemii Technicznej (obecnie jest to Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej) na stanowisku biochemika, a następnie – od października 2013 – rozpoczęła pracę w Pracowni Biologii Molekularnej Błony Komórkowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie, początkowo na stanowisku specjalisty, a od maja 2021 r. – adiunkta.

W dniu 24 kwietnia 2023 r. dr Anna Ciesielska wystąpiła do Rady Doskonałości Naukowej z wnioskiem o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie „nauki biologiczne”.

### **Ocena osiągnięcia naukowego**

Zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym” wnosząc o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego dr Anna Ciesielska przedstawiła osiągnięcie naukowe (dalej zwane „osiągnięciem”), stanowiące cykl powiązanych ze sobą tematycznie prac oryginalnych (4) i przeglądowych (2), które zatytułowała „Białka i lipidy błonowe jako regulatory odpowiedzi zapalnej indukowanej w makrofagach przez lipopolisacharyd bakteryjny.”

W 5 z 6 prac, wchodzących w skład osiągnięcia, Habilitantka jest pierwszym autorem. Jej udział w przygotowaniu poszczególnych publikacji polegał na poddaniu pomysłu (5 prac, w tym 2 przeglądowe), przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu (5 prac, w tym 2 przeglądowe), przygotowaniu wersji po recenzji oraz końcowej edycji tekstu (4 prace, w tym 1 przeglądowa), a w przypadku prac doświadczalnych - przeprowadzeniu większości doświadczeń i analizie ich wyników (3 spośród 4 prac) lub wykonaniu części doświadczeń (1 praca).

Wszystkie artykuły naukowe, wchodzące w skład osiągnięcia, opublikowane zostały w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, uwzględnionych na liście Journal Citation Reports, takich jak: Bioessays (1 praca), Int. J. Biochem. Cell. Biol. (1 praca), Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids (1 praca), Cell Mol. Life Sci. (1 praca), J. Leukoc. Biol. (1 praca) i Traffic (1 praca).

Średni 5-letni IF czasopism, w których ww. prace zostały opublikowane, wynosi 6,22 (min.-max.: 4,965–10,001), średnia punktacja MEN: 113,33 (min.-max.: 100-140), zaś średnia liczba cytowań: 47,33 (min.-max.: 1-251). Jedna z prac, wchodzących w skład przedstawionego cyklu, w ciągu 2 lat od chwili opublikowania (2021 r.) została zacytowana 251 razy.

Moich zastrzeżeń nie budzi ani jakość publikacji, które przed opublikowaniem w prestiżowych czasopismach podlegały krytycznej ewaluacji w ramach odpowiednich dla tych czasopism procedur recenzyjnych, ani wkład pracy Habilitantki w ich powstanie.

Przedstawione przez dr Annę Ciesielską osiągnięcie naukowe dotyczy tematyki mechanizmów regulacyjnych procesów zapalnych indukowanych lipopolisacharydem (LPS) – endotoksyną wchodzącą w skład błony bakterii Gram-ujemnych. Jako jeden z wzorców molekularnych związanych z patogenami (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMP) LPS może stać się dla komórek wrodzonego układu odpornościowego sygnałem do uruchomienia odpowiedzi zapalnej, której celem jest zwalczanie zakażenia. Niestety zbyt intensywna i niekontrolowana odpowiedź układu odpornościowego może prowadzić do sepsy, która według danych Światowej Organizacji Zdrowia odpowiada za 20% zgonów na świecie.

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy LPS, oprócz indukowania ostrych reakcji zapalnych, może się przyczyniać do przewlekłych stanów zapalnych o niewielkim nasileniu (ang. low-grade

inflammation). Stany te mogą być wywoływane między innymi przez bakterie przewodu pokarmowego czy bakterie odpowiedzialne za choroby przyzębia, które na skutek rozszczelnienia bariery jelitowej/ mikroowrzodzeń czy urazów nabłonka jamy ustnej, odpowiednio, mogą przedostać się do krwi obwodowej. Wyniki wielu badań wskazują na istnienie związku między przewlekłym stanem zapalnym a rozwojem miażdżycy, chorób neurodegeneracyjnych czy nowotworowych.

Wobec powyższego wybór tematyki badań, realizowanych przez Habilitantkę, uważam za bardzo trafny. Głębsze poznanie mechanizmów molekularnych ostrych i przewlekłych procesów zapalnych, związanych z infekcjami bakteryjnymi, może pomóc w opracowaniu skutecznych strategii profilaktyki i/ lub leczenia wyżej wymienionych, a także innych chorób.

Dr Anna Ciesielska prowadziła badania naukowe w zakresie ww. tematyki jako kierownik lub wykonawca projektów, realizowanych dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki (projekty: NCN, FUGA-2, NCN-SONATA-12 oraz NCN-OPUS-20). Efektem tych badań było 13 publikacji naukowych, w tym sześć wchodzących w skład osiągnięcia przedstawionego jako podstawa ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

W badaniach, których wyniki zostały opublikowane i włączone w skład osiągnięcia, dr Anna Ciesielska koncentrowała się na mechanizmach rozpoznawania LPS i procesach uczestniczących w uruchamianiu prozapalnych kaskad sygnałowych z udziałem jednego z receptorów z grupy Toll-like (ang. Toll-like receptors, TLR).

TLR stanowią grupę przezbłonowych glikoprotein, pełniących funkcję receptorów powierzchniowych. Zaliczane są do tzw. receptorów rozpoznających wzorce (z ang. pattern recognition receptors, pathogen recognition receptors, PRR). Dotychczas u ludzi opisano 11 różnych TLR. Są one obecne na różnych komórkach układu odpornościowego, m.in. na makrofagach, komórkach dendrytycznych i na komórkach odporności swoistej: limfocytach B i na określonych subpopulacjach limfocytów T, jak również na komórkach nabłonka jelit, pęcherza moczowego, płuc, wątroby, nerek, ośrodkowego układu nerwowego ssaków, jak również na komórkach śródbłonka naczyń skóry i tkanki podskórnej i fibroblastów ludzkiej skóry.

TLR są zbudowane z części zewnątrzkomórkowej rozpoznającej wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen-associated molecular patterns, PAMP), w tym LPS, oraz wewnątrzkomórkowej stanowiącej domenę TIR (ang. Toll-interleukin-1 receptor), która inicjuje wewnątrzkomórkowe mechanizmy odpowiedzi na PAMP, prowadzące do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (ang. nuclear factor- $\kappa$ B), białka AP-1 (ang. activating protein-1) i czynników transkrypcyjnych należące do rodziny IRF (ang. interferon regulatory factors), a w konsekwencji do wytwarzania cytokin prozapalnych, interferonu typu I i chemokin.

W prowadzonych badaniach Habilitantka skoncentrowała się na jednym z receptorów z rodziny TLR: TLR4.

Domeny cytoplazmatyczne i transbłonowe TLR4 wykazują zdolność do silnej, konstytutywnej dimeryzacji. Rolą domeny zewnątrzkomórkowej jest hamowanie tych interakcji, dopóki nie zostanie związany specyficzny ligand – LPS. Taki układ prowadzi do silniejszej aktywacji komórek, niż w przypadku pozostałych TLR. Badania wykazały, że TLR4 kilkusetkrotnie silniej aktywuje promotory genów prozapalnych niż pozostałe receptory tej rodziny.

TLR4 jako jedyny spośród członków rodziny TLR, oddziałuje ze wszystkimi poznanymi białkami adaptorowymi posiadającymi domenę TIR, uruchamiając dwa szlaki sygnałowe, nazywane ścieżkami zależnymi od białek adaptorowych: MyD88 lub TRIF. Zdolność do aktywacji dwóch różnych ścieżek sygnałowych zależna jest od jego lokalizacji w błonie komórkowej

lub w endosomach. Efektem aktywacji obu tych ścieżek jest aktywacja czynników transkrypcyjnych i transkrypcji genów cytokin prozapalnych.

Habilitantka w swoich badaniach poszukiwała mechanizmów odpowiedzialnych za efekty regulatorowe dotyczące TLR4, koncentrując się na białkowych i lipidowych składnikach błon komórkowych i mając na względzie złożone interakcje lipidów z białkami.

W artykule przeglądowym, wchodzącym w skład osiągnięcia [Ciesielska A., Kwiatkowska K. Modification of pro-inflammatory signaling by dietary components: The plasma membrane as a target” *Bioessays*. 2015, 37(7):789-801], dr Ciesielska opisała mechanizmy ważne dla uruchomienia/ regulacji ścieżek sygnałowych TLR4, związane z organizacją błon komórkowych, w tym wyodrębnianiem tzw. tratw błonowych będących nanodomenami wzbogaconymi w sfingolipidy acylowane resztami nasyconych kwasów tłuszczowych i cholesterolu, a także w niektóre białka, w tym CD14 posiadające kotwicę glikozylofosfatydylinozytolową (ang. glycosylphosphatidylinositol, GPI).

Przedstawiła dane, wskazujące na to, że LPS powoduje asocjację TLR4 z tratwami błony komórkowej, a zmiany w ilości cholesterolu lub w składzie sfingolipidów, prowadzą do zmian w przemieszczaniu się receptora do nanodomen i aktywacji prozapalnych ścieżek sygnałowych. Modulowanie organizacji błon komórkowych między innymi przez składniki diety – w tym polifenole, cholesterol i jego pochodne, tokoferol czy kwasy tłuszczowe - może prowadzić do wzmocnienia lub hamowania aktywacji ścieżek sygnałowych TLR4. Lipidy z resztami nasyconych kwasów tłuszczowych mogą się przyczyniać do intensyfikacji aktywacji receptora TLR4 i indukcji procesu zapalnego z uwagi na ich tendencję do ścisłego upakowania w obrębie błon komórkowych i zmniejszania ich płynności. Lipidy posiadające reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych przyczyniają się do wzrostu płynności błon komórkowych i zmniejszenia nasilenia reakcji zapalnej. Tokoferol i polifenole mogą wywierać działanie przeciwutleniające, chroniące lipidy błonowe przed działaniem wolnych rodników powstających pod wpływem LPS; mogą też oddziaływać z lipidami błony komórkowej wpływając na organizację błon oraz szlaki sygnałowe TLR4.

Dane, dotyczące możliwego modulowania ścieżek sygnałowych TLR4 z udziałem lipidów, zainspirowały Habilitantkę do podjęcia badań, mających na celu identyfikację nowych modulatorów aktywacji szlaków sygnałowych TLR4. Wyniki tych badań zostały opublikowane w kolejnym artykule, wchodzącym w skład osiągnięcia [praca oryginalna pt. "Bis(monoacylglycero)phosphate inhibits TLR4-dependent RANTES production in macrophages" (Ciesielska i in. 2017)].

Badania dotyczyły kwasu lizobisfosfatydowego (bis(monoacyloglicero)fosforan, BMP) – związku, występującego w błonach późnych endosomów i uczestniczącego w formowaniu wewnętrznych ciałek wielopęcherzykowych (ang. multivesiculated bodies, MVB). W badaniach, przeprowadzonych przez innych autorów, wykazano, że cząsteczki BMP są w stanie tworzyć w błonach pęcherzyków endosomalnych domeny, odpowiedzialne za wiązanie i późniejsze sortowanie białek w endosomach i w ten sposób regulować transport cholesterolu w komórce.

Habilitantka po raz pierwszy udokumentowała zdolność BMP do hamowania w makrofagach szlaku sygnałowego TLR4 zależnego od TRIF i prowadzącego do produkcji chemokiny RANTES, wywoływanej przez LPS, co było związane z hamowaniem aktywności i produkcji czynnika transkrypcyjnego IRF3.

BMP jest obecny w osoczu krwi, gdzie jego stężenie może wzrastać między innymi w związku z dietą bogatą w tłuszcze i cholesterol. Dzięki przeprowadzonym przez dr Annę Ciesielską badaniom udało się ustalić, że zwiększenie zawartości cholesterolu w komórkach może znacząco osłabiać zdolność BMP do hamowania aktywności i produkcji IRF3. Obserwacje te są ważne dla lepszego zrozumienia mechanizmów łączących dyslipidemie z przewlekłym procesem zapalnym inicjującym/ nasilającym aterosclerozę.

Dalsze badania, których wyniki zostały opisane w kolejnej publikacji, włączonej w skład osiągnięcia ["Sphingomyelin synthase activity affects TRIF-dependent signaling of Toll-like receptor 4 in cells stimulated with lipopolysaccharide" (Prymas i in. 2020)], stanowiły kontynuację dotychczasowych prac i również dotyczyły regulacji kaskad sygnałowych TLR4.

Pozwoliły one potwierdzić, że aktywacja endosomalnej, zależnej od TRIF, ścieżki sygnałowej TLR4, jest szczególnie wrażliwa na zmiany składu lipidowego błon komórkowych, w tym na ilość sfingomieliny. Sfingomielina należy do lipidów, które występują szczególnie obficie w tratwach błony komórkowej, gdzie zakotwiczone jest białko CD14 i dochodzi do aktywacji receptora TLR4. Właściwa ilość sfingomieliny w błonach komórkowych jest utrzymywana przez syntazy sfingomieliny 1 i 2 (SMS1 i SMS2). Enzymy te występują odpowiednio głównie w aparacie Golgiego i w błonie komórkowej; jako substraty do produkcji sfingomieliny wykorzystują fosfocholinę z fosfatydylocholinę i ceramid.

Niedobór sfingomieliny, wytwarzanej przez SMS1, w tym również po stymulacji komórek przez LPS, może zakłócać syntezę CD14 oraz jego transport do błony komórkowej oraz hamowanie szlaków sygnałowych TLR4. W przypadku braku SMS2, która odpowiada za przekształcenie ceramidu do sfingomieliny w błonie komórkowej, spadek CD14 może być związany z usuwaniem CD14 z powierzchni komórek wywoływanych szybszym tempem internalizacji tego białka. Każdy z zaproponowanych mechanizmów skutkuje obniżeniem poziomu CD14 w błonie komórkowej makrofagów, w efekcie prowadząc do słabszej aktywacji TLR4 przez LPS, a zwłaszcza endosomalnego szlaku sygnałowego tego receptora. Ponadto w badaniach, przeprowadzonych z udziałem Habilitantki, wykazano, że efektem obniżenia aktywności SMS jest osłabienie odpowiedzi zapalnej wywoływanej przez LPS, co jest związane ze zmniejszeniem aktywności czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i IRF3 oraz ilości mRNA cytokin i ich sekrecji. Szczególnie silny hamujący efekt był obserwowany w przypadku cytokin produkowanych na endosomalnej ścieżce sygnałowej TLR4 zależnej od TRIF.

Przeprowadzając przegląd piśmiennictwa w trakcie przygotowywania włączonej do osiągnięcia publikacji "TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling" (Ciesielska i in. 2021), dr Ciesielska zrozumiała, że regulacja aktywności receptora TLR4 jest często wiązana z transportem tego białka w komórce. Efektywność dostarczania nowopowstającego TLR4 do błony komórkowej, ale również jego internalizacja i przemieszczanie się wraz z dojrzewającymi endosomami, są istotnymi czynnikami determinującymi intensywność odpowiedzi zapalnej na LPS. Jednakże niewiele prowadzonych wcześniej badań było poświęconych białku CD14, które jest kluczowe dla endocytozy TLR4 i dalszej aktywacji ścieżki zależnej od TRIF.

Badania zespołu, którego członkiem była Habilitantka, wykazały, że stymulacja mysich makrofagów przez LPS powoduje wzrost ilości CD14 przy jednoczesnym spadku ilości TLR4, co sugerowało, że szlaki obiegu tych białek w komórkach mogą się różnić.

Habilitantka postanowiła przyjrzeć się dynamice transportu CD14 w makrofagach. Dzięki przeprowadzonym badaniom, których wyniki zostały opisane w kolejnej publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia ["CD14 recycling modulates LPS-induced inflammatory responses of murine macrophages" (Ciesielska i in. 2022)] wykazała, że CD14 dynamicznie przemieszcza się pomiędzy błoną komórkową a endosomami. Zaobserwowała, że zmiany w obiegu CD14 w makrofagach wpływają na intensywność aktywacji ścieżek sygnałowych TLR4. Szczególnie istotne z punktu widzenia aktywności TLR4 jest utrzymanie optymalnego poziomu CD14 na powierzchni makrofagów, gdzie białko to uczestniczy w rozpoznawaniu LPS, produkcji PI(4,5)P2 i endocytozie receptora, procesach istotnych dla aktywacji szlaków sygnałowych TLR4. Przeprowadzone przez dr Annę Ciesielską badania dowiodły, że w makrofagach niestymulowanych i stymulowanych LPS powierzchniowa pula CD14 jest sukcesywnie uzupełniana przez nowopowstające białko, a zahamowanie tego procesu prowadzi do wyraźnego i szybkiego spadku ilości białka na błonie

komórkowej, podczas gdy poziom białka TLR4 na powierzchni niestymulowanych makrofagów nie zmienia się.

Dr Anna Ciesielska podejrzewała, że zanikanie CD14 z powierzchni jest związane ze stałą endocytozą tego białka i jego degradacją w lizosomach i przypuszczenia te okazały się słuszne, gdyż w trakcie prowadzonych badań zauważyła, że w obecności inhibitorów proteaz lizosomalnych dochodzi do wzrostu ilości CD14. Obserwacje te pozwalają wnioskować, że CD14, podobnie jak TLR4, po endocytozie trafia do degradacji, jednak dynamika tego procesu dla obu białek jest inna i różni się zarówno w komórkach niestymulowanych, jak i w obecności LPS. Gdy zahamowaniu ulega proces degradacji lizosomalnej, ilość białka CD14 wzrasta w sposób ciągły niezależny od LPS, zaś retencja TLR4 jest widoczna dopiero po uruchomieniu internalizacji i degradacji tego białka przez LPS. Zahamowanie degradacji lizosomalnej skutkuje wzrostem aktywności czynników transkrypcyjnych uruchamianych przez aktywowany TLR4.

W trakcie dalszych badań Habilitantka potwierdziła, że ilość endocytywanego TLR4 zależy od stymulacji komórek LPS i koreluje z poziomem aktywacji kinazy TBK1. W przypadku CD14 ilość endocytywanego białka jest znacząca nawet w komórkach niestymulowanych i jest tylko w niewielkim stopniu zwiększana przez LPS. Co więcej, po etapie recyrkulacji następuje wyraźny ubytek zinternalizowanego CD14. Można wnioskować, że białko jest stale endocytywane, odzyskiwane ze szlaku endo-lizosomalnego i trafia z powrotem na powierzchnię komórki. Jednak możliwe było alternatywne wyjaśnienie, związane z możliwością degradacji lizosomalnej endocytywanego CD14. Aby rozstrzygnąć tę kwestię dr Ciesielska sprawdziła, w jakim stopniu ubytek CD14 wynika z jego degradacji, a w jakim z recyrkulacji. Wykazała, że część internalizowanego CD14 ulega degradacji lizosomalnej, ale znacząca jego pula ulega recyrkulacji z powrotem do błony komórkowej w sposób niezależny od LPS.

Dzięki przeprowadzonym badaniom Habilitantka po raz pierwszy w bezpośredni sposób wykazała, że obieg CD14 w makrofagach związany jest z internalizacją CD14 z błony komórkowej w celu jego degradacji w lizosomach i transportem nowopowstałych cząsteczek na powierzchnię komórek, a także z recyklingiem endocytywanego białka. Ten ostatni proces może ułatwiać utrzymanie optymalnego poziomu CD14 na powierzchni makrofagów.

Następnie postanowiła poszukać białek zaangażowanych w odzyskiwanie CD14 z dojrzewających endosomów, zanim białko trafi do lizosomów i zostanie zdegradowane. Wykazała, że cząsteczki CD14, występujące w błonie komórkowej, pochodzą z nowopowstającej puli białka oraz z recyrkulującej puli białka, tzn. takiej, która wraca na powierzchnię komórki po wcześniejszej internalizacji. Białkami, zaangażowanymi w odzyskiwanie endocytywanego CD14 i dostarczanie białka na błonę komórkową, są: SNX1, SNX2 i SNX6. W komórkach, wykorzystywanych w badaniach, wyciszenie ekspresji genów białek SNX1 i/lub SNX2, SNX6 skutkowało obniżeniem ilości CD14 w błonie komórkowej, zmniejszeniu ulegała również liczba pęcherzyków zawierających recyrkulujący CD14; przedłużające się niedobory białek SNX1/2, i tym samym utrzymujące się zaburzenia recyrkulacji, pogłębiały ubytek CD14 w błonie komórkowej i w efekcie skutkowało również obniżeniem całkowitej ilości tego białka.

W przypadku TLR4 wyciszenie ekspresji genów dla SNX1/2 przynosiło odwrotny skutek prowadząc do wzrostu jego ilości, jednakże ścieżka sygnałowa zależna od TRIF była hamowana.

W ostatnim artykule, zawartym w cyklu prac przedstawionym jako osiągnięcie, Habilitantka opisała wyniki swoich badań, w których postanowiła sprawdzić, czy lipidy mogą modulować intensywność odpowiedzi zapalnej poprzez bezpośrednie oddziaływanie z białkami uczestniczącymi w aktywacji szlaków sygnałowych TLR4 – a nie tylko przez modulację błon komórkowych. Wskazanie receptorów, za pośrednictwem których lipidy o właściwościach cząsteczek sygnałowych modulują odpowiedź zapalną, oraz określenie interakcji szlaków sygnałowych receptora TLR4 ze szlakami uruchamianymi przez inne receptory, mogłoby pozwolić na identyfikację związków, pozwalających na regulowanie aktywności TLR4

i potencjalnie przydatnych w celach terapeutycznych. Dr Ciesielska postanowiła sprawdzić, czy występuje krzyżowanie pomiędzy szlakami sygnałowymi receptorów biologicznie aktywnego fosfolipidu – kwasu lizofosfatydowego (LPA) oraz TLR4, a jeśli tak to, czy ma ono znaczenie w odpowiedzi zapalnej makrofagów na LPS. W wykorzystanych w badaniach liniach komórkowych zaobserwowała wpływ LPA na spadek aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od MyD88 w komórkach stymulowanych LPS. Było to związane ze spadkiem produkcji wielu cytokin i chemokin, m.in. czynnika martwicy nowotworu- $\alpha$  (ang. tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) i CXCL1 (zwana również cytokiną pochodzącą z keratynocytów (ang. keratinocyte-derived cytokine (KC)), natomiast aktywacja szlaku zależnego od TRIF nie ulegała zmianie.

Poszukując mechanizmu, na drodze którego LPA negatywnie wpływa na produkcję TNF- $\alpha$  indukowaną przez LPS, dr Anna Ciesielska wykazała, że w obecności LPA, aktywacja receptora TLR4 przez LPS prowadzi do zwiększonej produkcji IL-10, cytokiny o aktywności przeciwzapalnej; wzrost produkcji IL-10 był ściśle związany ze spadkiem ilości TNF- $\alpha$  w czasie stymulacji komórek przez LPA i LPS. Zaobserwowała również, że przeciwzapalna aktywność LPA nie wynika z jego bezpośredniego oddziaływania z CD14, gdyż LPA hamował produkcję TNF- $\alpha$  również w makrofagach izolowanych z myszy pozbawionych ekspresji genu kodującego CD14. U podstaw przeciwzapalnych właściwości LPA mogą więc znajdować się szlaki sygnałowe uruchamiane przez aktywowane receptory LPA5 i LPA6. Szlaki te krzyżują się ze szlakami sygnałowymi TLR4, prowadząc do wzmożonej produkcji IL-10, co skutkuje zmniejszoną produkcją TNF- $\alpha$  w makrofagach stymulowanych LPS.

Osiągnięcie przedstawione przez dr Annę Ciesielską wnosi istotny wkład do wiedzy na temat mechanizmów molekularnych, uczestniczących w rozwoju procesów zapalnych indukowanych LPS. Prowadzone przez Habilitantkę badania pozwoliły na dokładniejsze poznanie szlaków molekularnych, związanych z aktywacją TLR4, co może mieć znaczenie dla lepszego zrozumienia funkcjonowania procesów odpornościowych, jak też patogenyzy wielu chorób człowieka, nie tylko tych bezpośrednio związanych z infekcjami bakteryjnymi.

Zaobserwowano, że stymulacja makrofagów ligandami TLR4 promuje wychwytywanie lipidów przez te komórki; TLR i ich ligandy mogą zakłócać mechanizmy wypływu cholesterolu. Procesy te mogą się przyczyniać do powstawania komórek piankowatych i rozwoju zmian miażdżycowych. TLR4 może mieć związek nie tylko z rozwojem blaszki miażdżycowej, ale też z jej niestabilnością – zaobserwowano, że cząsteczki utlenionych lipoprotein o małej gęstości (ang. oxidized low-density lipoproteins, oxLDL), kumulujące się w blaszkach miażdżycowych, nasilają uwalnianie cytokin prozapalnych i prowadzą do produkcji metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej MMP-9 w sposób zależny od TLR4/NF- $\kappa$ B [Aging Cell 2015;14:569–581. doi:10.1111/ace.12322AgingCell].

TLR4 ma również związek z progresją kliniczną choroby Huntingtona (ang. Huntington disease, HD), a polimorfizm genu *TLR4* jest jednym z genetycznych modyfikatorów HD [Mov Disord 2020;35:401–408. doi: 10.1002/mds.27911].

Wykazano, że TLR4 ulega ekspresji na komórkach mikrogleju i odgrywa kluczową rolę w rozwoju reakcji zapalnej poprzez wiązanie się z włóknami amyloidu  $\beta$ , a uwalnianie produktów neurotoksycznych przez mikroglej jest zależne od TLR4 – z tego względu receptor ten został uznany za potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu choroby Alzheimerera (ang. Alzheimer disease, AD); w badaniach doświadczalnych selektywny antagonist receptoru TLR4 zniósł indukowaną oligomerem A $\beta$  aktywację mikrogleju i upośledzenie pamięci. Interesująca jest obserwacja dotycząca łagodzenia tauopatii związanej z AD w następstwie przewlekłej stymulacji TLR4, co prawdopodobnie wynika z aktywacji autofagii neuronalnej [J Immunol 2016;197:3281–3292. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600873>].

Ekspresję TLR4 zidentyfikowano na powierzchni komórek tłuszczowych – jego aktywacja może stymulować lipolizę; receptor ten jest też obecny na komórkach śródbłonna naczyń skóry i tkanki podskórnej, a także w obrębie fibroblastów ludzkiej skóry. Uważa się, że ma on znaczenie w zakażeniach grzybiczych, łuszczycy, toczeniu rumieniowatym układowym, atopowym zapaleniu skóry i alergicznym wyprysku kontaktowym, w trądziku, a także w nowotworach skóry: raku kolczystokomórkowym i czerniaku złośliwym [Przeegl Dermatol 2014;101:309–318. doi: 10.5114/dr.2014.45126].

Wykazano, że TLR ulegają ekspresji w komórkach nowotworowych i są powiązane z onkogenezą i progresją guza. Dotyczy to różnych TLR, ale w szczególności TLR 4; aktywacja szlaków sygnałowych tego receptora może mieć związek z nowotworami piersi, jajnika, prostaty, głowy i szyi. Wykazano, że promuje on wzrost i chemooporność komórek nabłonkowych raka jajnika. W liniach komórkowych raka prostaty ekspresja TLR4 wykazywała dodatnią korelację z potencjałem do tworzenia przerzutów [J Cell Physiol 2021;236:4121-4137. doi: 10.1002/jcp.30166].

W wielu badaniach potwierdzono związek TLR4 z rozwojem schorzeń alergicznych. Obecnie prowadzone są badania kliniczne dotyczące możliwości wykorzystania ligandów TLR jako nowej metody zapobiegania i leczenia astmy i alergicznego nieżytu nosa [Postepy Hig Med Dosw (Online) 2014;68:230-237. Polish. doi: 10.5604/17322693.1093202].

To wybrane przykłady chorób, w których patogenezie/ przebiegu istotną rolę pełni aktywacja TLR4. Wyniki badań, prowadzonych przez Habilitantkę, mogą pozwolić na lepsze zrozumienie znaczenia tego receptora i na opracowanie nowych metod profilaktyki czy terapii, m.in. związanych z zastosowaniem modyfikatorów szlaków sygnałowych tego receptora.

Badania, dotyczące kaskad sygnałowych TLR4, są przez Habilitantkę kontynuowane. W kolejnym projekcie pt. „Mechanizmy kontrolujące endocytozę CD14 jako regulatory odpowiedzi zapalnej makrofagów”, realizowane są badania, których celem jest identyfikacja białek i lipidów zaangażowanych w internalizację CD14. Dr Anna Ciesielska pełni rolę kierownika tego projektu.

### **Ocena pozostałej aktywności naukowej oraz wskaźników naukowych**

Habilitantka realizowała działalność naukową w kilku instytucjach naukowych krajowych (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie, współpraca z zespołem Instytutu Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej) i zagranicznych (Instytut Farmacji i Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Strathclyde w Glasgow, UK). Współpracowała również z Zakładem Cytologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (2019 r.) w ramach realizacji badań, będących podstawą do przygotowania pracy magisterskiej, której była promotorem (tytuł pracy: "Określenie roli retromeru w regulacji odpowiedzi zapalnej mysich makrofagów").

Dr Anna Ciesielska posiada w swoim dorobku publikacyjnym 19 artykułów; w 9/19 prac (47,4%) była ona pierwszym autorem.

Dorobek naukowy Habilitantki obejmuje:

- 4 prace opublikowane w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora; 3 ukazały się w czasopiśmie krajowych, 1 – w zagranicznym. Jedna z tych prac została opublikowana w czasopiśmie posiadającym IF oraz punktację MNiSW/MEN (4,21; 100 pkt.), jedna – w czasopiśmie posiadającym punktację MNiSW/MEN (20 pkt); dwie prace ukazały się w czasopiśmie nieposiadających IF ani punktacji MNiSW/MEN. Wszystkie prace, opublikowane w tym okresie, mają charakter przeglądowy. Habilitantka jest pierwszym autorem 3 prac.



- 15 prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, w tym 5 prac przeglądowych i 10 oryginalnych.

Spośród tych prac sześć zostało włączonych do cyklu, przedstawionego jako podstawa do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Wśród pozostałych 9 prac trzy – to prace przeglądowe, zaś sześć – eksperymentalne; w jednej z tych prac (praca przeglądowa) Habilitantka jest głównym autorem (jako jeden z dwóch autorów); w pozostałych pracach oryginalnych i przeglądowych wymieniona jest jako współautor.

Średni wskaźnik IF dla prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora wynosi 5,93; średnia punktacja MNiSW/MEN: 106 pkt.

Prace dr Anny Ciesielskiej zostały zauważone w środowisku naukowym. Były one cytowane ponad 560 razy (według WoS; średnia liczba cytowań wynosi 31,86 (min-max: 1 – 251) (liczba cytowań bez autocytowań wynosi 538), co przekłada się na Jej indeks Hirscha wynoszący 9.

Dr Anna Ciesielska wykazała, że jest dojrzałym i aktywnym naukowcem, potwierdziła wysokie kompetencje w zakresie planowania i prowadzenia badań naukowych z zastosowaniem najnowocześniejszych technik, jednak pewne wątpliwości z mojej strony budzi fakt ograniczonej współpracy zagranicznej, co można uznać za słaby element dorobku. W całym dorobku Habilitantki jest tylko jedna praca z udziałem autorów zagranicznych. Co prawda Habilitantka podaje informacje o rocznym stażu odbytym na Uniwersytecie Strathclyde (Glasgow, UK) w Instytucie Farmacji i Nauk Biomedycznych w grupie prof. Nigela Pyne, w ramach „Programu Wspólnych Doktoratów” („Joint PhD Scheme”), jednak jedynym efektem tej współpracy były wyniki badań zaprezentowane w postaci plakatu podczas 52nd International Conference on the Bioscience of Lipids (Warszawa, Polska 2011), a Habilitantka aktualnie nie kontynuuje współpracy z tym ośrodkiem.

W dokumentacji przygotowanej przez Habilitantkę brak informacji o członkostwie w organizacjach i towarzystwach krajowych lub międzynarodowych.

Dr Anna Ciesielska wykazała niewielką aktywność w zakresie wystąpień i uczestnictwa w konferencjach czy warsztatach naukowych krajowych i międzynarodowych. W ciągu 16-letniej pracy badawczej wzięła udział w 8 konferencjach naukowych (w 2 przed oraz w 6 po uzyskaniu stopnia doktora; ostatnia konferencja, w której uczestniczyła, miała miejsce 4 lata temu (2019 r.)). Trzy z tych konferencji organizowane były za granicą.

Podczas konferencji prezentowane były plakaty przedstawiające wyniki badań prowadzonych przez zespoły badawcze z udziałem Habilitantki (była ona pierwszym autorem 6 z 7 prezentacji plakatowych). Dr Ciesielska wygłosiła również jeden wykład podczas Kongresu Bio 2014 organizowanego przez Polskie Towarzystwa: Biochemiczne, Biologii Komórki, Biofizyczne i Bioinformatyczne (Polska, Warszawa, 2014).

Mocną stroną dorobku naukowego Habilitantki jest jej udział w realizacji projektów badawczych finansowanych ze środków NCN czy NCBiR, w tym jej doświadczenie w kierowaniu projektami.

Dr Anna Ciesielska aktualnie pełni rolę kierownika projektu badawczego finansowanego ze środków NCN: OPUS–20 „Mechanizmy kontrolujące endocytozę CD14 jako regulatory odpowiedzi zapalnej makrofagów”.

W latach 2013-2016 oraz 2017-2021 pełniła rolę kierownika dwóch projektów dofinansowanych przez NCN:

- NCN FUGA–2 „Kwas lizobisfosfatydowy – nowa cząsteczka sygnałowa i modulator aktywności prozapalnej makrofagów wywoływanej przez kwas lizofosfatydowy i lipopolisacharyd”,

- SONATA-12 „Rola retromeru w kontrolowaniu odpowiedzi zapalnej makrofagów stymulowanych przez lipopolisacharyd”;

oba projekty były realizowane w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Uczestniczyła również w realizacji projektów dofinansowanych ze źródeł zewnętrznych w roli wykonawcy:

- po uzyskaniu stopnia doktora: 1 projekt NCBiR (2013 r. “Innowacyjne produkty mleczne w profilaktyce i łagodzeniu skutków cukrzycy typu II”);

- przed uzyskaniem stopnia doktora: 2 projekty: NCN OPUS-1 „Chemiczna synteza 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowych oraz 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowych analogów wybranych lizofosfolipidów (lizofosfatydylocholina, lizofosfatydyloinozytol, lizofosfatydyloetanol- amina) i wstępne badania ich aktywności biologicznej” oraz MNiSW „Synteza i aktywność biologiczna tiofosforanowych i ditiofosforanowych analogów lizofosfolipidów”; oba projekty były realizowane na Politechnice Łódzkiej).

Przed uzyskaniem stopnia doktora dr Ciesielska realizowała jako wykonawca badania finansowane z grantu naukowego JM Rektora Politechniki Łódzkiej (2010-2011).

W 2008 r otrzymała stypendium celowe w związku z realizacją Projektu „Stypendia wspierające innowacyjne badania naukowe doktorantów” finansowanego w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego na realizację projektu „Aktywność biologiczna tiofosforanowych i ditiofosforanowych analogów kwasu lizofosfatydowego i cyklicznego kwasu fosfatydowego”; badania były realizowane w okresie 01.2008-05.2009 na Politechnice Łódzkiej.

Dr Anna Ciesielska odbyła dwa staże naukowe, w tym jeden przed uzyskaniem stopnia doktora (06.2009-06.2010 - roczny staż realizowany w grupie prof. Nigela Pyne w Instytucie Farmacji i Nauk Biomedycznych na Uniwersytecie Strathclyde (Glasgow, UK) w ramach „Programu Wspólnych Doktoratów” („Joint PhD Scheme”)) oraz jeden po uzyskaniu stopnia doktora (1.10.2013-30.09.2016 staż realizowany w ramach projektu FUGA – 2 w grupie prof. dr hab. Katarzyny Kwiatkowskiej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego).

Na uwagę zasługuje fakt, że Habilitantka jest dostrzegana w środowisku naukowym krajowym i międzynarodowym. Świadczy o tym 13 wykonanych przez nią recenzji dla krajowych i zagranicznych czasopism naukowych (np. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology (2019), General Physiology and Biophysics (2019), Acta Biochimica Polonica (2019) International Journal of Environmental Research and Public Health (2020), International Journal of Molecular Sciences (2020, 2021) Marine Drugs (2021), Nutrients (2021), Biochemistry and Biophysics Reports (2021), Pharmaceuticals (2021), Acta Biomaterialia (2022, 2021), FEBS letters (2022)).

Ponadto w 2021 r dr Anna Ciesielska recenzowała projekt zgłoszony do Czech Science Foundation.

Habilitantka otrzymała dwie nagrody, w tym jedną za pracę doktorską – ufundowaną przez Polmos Żyrardów (2013 r.) oraz nagrodę zespołową przyznaną przez Wydział II Nauk Biologicznych i Rolniczych PAN (2018 r.).

### **Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej oraz współpracy z otoczeniem społeczno-gospodarczym**

Działalność dydaktyczna Habilitantki obejmowała pełnienie funkcji promotora pomocniczego w jednym przewodzie doktorskim, promotorstwo jednej pracy magisterskiej, a także rolę opiekuna dwóch stażystek – uczestniczek programu POWR („Sukces z natury – kompleksowy program podniesienia jakości zarządzania procesem kształcenia i jakości nauczania Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie” nr POWR.03.05.00-00-Z033/17. (02.11.2021 – 21.01.2022) oraz „Młodzi, kompetentni, zatrudnieni – program aktywizacji zawodowej osób niepełnosprawnych w wieku 18-24 r.ż. z województwa mazowieckiego”

nr POWR. 01.02.01.-14-0123/15 (01.06.2017 - 31.08.2017) oraz opiekuna studentów odbywających obowiązkowe praktyki.

W ramach działalności, związanej z popularyzacją wiedzy, Habilitantka przeprowadziła zajęcia warsztatowe dla uczniów dwóch warszawskich Liceów Ogólnokształcących (2019 r., 2022 r.), wygłosiła 2 wykłady podczas Festiwalu Nauki (2019r, 2020 r.) oraz jeden wykład w ramach Wykładów Fundacji M. Nenckiego Wsparcia Nauk Biologicznych (2019 r.). Nagrała również film, który został opublikowany na kanale WBLifeScience You Tube (2015 r.).

W przedstawionej dokumentacji dr Anna Ciesielska nie wykazała osiągnięć w zakresie działalności organizacyjnej; nie przedstawiła także działań w zakresie współpracy z otoczeniem społecznym i gospodarczym.

### **Wniosek końcowy**

Podsumowując dotychczasowe osiągnięcia dr Anny Ciesielskiej stwierdzam, że w mojej ocenie Kandydatka spełnia ustawowe warunki nadania stopnia doktora habilitowanego określone w art. 219 ust. 1 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.0.742 t.j.):

1. posiada stopień naukowy doktora nauk technicznych;
2. w swoim dorobku naukowym posiada osiągnięcia, stanowiące znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauk biologicznych, w tym cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie naukowych, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. B.

Badania, prowadzone przez Habilitantkę oraz uzyskane wyniki, mają duże znaczenie poznawcze i wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny nauk biologicznych, o czym świadczy fakt, że zostały opublikowane w pismach o międzynarodowym zasięgu z Listy Filadelfijskiej. Jakość dorobku naukowego Habilitantki jest potwierdzona wysoką punktacją MNiSW/MEN oraz wysokim międzynarodowym współczynnikiem oddziaływania „impact factor” publikacji, których jest ona autorem/ współautorem.

Zarówno zakres tematyczny, jak i zawartość merytoryczna cyklu powiązanych ze sobą tematycznie publikacji, który został przedstawiony jako osiągnięcie będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, spełnia warunki zawarte w art. 219 ust. 1 pkt 2 lit. a Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. "Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" (Dz. U. 2018 poz. 1668);

3. wykazuje się istotną aktywnością naukową, która była realizowana w więcej niż jednej instytucji naukowej (Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej (studia doktoranckie); Instytut Biochemii Technicznej (obecnie Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej) przy Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej; Pracownia Biologii Molekularnej Błony Komórkowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN), w szczególności zagranicznej (Instytut Farmacji i Nauk Biomedycznych na Uniwersytecie Strathclyde (Glasgow, UK)).

W związku z powyższym, pozytywnie opiniuję wniosek dr Anny Ciesielskiej o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.