



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE  
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 13.07.2023 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak,  
Samodzielne Laboratorium Biologii Komórek  
Macierzystych i Nowotworowych

### Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamili Kwiecień

#### Temat rozprawy: Regulacja ekspresji chemeryny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamili Kwiecień wykonana została pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Joanny Cichy oraz dr Mateusza Kwitniewskiego w Zakładzie Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi zbiór spójnych tematycznie artykułów naukowych w skład, której wchodzi dwie prace oryginalne, opublikowane w międzynarodowych recenzowanych czasopismach naukowych: *Scientific Reports* (2020 r.) i *Molecular Biology Reports* (2023 r.) oraz jedna praca przeglądowa opublikowana w międzynarodowym czasopiśmie *Cytokine & growth factors review* (2019 r.), co stanowi o właściwym poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych również przez niezależnych recenzentów. Pani mgr Kamila Kwiecień jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac, co świadczy o tym, że Doktorantka miała istotny wkład w wykonaniu przedstawionych prac eksperymentalnych, opracowaniu wyników oraz ich przygotowaniu do publikacji. Wiodący wkład Doktorantki w powstaniu prac badawczych nie budzi wątpliwości, wkład Doktorantki został wskazany w 50% dla pracy opublikowanej w *Scientific Reports* oraz w 40% dla pracy opublikowanej w *Molecular Biology Reports*. Wiodąca rola Doktorantki została potwierdzona przez współautorów publikacji. W przypadku wieloautorskiej pracy przeglądowej (10 autorów) udział Doktorantki szacowany jest na 12%.

Badania naukowe zostały zrealizowane w ramach dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki tj. Sonata Bis 3 (nr UMO-2013/10/E/NZ6/00745), kierowanego przez dr M. Kwitniewskiego, oraz Symfonia 2 (nr UMO-2014/12/W/NZ6/00454) kierowanego przez prof. dr. hab. J. Cichy. Ponadto, wsparcie finansowe w realizacji badań niniejszej dysertacji, Doktorantka uzyskała w Projekcie Badawczym dla Młodych Naukowców nr BMN2020-N19/MNS/000037, którego była kierownikiem, finansowanym w ramach dotacji celowanej MNiSW oraz budżetu WBBiB Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Przedstawiona poniżej recenzja rozprawy doktorskiej przedstawia ocenę wartości merytorycznej całego osiągnięcia naukowego oraz zgodności założeń i tematu z wynikami końcowymi, a nie stanowi oceny merytorycznej poszczególnych prac składających się na dysertację doktorską.





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Chemeryna należy do grupy adipocytokin, jest białkiem syntetyzowanym przez frakcję białą tkanki tłuszczowej oraz wątrobę, jednakże, jej obecność została potwierdzona niemal we wszystkich tkankach i komórkach organizmu. Ma działanie plejotropowe, w sposób autokryny i parakryny wywiera wpływ na dojrzewanie i różnicowanie adipocytów, a co za tym idzie sprzyja rozwojowi tkanki tłuszczowej. Badania wskazują, że chemeryna ma wpływ na funkcjonowanie układu odpornościowego poprzez jej działanie chemotaktyczne w odniesieniu do niedojrzałych komórek dendrytycznych, makrofagów i limfocytów NK co sprzyja indukcji stanu zapalnego. Wzrost poziomu chemeryny we krwi obwodowej koreluje ze wzrostem poziomu markerów stanu zapalnego tj. TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP. Podwyższone stężenie chemeryny w surowicy krwi zostało udokumentowane w wielu chorobach o podłożu zapalnym w tym w nieswoistych chorobach zapalnych jelit, w reumatoidalnym zapaleniu stawów, w łuszczycy, oraz w otyłości i zespole metabolicznym. Chemeryna wpływa na metabolizm tłuszczów i węglowodanów a jej wysokie stężenie jest negatywnym wykładnikiem zdrowia. W przypadku otyłości badanie poziomu chemeryny mogłoby stanowić wczesny biomarker zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej oraz zespołu metabolicznego. Przewlekły uogólniony stan zapalny o niewielkim nasileniu, indukowany przez otyłość, powoduje zmiany w obrębie komórek tkanki tłuszczowej na poziomie komórkowym i molekularnym, jednakże mechanizmy kontroli ekspresji chemeryny nie zostały dokładnie poznane. Poznanie komórkowo-specyficjnej regulacji produkcji chemeryny w warunkach fizjologicznych i zapalnych pozwoli na poszerzenie wiedzy w tym obszarze i takiego zadania podjęła się Doktorantka w badaniach stanowiących niniejszą rozprawę doktorską.

#### **Ocena formalna pracy:**

Rozprawę doktorską rozpoczyna spis treści, po nim zamieszczone zostały streszczenia w języku polskim oraz angielskim, w których Doktorantka w sposób zwięzły i komunikatywny przedstawia cel i osiągnięcia swojej pracy doktorskiej. Następny rozdział stanowi Wprowadzenie, w którym Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiała istotne zagadnienia dotyczące biologicznej funkcji chemeryny i jej zaangażowania w procesach fizjologicznych i patologicznych. Na bazie przedstawionych informacji został sformułowany Cel pracy, który stanowi odrębny rozdział. Kolejny rozdział, Wyniki, stanowi omówienie wyników przedstawionych w opublikowanych pracach badawczych oraz dodatkowych, nieopublikowanych wyników, które zostały uzyskane w trakcie realizacji Projektu dla Młodych Naukowców i Doktorantów. Następnie zamieszczono Podsumowanie, Bibliografię i Spis publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora. Wykaz publikacji, które Doktorantka przedstawiała do oceny, został przedstawiony w formie trzech Załączników, które zostały poprzedzone opisem wkładu pracy i udziałem procentowym wszystkich autorów publikacji, potwierdzonym przez współautorów.

Od strony formalnej rozprawa doktorska w przedstawionej formie spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, jest cyklem opublikowanych artykułów i nieopublikowanych wyników poświęconych danej tematyce badawczej i stanowi spójne dzieło zawierające wyniki badań eksperymentalnych Doktorantki, przedstawione w kontekście wyznaczonych celów i zadań badawczych oraz dotychczasowej wiedzy w obszarze badawczym.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

### Ocena merytoryczna:

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią artykuły naukowe, opublikowane w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, które zostały poddane szczegółowej recenzji przez międzynarodowych ekspertów m.in. w zakresie jakości, stosowanej metodyki badań oraz interpretacji i znaczenia prezentowanych wyników. Moja ocena, jako recenzenta rozprawy, przedstawia ocenę wartości merytorycznej całego osiągnięcia naukowego.

Zarówno cel pracy jak i zakres badań zostały w rozprawie jasno sformułowane w odniesieniu do przedstawionego aktualnego stanu wiedzy. Celem głównym pracy było zbadanie mechanizmów kontroli ekspresji chemeryny w warunkach fizjologicznych i prozapalnych. Badania wykonano w formie trzech zadań badawczych a wyniki opublikowano w dwóch pracach oryginalnych, w których zaadresowane zostały cele szczegółowe: (1) Określenie wpływu cytokin prozapalnych na ekspresję chemeryny w różnych komórkach i tkankach, ze szczególnym uwzględnieniem głównych producentów tego białka – hepatocytów i adipocytów [Załącznik 1. *Scientific Reports* (2020 r.) i Załącznik 2. *Molecular Biology Reports* (2023 r.)]; (2) Ustalenie mechanizmów kontroli ekspresji chemeryny, zarówno konstytutywnej jak i indukowanej cytokinami prozapalnymi [Załącznik 1. *Scientific Reports* (2020 r.)]; (3) Zdefiniowanie wpływu alternatywnego splicingu na produkcję i funkcje chemeryny [Załącznik 2. *Molecular Biology Reports* (2023 r.)].

Uzyskane wyniki zostały starannie udokumentowane i opublikowane w formie tabel, rycin i wykresów a ich znaczenie zostało potwierdzone stosowną analizą statystyczną.

W Zadaniu 1 Autorka zbadała wpływ cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$  i onkostatyny M (OSM) na tkankową ekspresję chemeryny w modelu mysim. W czasie 5-cio dniowej obserwacji zauważono, że ekspresja chemeryny w heterogennej frakcji komórkowej SVF (ang. stromal vascular fraction) lub wyizolowanych preadipocytów o fenotypie SCA-1+ (ang. stem cell antigen 1) po stymulacji cytokinami IL-1 $\beta$  lub kombinacją cytokin IL-1 $\beta$  + OSM nie rośnie gwałtownie, tylko zwiększa się z czasem ekspozycji na czynniki prozapalne. Zaobserwowano zarówno wzrost wartości transkryptu chemeryny (mRNA Rarres2) jak i poziomu białka (test ELISA). Z kolei hepatocyty nie były wrażliwe na działanie w.w. cytokin prozapalnych, co może świadczyć o tym, że zwiększenie poziomu chemeryny pod wpływem badanych cytokin prozapalnych jest specyficzne dla tkanki tłuszczowej, przy czym efekt ten jest zależny od adipocytów. W metodologii zamieszczonej w publikacji [Załącznik 1. *Scientific Reports* (2020 r.), Fig. 2-A-B, Fig 2C-D], do której odwołuje się Doktorantka, nie ma informacji czy użyte cytokiny IL-1 $\beta$  (10ng/mL) i OSM (50ng/ml) były zastosowane jednorazowo, tak jak w przypadku obserwacji 48 godzinnej referencyjnej linii komórkowej preadipocytów 3T3-L1, czy były suplementowane w kolejnych dniach obserwacji, czy miała miejsce wymiana pożywki hodowlanej?

W Zadaniu 2 Doktorantka zbadała mechanizmy regulujące ekspresję chemeryny w warunkach konstytutywnych i uwarunkowanych obecnością cytokin prozapalnych w modelu mysim. Badania dokumentują, że za konstytutywną ekspresję chemeryny w komórkach odpowiada niższy wskaźnik metylacji DNA fragmentu proksymalnego promotora chemeryny. Stymulacja adipocytów cytokinami prozapalnymi powoduje wzrost metylacji dystalnego fragmentu promotora chemeryny i w konsekwencji wzrost ekspresji chemeryny. Doktorantka wykazała



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

również, że badane cytokiny prozapalne IL-1 $\beta$  i OSM uruchamiają odmienne czynniki transkrypcyjne odpowiadające za wzrost ekspresji chemeryny, stymulacja IL-1 $\beta$  zależna jest od aktywacji NF $\kappa$ B, natomiast synergistyczne zastosowanie IL-1 $\beta$  i OSM związane jest z aktywacją STAT3.

Trzecim zadaniem było zdefiniowanie wpływu alternatywnego splicingu na produkcję i funkcje chemeryny. W tej części pracy, do zbadania roli alternatywnego splicingu w regulacji ekspresji chemeryny w ludzkim i mysim materiale pochodzącym z białej tkanki tłuszczowej oraz z wątroby, wykorzystano metodę RACE PCR (Rapid amplification of cDNA ends). Zgodnie do obecnego stanu wiedzy, w materiale ludzkim zidentyfikowano tylko jeden wariant chemeryny, natomiast w tkankach pochodzących od myszy zidentyfikowano trzy warianty transkrypcyjne: wariant 1 (mChem163K), wariant 2 (mChem162K) i nieopisany do tej pory rodzaj transkryptu nazwany wariantem 4, generujący izoformę białka (mChem153K) o 10 aminokwasów krótszą od formy podstawowej. Znane dotychczas warianty transkrypcyjne 1 i 2 związane są z aktywnością chemotaktyczną i antybakteryjną, natomiast funkcja nowego wariantu 4 nie jest w pełni poznana.

Pytanie recenzenta do przedstawionych wyników: czy na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka może wskazać jaką rolę może pełnić wariant 4 w regulacji aktywności chemeryny?

Dopełnieniem wiedzy dotyczącej aktywności biologicznej chemeryny jest praca przeglądowa dotycząca funkcji obronnej komponentów komórkowych budujących warstwy skóry, w tym aktywności antybakteryjnej chemeryny, której ekspresję udokumentowano w keratynocytach, fibroblastach i adipocytach podskórnej tkanki tłuszczowej [Załącznik 3. *Cytokine & growth factors review (2019 r.)*].

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowane zostały 3 wnioski w formie opisowej ilustrowane graficznym podsumowaniem wyników rozprawy doktorskiej. Wnioski zostały odpowiednio sformułowane w odniesieniu do zaplanowanych zadań badawczych i stanowią wypadkową przeprowadzonych badań eksperymentalnych a nie tylko podsumowanie wyników poszczególnych publikacji.

Uwagi redakcyjne:

W podpisie pod Ryc. 2, umieszczoną w rozdziale Wyniki (str. 23), nie należy używać nazwy angielskiej „Figura uzupełniająca ...”, korzystniejsze będzie wyrażenie „Rycina uzupełniająca”.

W pracy Doktorantka wielokrotnie używa wyrażenia „ilość transkryptu/białka”, poprawnie powinno być „poziom transkryptu/białka” lub „ekspresja transkryptu/białka”.

W czasie oceny rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań:

1. W literaturze istnieją doniesienia nie tylko o prozapalnym ale także o przeciwzapalnym działaniu chemeryny (J. Immunol., 2009;183 6489-6499). W jaki sposób można wyjaśnić te sprzeczne doniesienia?
2. Jaki jest stan wiedzy dotyczący rozwoju badań i zastosowania pochodnych chemeryny w leczeniu chorób o podłożu zapalnym?





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Podsumowując, nowatorski charakter pracy doktorskiej mgr Kamili Kwiecień wpisuje się w ważny aspekt badań dotyczących mechanizmów rozwoju chorób o podłożu zapalnym, w tym istotnego problemu cywilizacyjnego jakim jest zespół metaboliczny.

Chemeryna jest białkiem o plejotropowym działaniu a jej funkcja biologiczna jako chemoatraktantu lub adipokiny jest związana z mikrośrodowiskiem, w którym się znajduje. Regulacja ekspresji chemeryny, zarówno fizjologicznej jak i wywołanej czynnikami prozapalnymi, jest procesem wielotorowym na poziomie transkrypcyjnym, w którym zaangażowane są różne mechanizmy kontroli transkrypcji chemeryny zależne m.in. od czynnika indukującego proces zapalny, co Doktorantka wykazała w swojej pracy.

Niniejsza dysertacja doktorska ma istotne znaczenie poznawcze a jej wyniki mogą stanowić podstawę opracowania nowych procedur diagnostycznych w rozpoznawaniu chorób związanych z zaburzeniem fizjologicznej funkcji chemeryny. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią oryginalne osiągnięcie naukowe i niosą istotny wkład w rozwój nauk biologicznych w obszarze badań mechanizmów rozwoju chorób o podłożu zapalnym.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Kamili Kwiecień do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Aleksandra  
Maria  
Klimczak

Elektronicznie  
podpisany przez  
Aleksandra Maria  
Klimczak  
Data: 2023.07.13  
13:33:05 +02'00'

