



Prof. dr hab. Nina Smolińska
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
10-718 Olsztyn
Ul. Oczapowskiego 1A

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Kamili Kwiecień
pt. „Regulacja ekspresji chemeryny”
wykonanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Joanny Cichy i dr. Mateusza Kwitniewskiego
w Zakładzie Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Rozprawę doktorską stanowią dwie publikacje oryginalne i jedna przeglądowa – niżej wyszczególnione – opublikowane w języku angielskim w renomowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, których łączny wskaźnik *IF* z roku opublikowania wynosi **13,162** a liczba punktów *MEiN* wynosi **350**.

1. **Kwiecień K**, Brzoza P, Bak M, Majewski P, Skulimowska I, Bednarczyk K, Cichy J, Kwitniewski M. The methylation status of the chemerin promoter region located from - 252 to + 258 bp regulates constitutive but not acute-phase cytokine-inducible chemerin expression levels. *Scientific Reports* 2020; 10(1):13702. doi: 10.1038/s41598-020-70625-7. (*IF* – 4,38; *pkt. MEiN* – 140)
2. **Kwiecień K**, Majewski P, Bak M, Brzoza P, Godlewska U, Skulimowska I, Cichy J, Kwitniewski M. Alternative splicing is not a key source of chemerin isoforms diversity. *Molecular Biology Reports* 2023; 50(3):2521-2529. doi: 10.1007/s11033-022-08174-7. (*IF* – 2,8; *pkt. MEiN* – 70)

3. **Kwiecien K**, Zegar A, Jung J, Brzoza P, Kwitniewski M, Godlewska U, Grygier B, Kwiecinska P, Morytko A, Cichy J. Architecture of antimicrobial skin defense. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2019; 49:70-84. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.08.001. (*IF – 5,982; pkt. MEiN – 140*)

Publikacje są współautorskie (od 8 do 10 autorów) i Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Autorem korespondencyjnym w dwóch publikacjach oryginalnych jest Pan Promotor pomocniczy, dr Mateusz Kwitniewski. W publikacji trzeciej autorem korespondencyjnym jest Pani Promotor prof. dr hab. Joanna Cichy. Z przedłożonych oświadczeń współautorów wynika, że Pani mgr Kamila Kwiecień pełniła wiodącą rolę w powstawaniu publikacji oryginalnych. W odniesieniu do pracy nr 1 i nr 2 udział Doktorantki wynosił odpowiednio 50 i 40% i obejmował: stworzenie koncepcji pracy, wybór metod badawczych, projektowanie i przeprowadzenie eksperymentów oraz analizę wyników. Chciałabym zwrócić uwagę, że brakuje mi udziału Doktorantki w pisaniu tych manuskryptów. Jej indywidualny udział w powstaniu publikacji przeglądowej jest szacowany na 12% i obejmował: przegląd i analizę literatury oraz przygotowanie fragmentów manuskryptu. Zbiór publikacji stanowiących zasadniczą część rozprawy doktorskiej uzupełniony jest polskojęzycznym opracowaniem, w skład którego wchodzi: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel pracy, wyniki, podsumowanie, bibliografia (84 pozycje), spis publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora oraz oświadczenia współautorów. Wyniki w opracowaniu polskojęzycznym uzupełnione są o dodatkowe, nieopublikowane rezultaty dotyczące analizy odległych elementów promotora chemeryny oraz czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w odpowiedź na stymulację cytokinami prozapalnymi. Na uznanie zasługuje fakt, że prezentowane wyniki badań uzyskano dzięki realizacji projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, których kierownikami są Pani Promotor prof. dr hab. Joanna Cichy (SYMFONIA 2, 2014/12/W/NZ6/00454) i Pan Promotor pomocniczy dr Mateusz Kwitniewski (SONATA BIS 3, 2013/10/E/NZ6/00745). Ponadto część badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej sfinansowano w ramach Projektu Badawczego Młodych Naukowców oraz Doktorantów realizowanego ze środków dotacji celowej MNiSW oraz budżetu Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem Doktorantki.

Pod względem formalnym oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymagania tego typu opracowań.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Tematem badawczym podjętym podczas realizacji rozprawy doktorskiej było określenie mechanizmów regulujących ekspresję chemeryny. Chemeryna jest hormonem o charakterze



plejotropowym, syntetyzowanym głównie w tkance tłuszczowej i wątrobie. Wpływa m.in. na regulację układu pokarmowego, homeostazę energetyczną, funkcjonowanie tkanki tłuszczowej, apoptozę, angiogenezę czy układ rozrodczy. Jak się okazuje, chemeryna jest również zaangażowana w regulację układu odpornościowego, uczestnicząc zarówno w początkowych etapach ostrego stanu zapalnego, jak i w jego wygaszaniu. W ostatnich latach rośnie liczba badań nad potencjalną rolą chemeryny w różnych procesach patologicznych, m.in. w zespole metabolicznym, chorobach układu sercowo-naczyniowego, chorobach przewodu pokarmowego i chorobach nowotworowych. Prowadzenie badań mających na celu zrozumienie mechanizmów kontroli ekspresji chemeryny może się przyczynić w przyszłości do rozszerzenia możliwości terapeutycznych wielu chorób cywilizacyjnych. Tematykę badawczą ocenianej rozprawy doktorskiej uważam za interesującą i aktualną, a podjęcie badań w tym zakresie jest w pełni uzasadnione. O tym, że badania są istotne i nowatorskie może również świadczyć fakt uzyskania bardzo wysokiej ich oceny i co z tym jest związane – finansowania przez NCN i MNiSW na ich prowadzenie w ramach wymienionych wcześniej projektów.

Celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu cytokin prozapalnych na ekspresję chemeryny w różnych komórkach i tkankach, poznanie mechanizmów kontroli jej ekspresji oraz zbadanie wpływu alternatywnego składania transkryptu na produkcję i funkcje chemeryny. Istotnym uzupełnieniem rozprawy doktorskiej jest praca przeglądowa, w której m.in. opisano antybakteryjną rolę chemeryny w skórze i podskórnej tkance tłuszczowej. Należy podkreślić, że oceniane prace są spójne pod względem tematycznym i metodycznym oraz wartościowe pod względem poznawczym. Pozytywnie oceniam uzasadnienie podjęcia badań i sformułowany cel badań. Zakres stosowanych metod i analiz laboratoryjnych jest bardzo szeroki, co wskazuje na duże umiejętności Doktorantki i bogaty warsztat eksperymentalny. Wykorzystano w niej wiele technik m.in. izolacje tkanek, izolacje i hodowle frakcji stromalno-waskularnej (SVF) oraz hepatocytów, sort i hodowle preadipocytów oraz limfocytów B, hodowle i transfekcje linii komórkowej 3T3-L1, izolacje RNA i DNA, projektowanie starterów, RT- QPCR, RACE PCR, konwersje wodorosiarczanem, klonowanie, konstrukcje, namnażanie i metylację plazmidów, testy immunoenzymatyczne, a także lucyferazowe testy reporterowe. Wysoko oceniam umiejętność analizy sekwencjonowania, metylacji CpG i wariantów transkrypcyjnych oraz ogólnodostępnych baz danych RNA-Seq. Zastosowane w badaniach metody i analizy są właściwie dobrane do założonego celu badawczego. Chciałabym zaznaczyć, że powyższe techniki wymagały ogromnego nakładu pracy, co zasługuje na uznanie.

W swojej pracy Doktorantka wykazała m.in. stymulujący wpływ cytokin prozapalnych, interleukiny 1 β (IL-1 β) i onkostatyny M (OSM), na ekspresję chemeryny w tkance tłuszczowej myszy, zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Natomiast w hepatocytach ekspresja chemeryny nie zmieniała się. Uzyskane wyniki sugerują, że za wzrost stężenia chemeryny stwierdzony we krwi może odpowiadać biała tkanka tłuszczowa. Za szczególnie istotne należy uznać wyniki dotyczące określenia wzoru metylacji cytozyn rejonu promotorowego chemeryny

u myszy. Wykazano, że metylacja DNA odpowiada za komórkowo-specyficzną konstytutywną ekspresję chemeryny. W obrębie promotora chemeryny wyróżniono dwa fragmenty o odmiennym wzorze metylacji – dystalny o wyższej i proksymalny o niższej średniej metylacji. Stwierdzono, że fragment proksymalny jest aktywną transkrypcyjnie częścią promotora chemeryny, która odpowiada za konstytutywną ekspresję tego genu. W badanych fragmentach promotora chemeryny nie znaleziono elementów odpowiedzialnych za wzrost ekspresji tego hormonu związany ze stymulacją prozapalną. Badania z użyciem inhibitorów wybranych czynników transkrypcyjnych wykazały, że ekspresja chemeryny po stymulacji IL-1 β zależy od aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, natomiast w addytywny wpływ kostymulacji OSM zaangażowany jest czynnik STAT3. Bardzo interesujące i cenne wydają się również wyniki dotyczące wpływu alternatywnego składania transkryptu na produkcję i funkcje chemeryny. Wykazano, że chemeryna posiada jeden wariant transkrypcyjny w wątrobie oraz w białej tkance tłuszczowej człowieka, natomiast u myszy chemeryna posiada trzy takie warianty i generują one dwie izoformy białka. Warianty 2 i 3 kodują krótszą formę białka, która stanowi ok. 65% wszystkich wariantów, a wariant 1 koduje białko dłuższe o jeden aminokwas i stanowi ok. 30% wszystkich wariantów. Ponadto, scharakteryzowano nowy, czwarty wariant transkrypcyjny chemeryny u myszy, stanowiący 1,5% wszystkich wariantów. Analiza funkcjonalna wykazała, że izoforma 1 i 2 mają podobne właściwości chemotaktyczne, natomiast izoforma 1 charakteryzuje się wyższym potencjałem przeciwbakteryjnym. W ocenianej rozprawie doktorskiej określono różne mechanizmy kontroli ekspresji chemeryny oraz scharakteryzowano możliwości generowania różnych izoform funkcjonalnego białka. Uzyskane wyniki świadczą o złożoności procesów regulujących transkrypcję chemeryny, które z pewnością wymagają wyjaśnienia w kolejnych badaniach. Doktorantka bardzo starannie i logicznie zaprezentowała uzyskane wyniki oraz umiejętnie je zinterpretowała i podsumowała. Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę są oryginalne, interesujące i mają dużą wartość naukową. Oceniana rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologicznej.

SUGESTIE, UWAGI I PYTANIA

Podczas analizy ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag, sugestii i pytań, które przedstawiam poniżej i proszę Doktorantkę o odniesienie się do nich:

1. W moim odczuciu w opracowaniu polskojęzycznym zabrakło schematów dotyczących realizowanych zadań badawczych, które byłyby bardzo pomocne podczas lektury rozprawy doktorskiej.
2. We *Wprowadzeniu* (część 3 opracowania polskojęzycznego, podrozdział 3.4., str. 18) opisano pracę dotyczącą wpływu metylacji DNA na ekspresję chemeryny w komórkach nowotworowej linii Jeg-3. Doktorantka sugeruje, że stwierdzony wzrost ekspresji



- chemeryny może wynikać z odmetylowania jej własnego promotora, czy też ze wzrostu ekspresji innych czynników, na które wpływ miała zastosowana w badaniu 5-aza-2-deoksycytyna. Prosiłabym Doktorantkę o sprecyzowanie jakie konkretnie czynniki miała na myśli.
3. Pragnę zwrócić uwagę, że w prezentowanej rozprawie doktorskiej brakuje hipotez badawczych i proszę Doktorantkę o ich przedstawienie.
 4. Prosiłabym o wskazanie na jakiej podstawie wybrano stężenia użytych czynników doświadczalnych, tj. IL-1 β , OSM czy inhibitorów czynników transkrypcyjnych.
 5. W pracy doktorskiej wskazano, że wyniki zaprezentowano dla co najmniej trzech niezależnych eksperymentów. Proszę o doprecyzowanie jaka była liczba zwierząt użytych w doświadczeniach. Proszę również o podanie liczba n w przeprowadzonych badaniach oraz wyjaśnienie co Doktorantka rozumie pod pojęciem liczby n.
 6. Komórki linii 3T3-L1 transfekowano opracowanymi konstruktami chemeryny. Stwierdzono, że komórki tej linii stanowiły dogodny model eksperymentalny. Prosiłabym o rozwinięcie tego stwierdzenia oraz przedstawienie zalet i wad zastosowania takiego modelu eksperymentalnego. Proszę również o informację, czy podejmowano próby transfekcji pierwotnych adipocytów.
 7. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego przy analizie wyników dla porównań wielokrotnych w publikacji nr 1 i nr 2 zastosowano różne testy statystyczne.
 8. W *Wynikach* (część 5 opracowania polskojęzycznego, podrozdział 2.5., str. 34) wskazano odniesienie do Ryciny 6 A-D, natomiast na Rycinie 6 nie ma części A-D.
 9. W podpisach do rycin w publikacji nr 1 brakuje wyjaśnień dotyczących stosowanych skrót.
 10. W publikacji nr 1, w rozdziale *Metody* nie podano w jaki sposób analizowano żywotność komórek SVF.
 11. W publikacji nr 1 i nr 3 podano różne masy chemeryny (18 kDa i 16 kDa) powołując się na tą samą publikację (*Zabel i wsp. 2014*). Prosiłabym o wyjaśnienie tych rozbieżności, zwłaszcza, że w cytowanej pracy nie znalazłam informacji o masie białka.
 12. W prezentowanej pracy nie udało się określić fragmentu promotora chemeryny odpowiadającego za indukowaną cytokinami ekspresję chemeryny w adipocytach, ani też wykazać potencjalnego mechanizmu tej aktywacji. Ponadto nie udało się jednoznacznie stwierdzić, gdzie w obrębie promotora chemeryny wiążą się dane czynniki transkrypcyjne i jakich dodatkowych elementów regulacyjnych wymagają do działania. Dlatego też prosiłabym Doktorantkę o zaproponowanie jakie dodatkowe badania można byłoby przeprowadzić w celu wyjaśnienia tych zagadnień.
 13. W *Podsumowaniu* (część 6 opracowania polskojęzycznego, str. 41-43) uzyskanych wyników sugerowałabym wyodrębnienie i dopracowanie wniosków.



PODSUMOWANIE

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Kamili Kwiecień pragnę stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki nie tylko dostarczają nowych danych, zmierzających do poznania mechanizmów regulujących ekspresję chemeryny, ale mogą stanowić podstawę do prowadzenia kolejnych eksperymentów. Na podkreślenie zasługuje bardzo istotna tematyka rozprawy doktorskiej, szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem merytorycznym z zakresu tematyki prowadzonych badań oraz umiejętnościami w posługiwaniu się licznymi metodami. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można sądzić, że Doktorantka zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Muszę pokreślić, że sformułowane w mojej recenzji uwagi, sugestie czy pytania nie dyskredytują wysokiej wartości zaprezentowanych wyników, a mam nadzieję, że zostaną wykorzystane w przygotowaniu kolejnych publikacji oraz w przyszłej pracy naukowej.

WNIOSEK KOŃCOWY

W moim przekonaniu, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Regulacja ekspresji chemeryny*” spełnia wszystkie wymagania – określone w artykuł 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455) - stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Kamili Kwiecień do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 27 lipca 2023 r.

Z poważaniem