

Prof. dr hab. Jadwiga Jaruzelska  
ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań  
e-mail:  
[jadwiga.jaruzelska@igcz.poznan.pl](mailto:jadwiga.jaruzelska@igcz.poznan.pl)  
[www.igcz.poznan.pl](http://www.igcz.poznan.pl)

### **Recenzja w postępowaniu habilitacyjnym**

**Habilitantka:** dr n. chem. Pani Beata Greb-Markiewicz

**Dla:** Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego

**Osiągnięcie naukowe I** pt. „Charakterystyka molekularnych determinant wpływających na lokalizację czynników transkrypcyjnych bHLH w komórce”

**Osiągnięcie naukowe II** pt. „Charakterystyka molekularna regionów inherentnie nieuporządkowanych i ich znaczenie dla funkcjonowania czynników transkrypcyjnych bHLH”

**Pani Beata Greb-Markiewicz uzyskała stopień doktora nauk chemicznych w roku 1999.** Pracuje obecnie w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Polityki Wrocławskiej. W latach 1995-1996 Pani Doktor przebywała na urlopie macierzyńskim. Przedstawione przez nią dokumenty są kompletne. Kluczowy dokument stanowi bardzo przejrzyste przedstawiony Autoreferat, który pozwolił mi na łatwe zapoznanie się z całością dotychczasowego dorobku, ze szczególnym uwzględnieniem badań ujętych w dwóch osiągnięciach stanowiących podstawę ubiegania się o stopień dr habilitowanego. Wszystkie artykuły stanowiące Osiągnięcia I i II zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora. Pani Doktor zaznacza, że badania stanowiące Osiągnięcia I i II zostały przeprowadzone w oparciu o jej własne hipotezy i pytania badawcze. Jest to zgodne w konfrontacji z oświadczeniami pozostałych Autorów publikacji zawartych w Osiągnięciu I oraz II i stanowi istotne kryterium samodzielności naukowej. We wszystkich artykułach wchodzących w skład obu Osiągnięć Pani Doktor odgrywała bezsprzecznie rolę wiodącą. Badania przedstawione w obu Osiągnięciach były skoncentrowane na rodzinie czynników transkrypcyjnych bHLH, występujących wśród organizmów eukariotycznych zwierząt i roślin. Istotą badań było znalezienie powiązania pomiędzy strukturą a funkcją wybranych białek tej rodziny, ze szczególnym uwzględnieniem sygnałów lokalizacji w komórce. Badania te są wartościowe nie tylko z powodów poznawczych lecz także w perspektywie przyszłego wykorzystania uzyskanych danych w medycynie. Nad tymi zagadnieniami Pani Greb-Markiewicz zaczęła pracować po uzyskaniu stopnia doktora.

**Pani Doktor posiada w dorobku dwa osiągnięcia naukowe stanowiące znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne.**

**Osiągnięcie I** pt. „Charakterystyka molekularnych determinant wpływających na lokalizację czynników transkrypcyjnych bHLH w komórce” stanowi cykl 5 powiązanych tematycznie artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Cztery to artykuły oryginalne, podczas gdy ostatni ma charakter przeglądu.

Zagadnienie łączące wszystkie artykuły zawarte w Osiągnięciu I to identyfikacja motywów wybranych białek rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH, które determinowałyby ich specyficzną lokalizację w komórce a przez to ich wielorakie funkcje. Złożoność tej rodziny czynników transkrypcyjnych przedstawiła we wstępie charakteryzując każdą z siedmiu odmiennych strukturalnie klas tej rodziny.

W pierwszym etapie badań Pani Doktor skoncentrowała się na dwóch paralogach, białku MET oraz ewolucyjnie wywodzącym się z niego białku GCE. Białka te zostały opisane jako receptory jednego z dwóch znanych hormonów muszki owocowej, hormonu juwenilnego (JH). Postanowiła sprawdzić, czy niektóre różnice funkcjonalne pomiędzy tymi paralogami muszki owocowej zasugerowane w literaturze, spowodowane były odmiennymi sygnałami lokalizacji jądrowej (NLS) lub sygnałami eksportu z jądra do cytoplazmy (NES). Jednak jako modelu badań nie wybrała muszki owocowej, lecz kilka typów komórek ssaków hodowanych *in vitro*, skupiając się ostatecznie na komórkach nerki myszy COS-7. Podejście badawcze polegało na transfekcji komórek plazmidami kodującymi pełnej długości białko MET muszki owocowej w fuzji z białkiem żółtej fluorescencji YFP, i obserwacji lokalizacji w komórce z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. Po pozytywnej weryfikacji modelu i ustaleniu lokalizacji białka MET w komórce a także wstępnej identyfikacji w jego obrębie sygnałów NLS oraz NES, Pani Doktor przystąpiła do ich dokładniejszej analizy. W tym celu białko MET zostało podzielone na 6 fragmentów, zgodnie z wyszczególnionymi w jego obrębie domenami i na tej podstawie przygotowała odpowiadające tym fragmentom konstrukcje w fuzji z YFP. Uzyskanymi w ten sposób konstruktami transfekowała komórki ssaków i oceniała ich lokalizację dla każdego fragmentu białka. Po jej ustaleniu, w sekwencjach przewidzianych jako potencjalne sygnały lokalizacji wprowadziła substytucje aminokwasowe by potwierdzić ich autentyczność. W następnym kroku sprawdzano czy funkcjonalność sygnałów lokalizacyjnych zależy od muszkiego hormonu JH. Jeden z sygnałów NLS białka MET okazał się zależny od obecności tego hormonu. Mając na uwadze różnice funkcjonalne pomiędzy paralogami MET a GCE Pani Doktor przeprowadziła porównanie sygnałów lokalizacji obu białek. Zidentyfikowała podobne ale i odmiennie, te ostatnie występowały w szczególności w obrębie regionu C-końcowego tych białek. Ponadto białka MET i GCE różniły się pod względem białkowych interaktorów. Na podstawie przeprowadzonych badań Pani Doktor wyciągnęła wniosek, że powyższe różnice mogą determinować odmiennie funkcje białek MET i GCE. Te interesujące i wartościowe wyniki nasuwają pytanie, na ile zaobserwowane różnice przekładają się różnice funkcjonalne tych białek w organizmie muszki owocowej, w którym występują.

Skoro identyfikacja sygnałów lokalizacyjnych w białkach MET i GCE muszki owocowej należących do rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH została uwieńczona sukcesem, Pani Doktor zadała pytanie o potencjalne podobieństwa pomiędzy białkami MET i GCE muszki a członkami tej rodziny białek u ssaków. Wybrała białko NPAS4 ssaków, o istotnej roli w regulacji tworzenia naczyń krwionośnych oraz funkcji w śródbłonku jak migracja, proliferacja i tworzenie nowych struktur naczyniowych. Ponadto, białko to uważane jest jako potencjalny cel terapii różnych chorób. Pani Doktor uznała że skoro wiedza na temat jego lokalizacji w komórce była skromna, jej ustalenie może przyczynić się do wzrostu znaczenia tego białka w kontekście potencjalnych przyszłych terapii. Pani Doktor wykonała to zadanie ponieważ zmapowała sygnały lokalizacji komórkowej białka NPAS4. Interesujące było pokazanie preferencyjnej lokalizacji tych sygnałów w obrębie nieuporządkowanych regionów białka a także potencjalnej roli białka NPAS4 w cytoplazmie. Dane uzyskane w tej części badań są cenne bo przyczyniają się do lepszego zrozumienia wielorakich funkcji białka NPAS4 w komórce.

W następnej pracy Pani Doktor scharakteryzowała sygnały lokalizacji subkomórkowej dla innego należącego do rodziny białek bHLH, białka TCF4. Badania te okazały się bardzo istotne w kontekście zidentyfikowanych wcześniej przez inne grupy mutacji genu kodującego TCF4 w asocjacji z zespołem Pitta-Hopkinsa. Otóż mutacje związane z tą chorobą występują w obrębie zmapowanych przez Panią Doktor sygnałów lokalizacji komórkowej.

W pracy przeglądowej Pani Doktor dokonała podsumowania wiedzy w zagadnieniu które stanowiło przedmiot pracy w obrębie Osiągnięcia I. Zawarła w niej swoje własne opublikowane wyniki na tle danych innych grup badawczych. Zasugerowała również interesujące kierunki przyszłych badań.

**Osiągnięcie II** pt. „Charakterystyka molekularna regionów inherentnie nieuporządkowanych i ich znaczenie dla funkcjonowania czynników transkrypcyjnych bHLH” stanowi cykl 4 artykułów, w tym 3 artykułów oryginalnych oraz jeden artykuł przeglądowy z elementami wyników własnych. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym. Ponadto, we wszystkich 5 artykułach Pani Doktor Greb-Markiewicz jest autorem ostatnim oraz korespondencyjnym. Badania zawarte w Osiągnięciu II koncentrowały się na bardzo interesującym zagadnieniu dotyczącym funkcjonalnego znaczenia wewnątrznie nieuporządkowanych regionów białek rodziny bHLH. Zainteresowanie tymi regionami pojawiło się w związku z wynikami zawartymi w cyklu prac Osiągnięcia I. Pokazały one, że paralogi MET i GCE różnią się wzorem motywów NLS i NES, szczególnie w regionach C-końcowych, przewidywanych jako regiony wewnątrznie nieuporządkowane. Regiony te wykazywały największe zróżnicowanie w sekwencji, jednak nie były wcześniej dokładnie badane pod względem funkcjonalnym. Nieuporządkowane regiony białek znane są ze swojej plastyczności pod względem dynamiki przyjmowania wielorakich struktur, w konfrontacji z różnymi interaktorami. Pani Doktor zasugerowała że z powyższych względów owe C-końcowe nieuporządkowane regiony białka MET i GCE mogą mieć istotne znaczenie dla ich aktywności

biologicznej i może stanowić o ich odmienności funkcjonalnej. Przeprowadzona charakterystyka z zastosowaniem analizy dichroizmu kołowego, rozpraszania promieni rentgenowskich pod małym kątem a także magnetycznego rezonansu jądrowego potwierdziły, że charakterystyczną cechą tych regionów było ich inherentne nieuporządkowanie. Następnym krokiem była analiza interakcji regionu C-końcowego z innymi białkami. Na tej podstawie Pani Doktor wykazała odmienny stopień wrażliwości tych regionów na tego typu interakcje dla każdego z dwóch białek. Powyższe badania dostarczyły dodatkowych istotnych przesłanek przemawiających za odmiennością funkcjonalną białek MET i GCE. Uzasadnienie kontynuowania tego typu badań z podkreśleniem istotnego znaczenia C-końcowych regionów tych białek w modulacji ich funkcjonowania oraz interakcji w białkowych kofaktorami Pani Doktor przedstawiła w artykule przeglądowym.

Interesującym pytaniem zawartym w ostatnim artykule eksperymentalnym Osiągnięcia II było, czy lokalizacja mutacji warunkujących choroby genetyczne w regionach uporządkowanych w porównaniu z lokalizacją w regionach nieuporządkowanych dla białek bHLH-PAS ma znaczenie, biorąc pod uwagę sugestie, iż wewnątrznie nieuporządkowane regiony mogą być najważniejszymi regionami regulatorowymi białek. Przeprowadzone badania porównawcze z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych pokazały, że większość mutacji nonsensownych powiązanych z chorobami jest zlokalizowana w regionach wewnątrznie nieuporządkowanych dla białek podgrupy bHLH-PAS. Stanowi to interesujący wątek dalszych badań funkcji tych białek, jednak wykraczający poza przedstawiony wniosek habilitacyjny.

### **Pozostałe kierunki pracy naukowej wychodzące poza ramy Osiągnięć I i II**

Przed uzyskaniem stopnia doktora Pani Doktor zajmowała się grzybami entomopatogenicznymi, w świetle ich potencjalnego zastosowania jako insektycydów. Badania zostały uwieńczone dwoma ważniejszymi artykułami oryginalnymi.

Po uzyskaniu stopnia doktora Pani Doktor prowadziła badania wielokierunkowe których nie ujęła Osiągnięciach habilitacyjnych I i II. Zajmowała się między innymi uzyskiwaniem wybranych metabolitów z roślin leczniczych. Badania te zaowocowały kilkoma pracami w tym pracą w *Process Biochemistry* cytowaną 74 razy.

Nowy wątek badań Pani Doktor zainicjowała podczas długoterminowego stażu podoktorskiego w Uniwersytecie Ulm. Tamże zaczęła pracować w modelu muszki owocowej i badaniom poddawała dwa białka EcR i USP które tworzą receptor dla hormonu 20-hydroksyekdysonu. Zajmowała się ich oczyszczaniem oraz przeprowadzała mutagenezę wybranych pozycji aminokwasowych w białku badając wpływy tych miejsc na ich oligomeryzację. Na podstawie tych badań powstały dwa artykuły oryginalne.

Ponadto, prowadziła analizę różnic funkcjonalnych pomiędzy białkami MET i GCE powiązanych z hormonem juvenilnych (JH) poprzez badanie ich interakcji z wybranymi partnerami.

Badania te doprowadziły do wniosku, że białka MET i GCE uważane jako paralogi mają nieco odmienne funkcje. Praca ta została uwieczniona niedawno opublikowanym artykułem oryginalnym, w którym Pani Doktor jest ostatnim autorem.

W trakcie pandemii spowodowanej wirusem SARS-CoV Pani Doktor zajmowała się wypracowaniem procedury oczyszczania białka tego wirusa tworzącego jego nukleokapsyd (N). Celem było uzyskanie czystego preparatu nie zawierającego zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi, czego wcześniej nie udało się osiągnąć. Uzyskanie czystego preparatu otwierało możliwości przeprowadzenia bardziej wiarygodnych badań strukturalnych tego białka. Badania te zostały uwiecznione artykułem oryginalnym którego doktorantka jest współautorką.

W końcowej części Autoreferatu Pani Doktor przedstawiła szeroko zakrojone bardzo interesujące plany badawcze które będą kontynuacją badań objętych Osiągnięciem I i II.

**Pani Doktor Beata Greb-Markiewicz wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jedna instytucji naukowej, w tym w międzynarodowych.**

Pani doktor odbyła kilka staży krótkoterminowych w polskich oraz zagranicznych ośrodkach, oraz długoterminowy staż podoktorski w Uniwersytecie w Ulm. Pobyt w Ulm pozwolił jej sformułować własne tematy badań którymi kierowała po powrocie do Polski. Zaowocowały artykułami zawartymi w osiągnięciu I i II. Była inicjatorką nawiązania współpracy międzynarodowej pomiędzy Uniwersytetem w ULM a swoim macierzystym Instytutem.

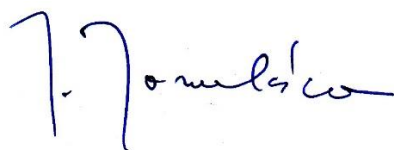
Pani Doktor od lat do dnia dzisiejszego prowadzi liczne współprace z ośrodkami zagranicznymi i polskimi, które owocują artykułami w prestiżowych czasopismach naukowych.

Swoje badania prezentowała na licznych konferencjach naukowych w Polsce i zagranicą, w formie wystąpień ustnych lub plakatów. Brała udział w licznych projektach finansowanych z różnych źródeł. Prowadzi wykłady dla studentów. Sprawowała opiekę nad kilkunastoma pracami dyplomowymi inżynierskimi oraz około trzydziestoma pracami magisterskimi. Dwukrotnie pełniła funkcję promotora pomocniczego. Działa także w studenckich kołach naukowych funkcjonujących w jej Uniwersytecie. Zajmuje się również popularyzacją nauki. Ponadto pełniła rolę recenzenta manuskryptów na zaproszenie kilku czasopism. Współorganizowała kilka konferencji naukowych.

**Konkluzja:** Osiągnięcia naukowe Pani Dr Beaty Greb-Markiewicz ubiegającej się o stopień doktora habilitowanego odpowiadają wymaganiom określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Uzasadnienie: Przedstawione osiągnięcia wpisują się w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych oraz dyscyplinę naukową nauki biologiczne. Przedstawione badania zawarte w obu naukowych Osiągnięciach I i II stanowią znaczny wkład w rozwój dyscypliny naukowej Nauki Biologiczne. Warty

podkreślenia jest warsztat Habilitantki, który samodzielnie wypracowała w okresie pracy po uzyskaniu stopnia doktora, na który składają się liczne nowoczesne metodologie, dotyczące w szczególności proteomiki, również metody spektroskopowe oraz często stosowane przez nią narzędzia bioinformatyczne. Dorobek podoktorski stanowi większość dorobku naukowego co wskazuje, że postęp w pracy naukowej od momentu uzyskania stopnia dr tzn. w okresie przygotowywania rozprawy habilitacyjnej jest znaczny. Warto podkreślić, że wyniki zawarte w Osiągnięciach I i II mają odniesienie do medycyny i stwarzają perspektywę dalszych badań. Uważam, że przedstawione Osiągnięcia I i II, oraz ogólny dorobek naukowy, uzyskany szczególnie po uzyskaniu stopnia doktora jest bardzo wartościowy i nie budzi wątpliwości.

Handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. Jomelska".