



Warszawa, dnia 22. 01. 2024.

Prof. dr hab. Magdalena Rakowska-Boguta
Pracownia Transkrypcji tRNA
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Ocena osiągnięć naukowych

„Charakterystyka molekularnych determinant wpływających na lokalizację czynników transkrypcyjnych bHLH w komórce” i „Charakterystyka molekularna regionów inherentnie nieuporządkowanych i ich znaczenie dla funkcjonowania czynników transkrypcyjnych bHLH” oraz istotnej działalności naukowej

**dr Beaty Greb-Markiewicz w związku z postępowaniem
o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego**

Pani dr Beata Gleb-Markiewicz była studentką Politechniki Wrocławskiej; w 1993 roku ukończyła studia magisterskie na kierunku Biotechnologia, na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki oraz po kilkunastu latach - studia podyplomowe na Wydziale Zarządzania i Informatyki. Rozprawę doktorską zatytułowaną „Poszukiwanie czynników zaangażowanych w proces infekcji i intoksykacji organizmu owada przez grzyby entomopatogeniczne z rodzaju *Zoophthora* i *Paecilomyces*” dr Beata Gleb-Markiewicz przygotowała pod opieką prof. Andrzeja Zabży w Instytucie Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej i obroniła w roku 1999. Bezpośrednio po obronie doktoratu Pani dr Beata Gleb-Markiewicz została zatrudniona w Laboratorium Chemii Ekologicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, początkowo jako asystent, a od 2004 roku jako adiunkt. W latach 2002-2004 odbyła staż zagraniczny na Uniwersytecie w Ulm w *Institute of General Zoology and Endocrinology*. W 2016 roku została zaproszona do *Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics* w Dreźnie, gdzie prowadziła badania naukowe przez pięć miesięcy. Odbyła również krótko terminowe staże naukowe w *Istituto per la Chimica di Molecole di Interesse Biologico di Arco Felice* w Neapolu, w *Institutionen för Växtvetenskap, Swedish University of Agricultural Sciences* w Alnarp w Szwecji oraz w Zakładzie Biofizyki Komórki na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. Od 2019 roku jest zatrudniona w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Chemicznym, Politechniki Wrocławskiej jako adiunkt (pracownik badawczo-dydaktyczny).

Po zakończeniu stażu na Uniwersytecie w Ulm w 2004 roku dr Beata Gleb-Markiewicz wybrała jako cel własnych samodzielnych badań rodzinę eukariotycznych czynników transkrypcyjnych bHLH, które regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za rozwój organizmu i różnicowanie komórek. U kręgowców czynniki bHLH są kluczowe dla specyfikacji komórek nerwowych. Pierwszymi obiektami jej badań były białka z *Drosophila melanogaster* należące do podrodziny bHLH-PAS uznawane za

receptory hormonu juvenilnego u owadów – MET oraz jego paralog, białko GCE. Celem tych badań była weryfikacja hipotezy, że różne wzorce rozmieszczenia sygnałów transportu między jądrem a cytoplazmą (NLS/NES) w sekwencji białka mogą być powiązane z funkcjonalnym zróżnicowaniem MET i GCE. W późniejszym etapie habilitantka zainteresowała się białkami bHLH występującymi u ssaków, zaangażowanymi w rozwój układu nerwowego i związanymi z chorobami u człowieka. Prócz sygnałów NLS/NES, badała rolę regulatorową regionów o nieuporządkowanej strukturze (IDR). Celem badań było ustalenie wzorca dystrybucji mutacji „missense” wśród uporządkowanych i nieuporządkowanych regionów grupy białek bHLH-PAS powiązanych z chorobami człowieka.

Aktywność naukowa dr Beaty Gleb-Markiewicz znalazła swoje odzwierciedlenie w licznych artykułach, z których część stanowi dwa jednotematyczne cykle składające się na prezentowane osiągnięcia naukowe.

Ocena pierwszego osiągnięcia naukowego stanowiącego monotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem „Charakterystyka molekularnych determinant wpływających na lokalizację czynników transkrypcyjnych bHLH w komórce” objętego postępowaniem habilitacyjnym

Pierwsze z przedstawionych do oceny osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego dr Beaty Gleb-Markiewicz to cykl czterech wieloautorskich prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej zawierającej elementy oryginalne. Prace te opublikowano w latach 2011-2019 w czasopismach międzynarodowych o uznanej renomie, takich jak np.: *Scientific Reports*, *Journal of Biological Chemistry* czy *PLoS One*. Prace te były cytowane ponad 40 razy, ich całkowity IF wynosi 19,9 a liczba punktów MNiSW – 385. Na podstawie opisów habilitantki, która precyzyjnie określiła swój udział w poszczególnych artykułach, z przekonaniem stwierdzam, iż jej rola jest znacząca. Jest pierwszym a zarazem korespondencyjnym autorem wszystkich pięciu prac.

Zagadnienie naukowe pierwszego cyklu prac dotyczy szeroko pojętego mechanizmu regulacji lokalizacji wewnątrzkomórkowej białek bHLH. Jako czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za regulację ekspresji genów w odpowiedzi na odbierane sygnały, białka bHLH ulegają translokacji z cytoplazmy do jądra co umożliwia rekrutację koaktywatorów i wiązanie do DNA. Zasadniczym tematem prac eksperymentalnych habilitantki jest identyfikacja sygnałów importu do jądra (NLS) i eksportu z jądra NES wybranych przedstawicieli rodziny bHLH.

Pierwsze dwie prace eksperymentalne wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego dotyczą dwóch białek z rodziny bHLH-PAS u *D. melanogaster*, paralogów MET i GCE, które jako receptory hormonu juvenilnego są odpowiedzialne za wzrost owadów. Kolejna praca poświęcona jest białku NPAS4, przedstawiciela rodziny bHLH u ssaków, odkrytym w neuronach zlokalizowanych w hipokampie i będącym potencjalnym celem terapeutycznym w przypadku depresji, chorób neurodegeneracyjnych związanych z dysfunkcją synaptyczną. Kolejnym wybranym obiektem badań było białko TCF4 reprezentujące klasę E czynników bHLH i wiązane z zaburzeniem psychicznym określanym jako zespół Pitta-Hopkinsa.

Początkowo habilitantka analizowała obecność potencjalnych motywów NLS/NES za pomocą dostępnych programów komputerowych. W celu eksperymentalnej weryfikacji obecności aktywnych sygnałów lokalizacji przeprowadzała ekspresję fragmentów białek ze znacznikiem fluorescencyjnym i analizowała ich lokalizację subkomórkową za pomocą mikroskopii konfokalnej. Obecność określonych sygnałów NLS/NES była następnie weryfikowana przez konstrukcję i badanie mutantów.



Uzyskane wyniki były pierwszymi, które sugerowały obecność wielu sygnałów NLS/NES w sekwencjach analizowanych białek. We wszystkich przypadkach habilitantka określiła złożony wzór nakładających się sygnałów o przeciwstawnej aktywności zlokalizowanych w domenach bHLH i PAS, a także w C-końcach białek.

Habilitantka pokazała jako pierwsza, że MET i GCE są białkami o zmiennej lokalizacji wewnątrzkomórkowej, co jest zależne od złożonego trybu wieloetapowej regulacji, w którą zaangażowany jest sumaryczny wpływ różnych sygnałów lokalizacji komórkowej, o aktywności modyfikowanej potencjalnie przez hormon juwenilny, oddziałujące białka i modyfikacje potranslacyjne. Okazało się, że regulacja lokalizacji MET i GCE, pomimo istnienia pewnych podobieństw, jest zróżnicowana. Ostateczna lokalizacja GCE jest regulowana w znacznie bardziej złożony sposób niż w przypadku MET. Oba paralogi różnią się one wzorem motywów NLS i NES, szczególnie w C-końcowych. Według habilitantki, różnice te mogą stanowić o przyczynie częściowej redundancji funkcji MET i GCE.

Dr Beata Gleb-Markiewicz wykazała następnie, że białko NPAS4 jest białkiem o zmiennej lokalizacji, a w regulację procesu jego translokacji zaangażowane jest stężenie glukozy i specyficzne czynniki komórkowe. Wykryła sygnały NLS/NES w różnych domenach NPAS4 i określiła ich względną hierarchię. Poszukując wyjaśnienia biologicznego znaczenia obecności sygnałów NLS i NES w domenach PAS, przeprowadziła predykcję wiązania ligandów, która doprowadziła do sugestii, że domeny PAS wiążą hem i mononukleotyd flawinowy. Przeprowadziła także przewidywanie miejsc fosforylacji NPAS4 stwierdzając ich obecność w zidentyfikowanych przez nią sygnałach NLS/NES, lub w ich pobliżu. Wynik ten sugeruje, że fosforylacja jest czynnikiem wpływającym na lokalizację NPAS4.

Regulacja rozmieszczenia TCF4 pomiędzy jądrem a cytoplazmą została wcześniej zaproponowana jako jeden z mechanizmów regulujących funkcję tego białka. Dr Beata Gleb-Markiewicz wykryła dodatkowo obecność białka TCF4 w jąderkach, za co odpowiada NLS, zlokalizowany w N-końcu. Lokalizacja TCF4 w niektórych badanych komórkach przybierała formę układu wielu drobnych punktów w cytoplazmie, co doprowadziło habilitantkę do hipotezy o skłonności TCF4 do separacji faz ciecz-ciecz (LLPS). Stwierdziła także, że zróżnicowana lokalizacja subkomórkową TCF4 jest regulowana przez oddziaływanie z białkiem 14-3-3 oraz zależną od Ca^{2+} interakcją z kalmoduliną. Poprzez porównanie sekwencji wytypowała sygnały NLS, które regulują dynamiczną wymianę między przedziałami subkomórkowymi nie tylko u TCF4, ale u innych czynników transkrypcyjnych klasy bHLH. Habilitantka sprawdziła też hipotezę dotyczącą związku mutacji NLS/NES w obszarze domeny bHLH białka TCF4 z rozwojem tej choroby określanej jako zespół Pitta-Hopkinsa. Eksperymenty doprowadziły do identyfikacji reszty aminokwasowej niezbędnej dla aktywności NLS, która nie była do tej pory wiązana z zaburzeniem PTHS. Hipoteza dotycząca śmiertelności tej mutacji wymaga weryfikacji.

Praca przeglądowa należąca do cyklu publikacji wchodzących w skład pierwszego osiągnięcia habilitacyjnego jest próbą podsumowania dostępnej wiedzy na temat różnorodnych mechanizmów regulacji lokalizacji białek bHLH-PAS oraz opisem precyzyjnych i systematycznych badania w tym obszarze. Dla wybranych białek habilitantka dokonała przeglądu prac dokumentujących istnienie

sygnałów NLS/NES i przedstawiła graficznie ich lokalizację w sekwencjach białek bHLH. Celem pracy było ponowne wzbudzenie zainteresowania tematem poprzez zamieszczenie nowatorskich wyników badań habilitantki.

Reasumując, wyniki prac dr Beaty Gleb-Markiewicz wchodzących w skład pierwszego osiągnięcia habilitacyjnego dają nowy obraz molekularnego mechanizmu kontroli lokalizacji białek bHLH w komórkach organizmów wyższych. Wyniki te mają niewątpliwy wkład w zrozumienie molekularnych podstaw funkcjonowania przedstawicieli ważnej rodziny bHLH, co potwierdza ich umieszczenie w bazach danych FlyBase (dla MET i GCE) i Uniprot (dla NPAS4 i TCF4).

Ocena drugiego osiągnięcia naukowego stanowiącego monotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem „Charakterystyka molekularna regionów inherentnie nieuporządkowanych i ich znaczenie dla funkcjonowania czynników transkrypcyjnych bHLH” objętego postępowaniem habilitacyjnym

Drugie z przedstawionych do oceny osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego dr Beaty Gleb-Markiewicz to cykl czterech wieloautorskich prac, w tym dwóch eksperymentalnych, jednej pracy przeglądowej zawierającej elementy oryginalne i jednej pracy oryginalnej. Prace te ukazały się w latach 2016-2021 w znanych czasopismach międzynarodowych: *PLoS One*, *Cell Communication and Signaling* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Prace te były cytowane ponad 25 razy, ich całkowity IF wynosi 19,2 a liczba punktów MNiSW – 445. Habilitantka jest ostatnim, korespondencyjnym autorem wszystkich czterech prac. Jej rola jest dla ich powstania jest kluczowa.

Obiektem badań drugiego cyklu prac są nadal białka bHLH, lecz zagadnienie naukowe dotyczy analizy ich struktury ukierunkowane na identyfikację i poznanie roli regulatorowej rejonów inherentnie nieuporządkowanymi (IDR). Należy podkreślić, że nikt wcześniej nie prowadził badań obszarów pozbawionych struktury w żadnym z białek bHLH-PAS. Dr Beata Gleb-Markiewicz realizowała ten temat opiekując się i współpracując z panią Martą Kolonko-Adamską jako promotor pomocniczy jej pracy doktorskiej.

W celu precyzyjnego określenia rejonów IDR w badanych białkach, habilitantka rozszerzyła warsztat metodyczny o metody biofizyczne jak CD (ang. *circular dichroism*), analizę SAXS (ang. *Small-angle X-ray scattering*) i spektroskopię NMR. W tym celu nawiązała współpracę z prof. dr hab. M. Kozakiem z Zakładu Fizyki Biomedycznej na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i prof. G. Popowiczem z *Biomolecular NMR and Center for Integrated Protein Science* na Uniwersytecie w Monachium. Udało się jej eksperymentalnie wykazać, że zgodnie z analizą *in silico*, C-końcowe fragmenty MET (METC) i GCE (GCEC) są regionami inherentnie nieuporządkowanymi (IDR). Wykazała ponadto, że nieuporządkowany region GCEC może oddziaływać z LBD FTZ-F1 (receptorem jądrowym Fushi Tarazu factor-1), a oddziaływanie to ma wpływ na lokalizację subkomórkową i aktywność FTZ-F1.

W celu analizy roli regulatorowej rejonów IDR habilitantka analizowała dystrybucję powiązanych z chorobami mutacji wśród uporządkowanych i nieuporządkowanych obszarów białek bHLH-PAS. W tym celu nawiązała dodatkowo współpracę z Prof. V. Uverskim z Uniwersytetu Tampa na Florydzie. W rezultacie habilitantka wykazała, że większość mutacji dla wybranych i analizowanych przedstawicieli rodziny bHLH-PA, które są związane z chorobami, jest zlokalizowana w rejonach IDR. Od niedawna wiadomo, że rejonu IDR mogą być zaangażowane w separację białek



w fazie ciecz-ciecz (LLPS), procesu ważnego dla rozwoju neuronów i plastyczności synaptycznej. Zgodnie z tym, przyszłe plany naukowe doktorantki obejmują badania inherentnego nieuporządkowania białka TCF4 i skłonności do LLPS dla różnych izoform TCF4 typu dzikiego i mutantów związanych z chorobą Pitta Hopkina. W swoich przyszłych planach habilitantka uwzględni również badania skłonności białka NPAS4 do LLPS, a wstępne rezultaty tych badań zamieściła nawet w swoim autoreferacie. Tak więc wyniki otrzymane w ramach drugiego osiągnięcia habilitacyjnego mają potencjalne znaczenie terapeutyczne.

Ocena dorobku naukowego

W ramach dotychczasowej pracy naukowej dr Beata Greb-Markiewicz była zaangażowana w projekty o różnorodnej tematyce naukowej, odmiennej od tematyki osiągnięć habilitacyjnych. W kolejności chronologicznej były to:

- Analiza aktywności biologicznej wybranych grzybów entomopatogennych wobec owadów (w ramach pracy doktorskiej)
- Analiza metabolitów roślinnych (w Pracowni Chemii Ekologicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej)
- Badanie wpływu hormonów na rozwój owadów (podczas stażu podoktorskiego w Instytucie Zoologii i Endokrynologii Uniwersytetu w Ulm w Niemczech)
- Oczyszczanie białka N i z wirusa SARS-CoV-2 i analiza strukturalna próbek białka N
- Analiza udziału separacji faz LLPS z w rozwoju chorób wirusowych
- Zastosowanie grzybów owadobójczych do poprawy wzrostu roślin

Szerokie zainteresowania habilitantki, jej ciekawość i inwencja naukowa, a także skuteczność w realizacji kolejnych projektów zasługują na szczególne uznanie. Każdy z podjętych przez nią tematów był zrealizowanym, a wyniki opublikowane. W ten sposób habilitantka jest współautorem 18-tu publikacji, które nie wchodzi w skład osiągnięć habilitacyjnych. Prace te ukazywały się w czasopiśmie o różnym charakterze, w tym prestiżowych (jak np. *Trends in Microbiology*). Ponadto dorobek naukowy habilitantki po uzyskaniu przez nią stopnia doktora obejmuje dwa rozdziały w monografiach naukowych oraz liczne doniesienia prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Realizacja projektów o różnorodnej tematyce była możliwa dzięki umiejętności habilitantki do nawiązywania owocnej współpracy naukowej z ośrodkami w Polsce i za granicą. Świadczy to o samodzielności i dojrzałości naukowej habilitantki.

Podsumowując, dr Beata Greb-Markiewicz jest współautorką 27 publikacji, o sumarycznym IF 86,68 i liczbie punktów MEiN 1774 (w tym 204 do 2018 roku i 1570 od 2019). Według bazy Web of Science liczba wszystkich cytowań jej publikacji wyniosła 181 (162 bez autocytowań) a indeks Hirscha według bazy Web of Science wynosił 7 w momencie składania dokumentów.

Poza upowszechnianiem wyników badań naukowych w postaci publikacji i komunikatów naukowych, dr Beata Greb-Markiewicz wykazała się także udziałem jako wykonawca w projekcie NCN PRELUDIUM, kierowanym przez dr M. Adamską-Kolonko oraz jako kierownik w dwóch projektach KNOW finansowanych przez Wrocławskie Centrum Biotechnologii. Mimo podjętych

starań nie udało się jej pozyskanie funduszy na badania naukowe w ramach projektu OPUS w NCN. Nie ma na swym koncie również uczestnictwa w projekcie międzynarodowym. Dla rozwoju naukowego habilitantki korzystne byłoby wykorzystanie współpracy zagranicznej do wystąpienia o wspólne finansowanie.

Na uznanie zasługuje efektywna działalność recenzencka i edytorska habilitantki. Wykonywała ona recenzje dla renomowanych międzynarodowych czasopism naukowych takich jak: *Scientific Reports*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *Journal of Insects Physiology*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Biomolecules*, *Journal of Fungi Applied Microbiology and Biotechnology*, *Journal of Insect Science* oraz dla nowego czasopisma *Clocks and Sleep*. Była redaktorem gościnnym wydań specjalnych w czasopismach *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Jove Methods Collection*.

Podsumowując dorobek naukowy, za najważniejsze argumenty przemawiające za nadaniem dr Beacie Greb-Markiewicz stopnia doktora habilitowanego uważam:

- osiągnięcia naukowe, które znalazły odzwierciedlenie w bardzo dobrych publikacjach, w których rola habilitantki jest wiodąca
- rozmach naukowy, inwencję w konsekwentnym rozwijaniu badań nad białkami rodziny bHLH u ssaków
- otwarcie na różnorodne nowe wyzwania naukowe
- samodzielność naukowa, kreatywność, umiejętność pozyskiwania współpracowników

Działalność dydaktyczna, popularyzatorska, organizacyjna

Równolegle do badań naukowych, dr Beata Gleb-Markiewicz uczestniczy w kształceniu młodzieży. Była opiekunem 28 prac magisterskich i 25 prac inżynierskich. Sprawowała opiekę naukową nad dwoma doktorantkami jako promotor pomocniczy. W latach 2015-2018 opiekowała się także studentami z zagranicy, którzy odbywali staże w laboratorium.

Od 2015 roku habilitantka prowadzi wykłady na uniwersytecie z biologii molekularnej oraz laboratorium z biochemii w języku angielskim, odpowiednio 30 i 60 godzin na semestr, oraz wybrane ćwiczenia laboratoryjne z inżynierii genetycznej i chemii produktów naturalnych. Podkreślić należy jej udział w Radzie Naukowej Wydziału Chemicznego podczas dwóch kadencji w latach 2012-2019, oraz ponownie w latach 2021-2024; oraz udział w Radzie Konsultacyjnej Wydziału w latach 2019-2021 jako przedstawiciel ZNP na Politechnice Wrocławskiej.

Od 2017 roku dr Beata Gleb-Markiewicz jest opiekunem koła naukowego studentów Biotechnologii KNS "BioTop", aktywnie zaangażowanym w codzienną opiekę naukową podczas aktualnie realizowanych badań w ramach tematyki koła.

Od 2007 habilitantka roku aktywnie bierze udział w popularyzacji nauki poprzez udział w Dolnośląskim Festiwalu Nauki na Politechnice Wrocławskiej. Brała też udział jako wykładowca na Uniwersytecie III wieku (Uniwersytet Wrocławski).

Za znaczący wkład w funkcjonowanie uczelni w latach 2006, 2011 i 2016 została trzykrotnie nagrodzona nagrodą Rektora Politechniki Wrocławskiej.



Wniosek końcowy

Podsumowując moją opinię wyrażam przekonanie, że przedstawione mi do oceny osiągnięcie naukowe i aktywność dr Beaty Gleb-Markiewicz spełniają warunki konieczne do uzyskania stopnia doktora habilitowanego określone Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie Ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Popieram wniosek o nadanie Pani dr Beacie Gleb-Markiewicz stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie biochemii.

Prof. dr hab. Magdalena Rakowska-Boguta