

Kraków, dn. 25.01.2024 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

**Recenzja dorobku naukowego dr inż. Elżbiety Wieczorek
w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**

Recenzja została przygotowana na podstawie dostarczonych dokumentów.

Pani doktor inżynier Elżbieta Wieczorek jest absolwentką Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej. Tytuł magistra inżyniera chemika w zakresie chemii bioorganicznej, uzyskała w 1984 roku na podstawie pracy „Wstępne oczyszczenie lipoproteidu wiążącego hormon juvenilny z hemolimfy larw mola woskowego *Galleria mellonella* (L.)” Stopień **doktora** Nauk Chemicznych, został zaś jej nadany przez Radę Naukową Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Politechniki Wrocławskiej w 1993 roku na podstawie rozprawy zatytułowanej: „Badania nad interakcją hormon juvenilny - białko wiążące hormon juvenilny z hemolimfy mola woskowego *Galleria mellonella*” przygotowanej pod opieką promotora prof. dr hab. Mariana Kochmana.

Pani doktor Wieczorek rozwija swoją karierę naukową na Politechnice Wrocławskiej, początkowo w Zakładzie Biochemii w ramach Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej, który później przekształcono w Katedrę Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii. Habilitantka zatrudniona była pierwotnie na stanowisku asystenta-stażysty, później asystenta, starszego asystenta, by obecnie pracować na stanowisku adiunkta. W między czasie odbyła studia doktoranckie po których niezwłocznie udała się na dwa długoterminowe staże zagraniczne do Instytutu Genetyki, Biologii Molekularnej i Komórkowej (Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, IGBMC), Strasburg, Francja a następnie do Uniwersytetu Virginia Commonwealth (Virginia Commonwealth University, VCU), Richmond, Virginia, USA.

Zakład Biochemii Fizycznej,
Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

dr hab.
Andrzej Górecki

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. 12 664 67 80
fax 12 664 69 02

e-mail: andrzej.gorecki@uj.edu.pl

Ocena osiągnięć naukowych

Pani doktor Wieczorek wyodrębniła dwa cykle prac naukowych, które tworzą osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę procesu habilitacyjnego. We wszystkich pracach odgrywa ona kluczowe i dobrze wyodrębnione role, w znakomitej większości przypadków pełni rolę autora wiodącego.

W swojej pracy naukowej, stanowiącej oceniany dorobek istotne miejsce zajmują dociekania na temat ludzkiego białka transtyretyny (TTR), które to kanonicznie pełniąc rolę transportera hormonów tarczycy, retinolu i innych niskocząsteczkowych związków, pełni także funkcje ochronne w układzie nerwowym, a nawet uczestniczy w szlakach sygnałowych regulacji ekspresji genów i ma własności proteazy zależnej od jonów cynku. To wielofunkcyjne białko może ulegać destabilizacji i agregacji, co prowadzi do tworzenia amyloidów TTR. Istotnym punktem do szczegółowych dociekań habilitantki, była jednak obserwacja, że TTR może współdziałać z mitochondrialnym czynnikiem transkrypcyjnym A (TFAM) w przerwaniu błędnego koła stresu mitochondrialnego w mysim modelu choroby Alzheimera. W szczególności dla habilitantki istotne było poznanie znaczenia destabilizacji struktury tego kinetycznie hiperstabilnego białka, wywołanej czynnikami charakterystycznymi dla stanu stresu oksydacyjnego, na własności i funkcję TTR. Habilitantka upatruje bowiem w tym poznaniu możliwość zrozumienia patogenezy chorób amyloidowych, a w dalszej perspektywie możliwość zaprojektowania strategii przeciwdziałania tym chorobom. W swoich pracach, posługując się bogatym zestawem trafnie dobranych eksperymentów biochemicznych, wykazuje istotny wpływ jonów Mg^{++} i Ca^{++} na destabilizację tego białka. Ułatwia to proteolizę krótkiego N-końcowego jego fragmentu i prowadzi do jego precypitacji. Jakkolwiek proces ten zachodzi przy wyższych niż typowe stężenia jonów wapnia w komórce, to w specyficznych warunkach może odgrywać istotną fizjologicznie rolę. Prace Pani Wieczorek wskazują także na istotne znaczenie potencjału redukcyjnego w procesie destabilizacji tego białka, gdyż zwiększenie stężenia reduktora prowadzi do efektów podobnych jak poprzednio obserwowane dla jonów wapniowych (lub magnezowych). Pomiędzy tymi dwoma czynnikami występuje niewielka synergia. Efekt destabilizacji zauważono także dla warunków utleniających, czemu towarzyszyło powstanie dityrozyny utworzonej przez kowalencyjne połączenie dwóch reszt tyrozyny występujących w protomerach tworzących dimer TTR. Bardzo intrygującym i nietypowym efektem towarzyszącym procesowi destabilizacji tego białka jest formowanie się nowego fluoroforu emitującego promieniowanie w zakresie światła niebieskiego. Zjawisko to w literaturze określa się jako autofluorescencja głębokiego błękitu (ang. *deep-blue autofluorescence*, *dbAF*) jest słabo poznane i dosyć rzadko opisywane. Uważa się jednak, że świadczy ono o zmianach konformacyjnych poprzedzających pojawienie się zmian amyloidowych. Efekt ten występuje zarówno dla warunków utleniających jak i redukujących, ma jednak inny charakter spektralny, co potwierdza różną ścieżkę

reakcji prowadzącą do destabilizacji TTR. Uzyskane rezultaty bardzo dobrze wpisują się w literaturę dotyczące chorób amyloidowych zachodzących z udziałem TTR dostarczając jednocześnie wartościowych i nowatorskich szczegółów dotyczących molekularnych podstaw tego procesu. Habilitantka podjęła się także dociekań nad rolą białka TTR w procesie biomineralizacji, które potwierdziły jego istotną rolę w formowaniu powstających kryształów i doprowadziły do obserwacji występowania istotnych różnic w strukturze kryształów węglanu wapnia zależnych od obecności i stanu w jakim znajduje się TTR. Istotne były tutaj procesy poprzedzające biomineralizację, takie jak termiczna destabilizacja i preinkubacja z jonami wapniowymi, które wpływając na dyspersję struktury TTR odegrały istotną rolę w morfologii powstających kryształów. Szczegółowe dociekania pozwoliły na stwierdzenie występowania sygnatur białkowych, fazy białkowo-mineralnej a także agregatów TTR i struktur amyloidalnych na powierzchni powstających kryształów. Uzyskane rezultaty pozwoliły także na wyciągnięcie wniosków zarówno o nukleacyjnej roli TTR w procesie biomineralizacji jak i o jego wpływie na asymetrię wzrostu kryształów.

Habilitantka zauważa, że modyfikacje stabilności struktury TTR spowodowane jonami wapnia, które występują w procesie stresu mitochondrialnego w podwyższonym stężeniu, korelują z obserwacjami świadczącymi o roli TTR w odpowiedzi na tenże stres. Ze względu na to, iż istotnym elementem mechanizmu odpowiedzi na stres mitochondrialny jest sumoilacja białek, przeprowadzono badanie tego procesu w kontekście TTR. W swoich pracach habilitantka wykorzystała system sumoilacji ułatwionej (ang. *Ubc9 Fusion Directed Sumoylation*, UFDS). Oprócz spodziewanego, aczkolwiek małoefektywnego procesu sumoilacji TTR, zaobserwowano sumoilację sekwencji samego enzymu Ubc9 tworzącego białko chimeryczne z TTR. Obserwację tę uznano za efekt autosumoilacji tego enzymu bądź sumoilacji krzyżowej a sam proces sumoilacji Ubc9, który nie był obserwowany wcześniej dla preferowanej w tym przypadku lokalizacji K154, uznano za efekt regulowany przez TTR. Co ciekawe i znaczące, białko TTR stymulowało sumoilację także innych białek, niezależnie czy ekspresjonowane było w sekwencji natywnej, czy też tworząc chimery z Ubc9. Wysłunięto więc hipotezę, że TTR regulując aktywność Ubc9 wpływa na sumoilację białek w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Podsumowując, habilitantka badając białko TTR w sposób metodyczny zarówno w żywych komórkach eukariotycznych jak i w układzie modelowym w oparciu o białka rekombinowane uzyskane w bakteryjnym systemie eksperymen-talnym, uzyskała szereg nowatorskich obserwacji, które wniosły istotny wkład w rozumienie jego funkcjonowanie. Wyniki te zostały podsumowane w publikacji przeglądowej i osadzone w kontekście wielu chorób, w szczególności tych, które związane są z procesem biomineralizacji i zwapnienia a także w kontekście chorób naczyniowych i dotyczących procesu krzepnięcia. W celu przybliżenia tych złożonych zależności podjęto wartościową próbę stworzenia modelu, który łączy stabilność strukturalną TTR i czynniki destabilizujące strukturę TTR z procesami patogenezy wspomnianych różnych chorób.

Drugie osiągnięcie pani doktor Wieczorek stanowią trzy prace badawcze określone wspólnie jako „Badanie regulacji transkrypcji genów Homo sapiens”. W pracach tych Pani doktor pełni także rolę pierwszoplanową, co znajduje swoje potwierdzenie na liście autorów, gdzie jej nazwisko zajmuje pierwsze bądź w jednym przypadku drugie miejsce, nie jest jednak autorem korespondencyjnym.

W pracach tych habilitantka skupia się na identyfikacji nowych funkcjonalnych kompleksów transkrypcyjnych. Dzięki jej staraniom zidentyfikowany został nieznany wcześniej kompleks zawierający białko TAF_{II}30 (obecnie określane jako TAF10), który posiadał aktywność biologiczną pomimo iż nie zawierał podjednostki TBP, uważanej wcześniej za kluczową w inicjacji transkrypcji. Pani doktor Wieczorek wniosła też istotny wkład w poznanie kompleksu transkrypcyjnego regulującego ekspresję genu wimentyny. Określiła ona bowiem lokalizację dwóch elementów cis-regulatorowych o przeciwstawnych funkcjach aktywatorowych i zidentyfikowała czynnik (ZBP-89), który wiążąc się z jednym z nich tworzył kompleks z ogólnym czynnikiem transkrypcyjnym SP1 i pełnił funkcję represora. Dla tego samego genu, pani doktor Wieczorek zidentyfikowała także element cis-regulatorowy w promotorze tego genu. Prace te były podstawą do dalszych badań, rozwijanych już przez inne grupy, które pokazały, że regulacja transkrypcji tego genu kontrolowana przez ZBP-89 odbywa się poprzez deacetylację histonów przeprowadzaną przez rekrutowaną przez to białko HDAC1. Wspomniane rezultaty są bardzo odkrywcze, co zostało potwierdzone przyjęciem publikacji, traktującej o tym odkryciu, do druku w najbardziej prestiżowych czasopismach z tej dziedziny: Nature, Gene, czy JBC.

Ocena aktywności naukowej

Dorobek naukowy Pani Elżbiety Wieczorek stanowi 16 prac naukowych opublikowanych głównie w dobrych lub bardzo dobrych czasopismach naukowych. Spośród tych prac, wyróżnione zostały dwa cykle połączonych tematycznie prac.

Pierwszy z wyróżnionych cykli prac, który jest chronologicznie późniejszy i powstał w latach 2016 – 2022, składające się z pięciu prac eksperymentalnych i jednej przeglądowej. Opatrzono go tytułem: „Poznanie nowych właściwości i zależności pomiędzy strukturą i funkcją ludzkiej transtyretyny w kontekście patogenezы chorób oraz potencjalnych strategii terapeutycznych” i jest owocem prac prowadzonych w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii – rodzimym obecnie miejscu pracy. Warto zaznaczyć, że w pracach tych, nie dość, że habilitantka jest na pierwszym miejscu listy autorów, to jeszcze pełni funkcję autora korespondencyjnego, co świadczy o wyjątkowo wysokim jej

zaangażowaniu w całość prac niezbędnych do powstania tego osiągnięcia. Obserwacja ta potwierdzona jest oświadczeniami współautorów, którzy upatrują swój stosunkowo niewielki udział w powstaniu tych prac.

We wszystkich pracach, pani doktor Wieczorek odgrywała rolę wiodącą, co znajduje odzwierciedlenie na isticie autorów manuskryptów, gdzie jej nazwisko umieszczone zostało w znakomitej większości na pierwszym miejscu, a w jednym tylko przypadku na drugim. We wszystkich pracach eksperymentalnych jest wiodącym eksperymentatorem, który uczestniczył w planowaniu eksperymentów i opracowywaniu procedur badawczych. W większości przypadków, opracowanie założeń projektowych było poprzedzone jej studiami literaturowymi. Habilitantka uczestniczyła też w przygotowaniu manuskryptów.

Drugi z wyróżnionych cykli prac jest chronologicznie wcześniejszy, gdyż prace zostały opublikowane w latach 1998 – 2000 i składa się z trzech prac eksperymentalnych opatrzonych dosyć ogólnym, ale adekwatnym tytułem „Badanie regulacji transkrypcji genów Homo sapiens”. Są one rezultatem dwóch bardzo owocnych staży naukowych, które habilitantka odbyła w IGBMC (Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire) we Francji i w VCU (Virginia Commonwealth University) w USA.

Pozostałe prace habilitantki, można także podzielić na dwie analogiczne tematyki badawcze, dotyczą one bowiem białka transportującego i regulacji transkrypcji genów. W tych przypadkach badane były jednak nie ludzkie, lecz owadzie białka.

Pani Wieczorek badała białko transportujące JHBP wiążące hormon Juwenilny (JH), dla którego wykazała, że procesowi temu towarzyszy istotna zmiana konformacyjna JHBP, które najprawdopodobniej ma znaczenie fizjologiczne, oraz że asocjuje ono z HDL. Badania te stały się podstawą dla przygotowania pracy magisterskiej, a następnie rozprawy doktorskiej oraz trzech publikacji naukowych.

Habilitantka następnie podjęła się kontynuacji badań nad tym hormonem oraz hormonem 20E. Tym razem jednak grupa badawcza skoncentrowała się nie na transporcie tych związków, ale efektach, które wywołują podczas wiązania do ich receptorów jądrowych. Prowadzone prace, w których uczestniczyła habilitantka przyczyniły się do powstania czterech dalszych prac naukowych. Stworzenie układu modelowego do badania receptorów EcR dla 20E i Usp, który był hipotetycznym receptorem dla JH, nie spełnił jednak pokładanych w nim nadziei, dlatego pani Wieczorek zmieniła przedmiot badawczy na ludzkie białko TTR. Zmiana ta okazała się bardzo twórcza, prowadząc do powstania wspomnianych już wcześniej cyklu prac naukowych.

Pani Wieczorek prowadziła badania naukowe dzięki wsparciu finansowemu pozyskiwanemu zarówno ze środków zewnętrznych jak i instytucji

w których pracowała. Niestety nie znalazłem informacji aby była osobą liderującą w pozyskiwaniu tych środków.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF według listy JCR) czasopism z roku wydania poszczególnych manuskryptów, w których habilitantka jest współautorem, z uwzględnieniem roku publikacji, wynosi 96,058. Prace te, do czasu przygotowania dokumentacji habilitacyjnej, cytowane były według bazy Web of Science 427 razy (411 bez autocytowań), a według bazy Scopus 452 razy (436 bez autocytowań). Warto podkreślić, że najbardziej rozpoznawalna praca cytowana była ponad 200 razy i wchodzi w skład drugiego cyklu przedstawionego przez habilitantkę jako osiągnięcie. Indeks Hirscha według baz Web of Science i Scopus wynosi 9. Podane parametry bibliometryczne trudno uznać za wybitne, ale w moim przekonaniu są one wystarczające do przeprowadzenia przewodu habilitacyjnego zakończonego sukcesem.

Aktywność naukowa habilitantki nie ogranicza się tylko do publikacji naukowych. Pani Wieczorek jest bowiem współautorem 11 doniesień zjazdowych, z których, jak wspomina w swoim autoreferacie, niektóre okazały się bardzo istotne w kształtowaniu przyszłej kariery naukowej.

Przyznać należy, że rozpoznawalność pani doktor Wieczorek na arenie międzynarodowej jest umiarkowana, gdyż była recenzentką zaledwie dwóch prac badawczych. Warto jednak wspomnieć, że jest członkiem komitetów redakcyjnych dwóch czasopism: Polymers i Frontiers in Nutrition, oraz że jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Chciałbym podkreślić i docenić, że jako nauczyciel akademicki, pani doktor Wieczorek aktywnie uczestniczy w kształceniu przyszłych badaczy zainteresowanych naukami biologicznymi, prowadzi bowiem zajęcia laboratoryjne i wykłady z tego zakresu, w tym zajęcia autorskie. Warto podkreślić, że prowadząc 10 projektów magisterskich i 14 inżynierskich, włączała studentów w główny nurt jej zainteresowań badawczych i robiła to na tyle skutecznie, że w 11 przypadkach uzyskane rezultaty przyczyniły się do realizacji jej głównego celu badawczego, spośród których w czterech przypadkach w sposób na tyle istotny, że dyplomanci znaleźli się na liście autorów powstających prac. Swoją opiekę dydaktyczną roztaczała także nad studentami spoza Polski, opiekując się dwoma projektami studenckimi podczas pobytów stypendialnych we Francji i USA, a także w rodzimej jednostce prowadząc cztery prace badawcze w której uczestniczyli studenci programu Erasmus z różnych krajów.

Jej praca badawcza została doceniona na wczesnym etapie swojej kariery naukowej, gdyż w 1989 otrzymała nagroda im. Włodzimierza Mozołowskiego na XXV konferencji Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Dalsze nagrody habilitantki związane są bezpośrednio z pracą na rzecz uczelni i przyznane zostały w roku 1992 za wzorowe wypełnianie obowiązków zawodowych; w 2014 roku w uznaniu wyróżniającego wkładu w działalność uczelni. W roku 2020 otrzymała zaś Odznaczenie państwowe: Złoty medal za długoletnią służbę.

Podsumowanie

Tematyka wszystkich publikacji naukowych, zarówno tych, które tworzą wyodrębnione **dwa cykle powiązanych tematycznie** prac jak i prac pozostałych, dotyczy aspektów biochemicznych, tym samym bardzo dobrze wpisuje się w dziedzinę i dyscyplinę, w której pani **doktor** Wieczorek stara się uzyskać stopień doktora habilitowanego. Wszystkie jej prace ukazały się w renomowanych czasopismach recenzowanych i tym samym ich jakość naukowa została pozytywnie zweryfikowana już na etapie procesu wydawniczego. Prace te nie budzą też moich zastrzeżeń i uważam, że są przykładami bardzo dobrych, wnikliwych i odkrywczych prac z zakresu biochemii. Pani Wieczorek wniosła dobrze wyodrębniony i znaczący wkład w powstanie opublikowanych prac, co zostało potwierdzone oświadczeniami współautorów. **Bez wątpienia jej dokonania poszerzają naszą wiedzę, tym samym stanowią znaczny wkład w rozwój dyscypliny.**

Pani doktor Wieczorek umiejętnie korzysta zarówno z możliwości prowadzenia badań w ośrodkach zewnętrznych jak i we współpracy z takimi jednostkami. Dzięki temu swoją **aktywność naukową** realizowała w dwóch wiodących ośrodkach naukowych we Francji i USA w ramach długoterminowych staży podoktoranckich, oraz we współpracy z ośrodkiem z Niemiec i trzema ośrodkami krajowymi.

Wniosek końcowy

Uważam, że pani doktor Elżbieta Wieczorek, spełnia wszystkie wymogi określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Popieram zatem starania o nadanie jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Andrzej Gowalik