

dr hab. Joanna Saluk-Bijak, prof. nadzw. UŁ  
Katedra Biochemii Ogólnej  
Instytut Biochemii UŁ  
ul. Pomorska 141/143  
90-236 Łódź

**Ocena pracy doktorskiej  
mgr Michała Chojnackiego**

**pt. „Analiza właściwości nowych pochodnych ubikwityny  
oddziałujących z proteasomem”**

**Promotor pracy – Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj**

Homeostaza białkowa stanowi złożony zespół mechanizmów mających za zadanie zapewnienie prawidłowego wzrostu i właściwego funkcjonowania komórek w warunkach fizjologicznych oraz minimalizowanie skutków patogenezy.

U podstawy zjawiska proteostazy leżą dwa, przeciwstawne procesy tj. biosynteza nowych oraz degradacja zbędnych cząsteczek białkowych. Brak równowagi pomiędzy nimi jest przyczyną poważnych konsekwencji zdrowotnych wynikających m.in. z akumulacji wadliwych i/lub zużytych białek.

Jednym z systemów warunkujących zachowanie równowagi w proteomie jest proteasom, który w interakcji z ubikwityną funkcjonuje w oparciu o proteolityczne mechanizmy degradacji białek wewnątrzkomórkowych, sprawując w ten sposób kontrolę jakości białek komórkowych i regulując ich obrót metaboliczny.

UPS, czyli system ubikwityna-proteasom zaangażowany jest m.in. w degradację białek sygnałowych, co ma szczególnie istotne znaczenie w chorobach degeneracyjnych i nowotworowych, u podłoża których leży nieprawidłowa kontrola ścieżek przekazywania sygnałowego.

Funkcją enzymów współtworzących szlak UPS jest ponadto usuwanie białek regulujących procesy: apoptozy, cyklu komórkowego, naprawy DNA, przepuszczalności błon, dynamiki mitochondriów, czy odpowiedzi immunologicznej. Wielofunkcyjność UPS wynika z różnorodności możliwych do utworzenia kombinacji polimerów Ub, co generuje powstanie zróżnicowanych strukturalnie i funkcjonalnie systemów UPS.

Ze względu na tę zróżnicowaną funkcję oraz złożoność struktury UPS, wyzwaniem stanowi określenie jego szeroko rozumianej aktywności, w tym roli jako markera diagnostycznego różnych chorób.

Ponadto, w świetle doniesień literaturowych ostatnich lat, strategicznym celem nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych i antyneurodegeneracyjnych jest farmakologiczna regulacja funkcji proteasomu.

I właśnie, przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Michała Chojnackiego, poświęcona jest badaniom szlaku UPS w celu wykazania nowych, unikalnych właściwości, istotnych dla poznania i lepszego zrozumienia oddziaływań jego poszczególnych elementów.

Przy czym nadrzędnym celem pracy jest implementacja nowych i użytecznych technik badawczych stanowiących efektywne narzędzie monitorowania oddziaływań międzybiałkowych.

Szczegółowe cele pracy to wykorzystanie nowo opracowanych narzędzi i technik badawczych do:

- 1) identyfikacji dotychczas nie poznanego receptora proteasomalnego przy użyciu zaprojektowanych fotoreaktywnych łańcuchów poliubikwityny oraz charakterystyka interakcji tego receptora z ligandem;
- 2) oceny funkcjonalnych i strukturalnych właściwości zmutowanej formy Ub tj. neurodegeneracyjnej cząsteczki UBB<sup>+1</sup> odpowiedzialnej za inhibicję proteasomu;
- 3) zbadania wpływu mutacji F45W na zmiany strukturalne oraz właściwości funkcjonalne w odniesieniu do natywnej formy ubikwityny, w tym na oddziaływanie z receptorem;
- 4) analizy nietypowych właściwości domeny UBL w białku Ddi1 związanych z jego oddziaływaniem z cząsteczką Ub oraz do charakterystyki tych międzybiałkowych interakcji.

Należy podkreślić, że powyższe cele badawcze są bardzo ambitne i zawierają istotny element poznawczy.

Oceniana praca ma ogólnie typowy dla rozpraw doktorskich układ: bardzo obszerny wstęp uzasadniający założenia pracy, jasno sformułowane cele, dokładny

opis metodyki badawczej, szczegółowe omówienie wyników oraz interesującą i dojrzałą dyskusję.

Liczący 59 stron Wstęp stanowi szczegółowy opis zagadnień dotyczących struktury i funkcji systemu ubikwityna-proteasom. Znajduje się tu charakterystyka ośmiu możliwych homogennych wariantów łańcuchów ubikwityny oraz wariantów mieszanych, uwzględniająca unikalne właściwości biochemiczne i strukturalne każdego z nich. Ten bardzo szczegółowy opis zawiera wiele najnowszych doniesień dotyczących m.in. nieproteolitycznych właściwości sygnałowych ubikwityny. Autor zwraca także uwagę na mutacje ubikwityny, które według doniesień literaturowych, mogą przyczyniać się do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. We wstępie znalazł się również opis struktury proteasomu oraz strukturalna i funkcjonalna charakterystyka szeregu białek uczestniczących w oddziaływaniach ubikwityna-proteasom, w tym białek regulatorowych, współdziałających oraz enzymów deubikwitynujących. Należy podkreślić, że szczegółowe opisy zostały wzbogacone licznymi ilustracjami graficznymi struktur oraz modeli białek, których opracowanie wymagało ogromnego nakładu pracy. Przy użyciu specjalistycznego oprogramowania bioinformatycznego na podstawie informacji zawartych w bazie danych RCSB Protein Data Bank Doktorant dokonał wizualizacji, porównania homologii oraz symulacji interakcji pomiędzy strukturami białkowymi.

Materiał i Metody zastosowane w pracy zostały opisane na 31 stronach tekstu. Dodatkowo dołączony został 6-cio stronicowy Supplement zawierający protokoły syntezy, oczyszczania oraz analizy masowej fotoreaktywnych form ubikwityny ze zmodyfikowanymi resztami leucyny w pozycji 8 lub 73. Poza metodą chemicznej syntezy łańcuchów ubikwityny, Doktorant zastosował w pracy wiele wysoce specjalistycznych metod z zakresu biochemii i biologii strukturalnej, a także metody genetyczne i bioinformatyczne. Należy zaznaczyć, iż pracę wyróżnia nowoczesność i wielowątkowość zastosowanej metodologii. Szeroki warsztat badawczy, obejmował m. in. spektrometrię mas, spektrometrię NMR, czy krystalografię. Ze względu na zróżnicowane cele badawcze oraz bardzo dużą liczbę eksperymentów Autor usystematyzował otrzymane wyniki w taki sposób, iż dla każdego zagadnienia badawczego przeprowadził oddzielną dyskusję oraz sformułował wnioski, które przedstawił w formie opisowego podsumowania. W ten sposób wyniki przedstawiono i omówiono łącznie na 59 stronach, wzbogacając opis 2 tabelami i 34 bardzo rozbudowanymi rycinami, co pokazuje ogromny nakład pracy jaką wykonał Doktorant. Przeprowadzenie tak dużej liczby eksperymentów w oparciu o zróżnicowane najnowsze techniki badawcze świadczy o znaczącej wiedzy

i doświadczeniu naukowym Doktoranta. Szczególnym osiągnięciem mgr Chojnackiego jest zdeponowanie koordynatów struktury otrzymanego kryształu Ub<sup>F45W</sup> w bazie RCSB Protein Data Bank. Zawarta w Dyskusji wnikliwa analiza wyników połączona z ich weryfikacją w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe podkreśla naukową dojrzałość Doktoranta. Praca zawiera 505 pozycji literaturowych, w przeważającej liczbie opublikowanych w ostatnich latach.

Wykazane w pracy nieznanne dotychczas nowe właściwości badanych składowych systemu ubikwityna-proteasom mogą przyczynić się do dalszego poznania strukturalnych i funkcjonalnych cech tego systemu. Wyjątkowe znaczenie mogą mieć zaprojektowane przez Doktoranta i zwalidowane nowatorskie narzędzia biochemiczne, użyteczne w badaniach proteomicznych nie tylko dotyczących systemu UPS.

Sformułowane przez Doktoranta Wnioski mają charakter opisowy i znajdują się w podsumowaniu każdego rozdziału dotyczącego wyników z danego zagadnienia badawczego. Dodatkowo, w pracy zawarty został rozdział "Końcowe wnioski i perspektywy na przyszłość", który stanowi krótkie, opisowe podsumowanie osiągnięć omawianej pracy.

Ogólnie, tak pod względem merytorycznej zawartości, poprawności zaplanowania badań i ich przeprowadzenia, jak również pod względem zaprezentowanej formy i treści pracy, dysertację mgr Michała Chojnackiego oceniam bardzo wysoko.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi zastrzeżeń w zakresie oryginalności tematyki badawczej, postawionych celów badawczych i doboru metodyki badań oraz interpretacji uzyskanych wyników, to jednak, z obowiązku recenzenta, pragnę zwrócić uwagę Doktoranta na pewne drobne uchybienia, które wzbudziły moje wątpliwości:

- Z jednej strony rozumiem zabieg Doktoranta, który rozdzielił omawiane wyniki na poszczególne rozdziały i w konsekwencji w 4 kolejnych rozdziałach przeprowadził każdorazowo oddzielną dyskusję i sformułował wnioski, które przypominają bardziej podsumowanie wyników. Wynika to jak sądzę z chęci usystematyzowania ogromnej liczby zróżnicowanych wyników. Jednak, paradoksalnie, wprowadza to pewien chaos, być może spowodowany brakiem jasno sformułowanych, wypunktowanych wniosków końcowych.

Kolejne uwagi mają wyłącznie charakter edytorski:

- na stronie 29 Autor błędnie cytuje Ryc. 1.14
- w pracy znajdują się stosunkowo częste zapożyczenia i kalki z języka angielskiego, jak np. "ładunki negatywne i pozytywne" - str. 38 i Ryc.1.20; "mediować interakcję" - str.49; "wyniki eksperymentów odsłoniły, że" - str. 50; czy " balans" w kontekście równowagi - str. 59
- pojawiają się także uproszczenia i skróty myślowe takie jak np. "Te trzy duby odgrywają ważną rolę..." - str. 56, czy np. "50 uL reakcji..." - str 83 i podobnie 84.

Przytoczone powyżej drobne uwagi nieistotne merytorycznie, nie umniejszają w żadnym stopniu wartości rozprawy i mojej wysokiej oceny tej wyróżniającej się pracy mgr Michała Chojnackiego.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa posiada bardzo dużą wartość poznawczą i bez wątplenia zawiera elementy nowości naukowej. Uzyskane wyniki wskazują, że Doktorant w pełni zrealizował postawione cele badawcze. 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 późniejszymi zmianami).

Uwzględniając przede wszystkim warsztat badawczy i wysoką wartość poznawczą osiągnięć naukowych, jak również doskonałe opracowanie teoretyczne, z prawdziwą przyjemnością przekładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Michała Chojnackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Łódź, dnia 8 maja 2017 roku

