



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Pracownia Genetyki Medycznej

dr hab. Tomasz Śliwiński prof. nadzw. UŁ

Łódź, dnia 08 maja 2017 r.

Pracownia Genetyki Medycznej

Uniwersytetu Łódzkiego

O c e n a

pracy doktorskiej mgr. Michała Chojnackiego

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

Zaburzenia procesu homeostazy białkowej, istotnego z punktu widzenia zachowania prawidłowych procesów komórkowych, prowadzi do rozwoju poważnych chorób spowodowanych nadmierną akumulacją oraz powstawaniem toksycznych agregatów białkowych.

Komórka prawidłowa wyposażona jest w bezbłędny, wysoce specyficzny system eliminacji zbędnych białek, umożliwiający szybką reakcję na warunki panujące w jej wnętrzu. Kryteria takiego systemu spełnia kompleks ubikwityna - proteasom (UPS). Ten ATP-zależny mechanizm selektywnie degraduje białka wewnątrzkomórkowe za pomocą dwóch procesów: ubikwitynacji oraz degradacji wyznakowanych białek w proteasomie. Ubikwityna (Ub) pełni rolę markera naznaczającego białka przeznaczone do degradacji, zaś rodzaj wzajemnych oddziaływań jej jednostek nadaje charakterystycznych właściwości jej łańcuchom. Modularny sygnał ubikwityny jest rozpoznawany przez liczne receptory, pozwalając na kontrolę wielu procesów komórkowych, w tym proteasomalnej degradacji białek.

Zatem istotnym staje się pełne poznanie właściwości cząsteczek ubikwityny, jak również wdrożenie nowych modyfikacji tych cząsteczek w kontekście badania zjawisk zachodzących w szlaku UPS, a zwłaszcza w jego zaburzeniach skutkujących wieloma stanami patologicznymi.

Pracownia Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, tel. (42) 635 44 86, fax (42) 635 44 84

Kierownik Pracowni: prof. nadzw. dr hab. Tomasz Śliwiński
tel. (42) 635 44 86, e-mail: tomsliv@biol.uni.lodz.pl



**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Pracownia Genetyki Medycznej

Jako, że wciąż niejasny pozostaje mechanizm opisujący rozpoznawanie ubikwitynowanych białek przez receptory proteasomalne, istotny z punktu widzenia zrozumienia istoty, a także diagnostyki chorób związanych z zaburzeniem tego mechanizmu tj. choroby neurodegeneracyjne, stany zapalne czy też choroby immunologiczne, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej, szczególnie ze względu na zawarte w nich nowe i proste techniki biochemiczne do badania szlaku UPS. Wyniki zaprezentowanych badań pozwolą na bardziej szczegółową interpretację zachodzących w tym szlaku zjawisk, a w przyszłości także na wyznaczenie nowych kierunków diagnostycznych oraz terapeutycznych dla schorzeń wywołanych przez jego zaburzenia. Dodatkowym bardzo ważnym aspektem, z medycznego punktu widzenia, poruszonym w recenzowanej pracy, jest analiza właściwości domeny UBL białka Ddi1 (pochodnej Ub) w interakcji z ubikwityną, ze względu na udział białka Ddi1 w powstawaniu oporności na leki z grupy inhibitorów proteasomu stosowanych w leczeniu nowotworów krwi.

Oceniana rozprawa ma typowy układ dysertacji doktorskiej. W bardzo rozbudowanej, ale też bezbłędnie napisanej, części poglądowej (59 stron) Doktorant opisał szereg zagadnień pozostających w ścisłym związku z wykonywanym projektem badawczym. Mgr Michał Chojnacki opisał proces ubikwitynacji, jak również scharakteryzował samą ubikwitynę oraz konformacje łańcuchów poliUb, nie zapominając opisu mutacji Ub na poziomie RNA. W kolejnej części Autor skupił się na opisie proteasomu, jak również białek współdziałających w systemie ubikwityna-proteasom. W końcu tego rozdziału zostały szczegółowo przedstawione enzymy deubikwitynujące (DUB), ich funkcje biochemiczne oraz rola w stanach chorobowych człowieka. Część ta została poparta, bardzo dobrze dobranymi, pozycjami literaturowymi, w większości pochodzącymi z ostatnich kilku lat. Bardzo czytelny wykaz skrótów pozwala na łatwe zapoznawanie z treścią zawartą w rozprawie. Zawarty w ocenianej dysertacji wstęp teoretyczny mógłby z powodzeniem służyć jako materiał to bardzo dobrej pracy przeglądowej.

Cel pracy był złożony i dotyczył zarówno zaprojektowania metody kontrolowanej syntezy polyUb^{PT}, jak również identyfikacji nowego proteasomalnego receptora z wykorzystaniem cząsteczki polyUb^{PT} oraz charakterystyka jego interakcji z ligandem. Dodatkowo za cel postawiono sobie ocenę właściwości biochemicznych dla koniugatów zmutowanej formy ubikwityny, analizę fluorescencyjnych właściwości polyUb^{F45W} oraz zbadanie wpływ mutacji F45W na strukturę i właściwości oddziaływania

Pracownia Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, tel. (42) 635 44 86, fax (42) 635 44 84

Kierownik Pracowni: prof. nadzw. dr hab. Tomasz Śliwiński
tel. (42) 635 44 86, e-mail: tomliw@biol.uni.lodz.pl



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Pracownia Genetyki Medycznej

z receptorami, czy też wreszcie scharakteryzowanie unikalnych właściwości domeny UBL białka Ddi1.

W pracy wykorzystano wiele szczepów bakteryjnych tj. DH5alpha, M15, BJ21 czy Rosetta II oraz szereg sekwencji starterowych i plazmidów, bardzo dokładnie opisanych w rozdziale Materiały i Metody. Już tutaj można się zorientować jaki ogrom pracy został włożony w wykonanie zaplanowanych eksperymentów.

Uzyskane wyniki, które ilościowo oraz jakościowo przekraczają normy dla pracy doktorskiej, są jednoznaczne, i za każdym razem bardzo dobrze udokumentowane. Wyniki badań własnych Doktorant zilustrował za pomocą przejrzystych, dobrze skonstruowanych i opisanych rycin w imponującej liczbie 68, jak również w postaci 14 tabel. Tutaj należy podkreślić, że ta ponadprzeciętna ilość uzyskanych wyników była pochodną zastosowania bardzo szerokiego wachlarza metod eksperymentalnych (biochemicznych, chemicznych, czy też z zakres biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej). W mojej ocenie, bardzo dobry sposób przedstawienia tak obszernej puli wyników uzyskanych przez Doktoranta świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autora recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Ten bardzo nowatorski projekt badawczy oraz jego konsekwentna realizacja, z wykorzystaniem właściwie dobranych metod, poparta wnikliwą oceną statystyczną otrzymanych wyników pozwoliła na uzyskanie oryginalnych ustaleń, które odpowiadają postawionym celom tj.:

- Wprowadzenie fotolecyny w łańcuch poliubikwityny umożliwia detekcję partnerów przejściowych interakcji białko-białko o charakterze hydrofobowym, zaś metoda fotoaktywacji Ub^{PT} pozwala na identyfikację pełnego interaktomu ubikwityny.
- Wytworzona polyUb^{F45W} może być wprowadzana do różnych łańcuchów polyUb z wykorzystaniem standardowych metod enzymatycznych, nie zaburzając przy tym struktury i właściwości Ub.
- Ubikwitynowane dimeryczne formy K48 i K63 UBB⁺ nie różnią się pod względem struktury od formy dzikiej.
- Jedna z domen UBL białka Ddi1 może pełnić kanoniczną rolę interakcji z proteasomem, zaś druga oddziaływać z ubikwitynowanymi substratami.

Dyskusja to bardzo mocny punkt pracy i jest napisana w sposób pokazujący dojrzałość Doktoranta, który dokładnie analizuje uzyskane wyniki, odnosząc się przy tym do podobnych wyników już

Pracownia Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, tel. (42) 635 44 86, fax (42) 635 44 84

Kierownik Pracowni: prof. nadzw. dr hab. Tomasz Śliwiński
tel. (42) 635 44 86, e-mail: tomsliw@biol.uni.lodz.pl



**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Pracownia Genetyki Medycznej

uzyskanych przez inne zespoły badawcze. Dodatkowo, co bardzo ważne, Autor wyjaśnia możliwe mechanizmy biochemiczne zachodzące w badanych systemach, pokazując przy tym nowatorskie walory wyników swoich badań.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak bardzo obszerną rozprawę (197 str.) jest godne podkreślenia.

W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące drobnych, nielicznych uchybień oraz własne sugestie:

- W tej bardzo starannie napisanej pracy znalazły się też wyjątki w postaci drobnego wprowadzania języka żargonu laboratoryjnego tj. „jest transferowany do jądra komórkowego”, „primerów”, czy też drobnych nieścisłości tj. „plazmidy poddano transformacji chemicznej (szok termiczny)”, gdzie jeden typ metody wyklucza drugi.
- Wnioski powinny być bardziej syntetyczne i podkreślając przy tym efekt uzyskanych wyników badań. Szersze informacje „opisujące wnioski” mogą stanowić materiał do właściwego podsumowania pracy w odpowiednim rozdziale.
- Badania te są punktem wyjścia i mogą pozwolić na zaproponowanie nowych strategii diagnostycznych, jak i terapeutycznych dla chorób związanych z wadliwym funkcjonowaniem systemu ubikwityna - proteasom. W związku z tym chciałbym zapytać, czy istnieje możliwość kontynuacji tych wartościowych i obiecujących badań w Katedrze Biochemii Medycznej UM, poszerzonych o badania *in vivo*?

Te drobne uwagi, a właściwie sugestie, mają charakter roboczy i nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny niniejszej dysertacji. Praca ta obrazuje bardzo dobrze przemyślany oraz zaprojektowany nowatorski projekt badawczy i stanowi bardzo dobry przykład jego samodzielnego rozwiązania, mogącego przynieść wymierne efekty poznawcze oraz praktyczne. Praca ta również pokazuje, jak duże znaczenie dla osiągnięcia sukcesu we współczesnej nauce ma doświadczenie oraz interdyscyplinarna, międzynarodowa współpraca pomiędzy ośrodkami o dużej renomie. Współpraca ta dała podwaliny (czego przykładem jest niniejsza dysertacja) dla głębszego zrozumienia biochemii systemu ubikwityna - proteasom, bezcennego z punktu proponowania nowych strategii diagnostycznych oraz terapeutycznych dla schorzeń związanych z jego nieprawidłowym funkcjonowaniem.

Pracownia Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, tel. (42) 635 44 86, fax (42) 635 44 84

Kierownik Pracowni: prof. nadzw. dr hab. Tomasz Śliwiński
tel. (42) 635 44 86, e-mail: tomsliv@biol.uni.lodz.pl



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Pracownia Genetyki Medycznej

To wieloletnie doświadczenie badawcze Promotora dysertacji Pana prof. dr. hab. Janusza Szemraja oraz talent i determinacja Doktoranta zaowocowało tym, że dysertację tę można z pełnym przekonaniem określić mianem sukcesu naukowego. Potwierdzeniem mojej tezy jest to, że wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w 2 czasopismach naukowych z listy JCR, a trzecia praca jest w trakcie recenzji.

Dodatkowym, bardzo ważnym aspektem, podkreślającym rangę przeprowadzonych badań, realizowanych w ramach pracy doktorskiej, jest ich finansowanie z grantów Unii Europejskiej Marie Curie oraz People, we współpracy z wieloma międzynarodowymi ośrodkami badawczymi.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Uwzględniając idee i koncepcje badawcze oraz warsztat praktyczny zastosowany w pracy, z przyjemnością przedkładałam do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pana mgr. Michała Chojnackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na unikatowy charakter tej dysertacji, jak również zastosowanie w niej nowatorskich technik biochemicznych, niezbędnych dla właściwego zrozumienia biochemii systemu ubikwityna – proteasom, istotnego dla wyznaczenia właściwego kierunku rozwoju diagnostyki oraz terapii chorób związanych z wadliwym funkcjonowaniem tego systemu, a także godny podziwu ogrom pracy włożonej w jej wykonanie, w tym niezwykłą staranność i dokładność, **wnioskuję o wyróżnienie** recenzowanej pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
PRACOWNI GENETYKI MEDYCZNEJ UL
dr hab. Tomasz Śliwiński, prof. nadzw. UŁ

Pracownia Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, tel. (42) 635 44 86, fax (42) 635 44 84

Kierownik Pracowni: prof. nadzw. dr hab. Tomasz Śliwiński
tel. (42) 635 44 86, e-mail: tomliw@biol.uni.lodz.pl