

AUTOREFERAT

Dr Paweł Leźnicki

Faculty of Biology, Medicine and Health
University of Manchester, UK

Manchester, Wielka Brytania, 2019

1. Imię i Nazwisko**Paweł Leźnicki****2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- listopad 2010** **stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia**
Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Wielka Brytania
(obecnie Faculty of Biology, Medicine and Health)
Promotor: Prof. Stephen High
Tytuł rozprawy doktorskiej: “The biogenesis of tail-anchored membrane proteins at the endoplasmic reticulum”
- czerwiec 2006** **tytuł magistra biotechnologii**
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)
- czerwiec 2004** **tytuł licencjata biotechnologii**
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

- wrzesień 2017** Postdoctoral Research Associate, University of Manchester,
do chwili obecnej Wielka Brytania
- styczeń 2014 -** Postdoctoral Research Assistant, MRC Protein Phosphorylation
wrzesień 2017 and Ubiquitylation Unit, University of Dundee, Wielka Brytania
- styczeń 2011 -** Postdoctoral Research Associate, University of Manchester,
grudzień 2013 Wielka Brytania

październik 2010 - Research Assistant, University of Manchester, Wielka Brytania
grudzień 2010

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcie naukowe przedłożone do oceny stanowi monotematyczny cykl czterech publikacji doświadczalnych oraz jednej pracy przeglądowej pod tytułem:

“Deubikwitynacja jako mechanizm kontroli funkcji retikulum endoplazmatycznego oraz degradacji niewłaściwie zlokalizowanych białek”.

B) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy):

1. Leźnicki, P.^{‡*}, Natarajan, J.[‡], Bader, G., Spevak, W., Schlattl, A., Rehman, S. A. A., Pathak, D., Weidlich, S., Zoephel, A., Bordone, M. C., Barbosa-Morais, N. L., Boehmelt, G. and Kulathu, Y.* (2018). Expansion of DUB functionality generated by alternative isoforms: USP35, a case study. *J Cell Sci* (DOI: 10.1242/jcs.212753).

*** współautor do korespondencji**

‡ autorzy równorzędni

(IF₂₀₁₆ = 4,431; pkt. MNiSW = 35)

2. Leźnicki, P.* and Kulathu, Y.* (2017). Mechanisms of regulation and diversification of deubiquitylating enzyme function. *J Cell Sci* 130, 1997-2006.

*** współautor do korespondencji**

(IF₂₀₁₆ = 4,431; pkt. MNiSW = 35)

3. Leźnicki, P.[‡], Korac-Prlic, J.[‡], Kliza, K., Husnjak, K., Nyathi, Y., Dikic, I. and High, S. (2015). Binding of SGTA to Rpn13 selectively modulates protein quality control. *J Cell Sci* 128, 3187-96.

‡ autorzy równorzędni

(IF₂₀₁₅ = 4,706; pkt. MNiSW = 35)

4. Leźnicki, P., Roebuck, Q. P., Wunderley, L., Clancy, A., Krysztofinska, E. M., Isaacson, R. L., Warwicker, J., Schwappach, B. and High, S. (2013). The association of BAG6 with SGTA and tail-anchored proteins. *PLoS One* 8, e59590.

(IF₂₀₁₃ = 3,534; pkt. MNiSW = 40)

5. Leźnicki, P. and High, S. (2012). SGTA antagonizes BAG6-mediated protein triage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 19214-9.

(IF₂₀₁₂ = 9,737; pkt. MNiSW = 45)

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Celem doświadczeń zaprezentowanych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było poznanie i scharakteryzowanie mechanizmów kontrolujących degradację białek błonowych i sekrecyjnych. Szczególna uwaga została poświęcona kontroli jakości białek, które w wyniku mało wydajnego transportu do retikulum endoplazmatycznego ulegają błędnemu przemieszczeniu do cytoplazmy, gdzie są niszczone. Ponadto, opisany został uprzednio niescharakteryzowany enzym deubikwitynujący, który jest białkiem błonowym retikulum endoplazmatycznego i reguluje niektóre z jego funkcji.

Większość zbędnych lub szkodliwych białek komórek eukariotycznych ulega zniszczeniu w specjalnej strukturze komórkowej zwanej proteasomem. Degradacja przeprowadzana przez proteasom jest zazwyczaj poprzedzona modyfikacją potranslacyjną białek przeznaczonych do proteolizy, tzw. ubikwitynacją. Polega ona na kowalencyjnym przyłączeniu C-końca niewielkiego polipeptydu, ubikwityny (76 reszt aminokwasowych, ~ 8,5 kDa), do (zazwyczaj) lizyn białka docelowego. Ubikwitynacja jest katalizowana przez kaskadę enzymatyczną złożoną z enzymu aktywującego ubikwitynę (E1) oraz enzymów ją przyłączających/ligujących (E2 i E3) [1]. Istotnym jest fakt, że ubikwityna posiada w swojej sekwencji siedem reszt lizyny (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63), które, podobnie jak N-koniec ubikwityny, mogą służyć jako miejsca akceptorowe dla innych cząsteczek ubikwityny. Prowadzi to do powstania łańcuchów ubikwityny (poliubikwityny), których funkcja często zależy od miejsc połączenia monomerów [2]. Przykładowo, jest bardzo dobrze udokumentowane, że łańcuchy ubikwityny połączone poprzez resztę lizyny 48 są rozpoznawane jako sygnał do zniszczenia

białka w proteasomie, podczas gdy łańcuchy połączone poprzez resztę lizyny 63 funkcjonują w szlakach przekazywania sygnałów oraz endocytozie [2].

Proteasom, w którym ulegają degradacji ubikwitynowane białka, jest złożonym kompleksem białkowym [3]. Jego część podstawowa, zwana również 20S, zbudowana jest z czterech pierścieni, z których każdy posiada siedem podjednostek (pierścienie wewnętrzne zwane beta oraz zewnętrzne alfa). Część 20S proteasomu wykazuje aktywności proteolityczne o właściwościach podobnych do kaspazy, trypsyny i chymotrypsyny. Dostęp substratu do tej części proteasomu jest regulowany przez część 19S, która może być przyłączona do 20S z jednej lub obydwu stron. W części 19S znajdują się białka odpowiedzialne za rozpoznawanie ubikwitynowanych polipeptydów oraz ich rozfałdowywanie, co jest niezbędne w celu translokacji substratu do części 20S proteasomu. Z tego też względu białka Rpn10 i Rpn13, które są receptorami ubikwityny zlokalizowanymi w części 19S [4-9], mają kluczowe znaczenie w procesie degradacji białek przez proteasom.

Ubikwitynacja białek jest procesem odwracalnym a proces deubikwitynacji jest katalizowany przez grupę enzymów ogólnie zwanymi enzymami deubikwitynującymi (ang. deubiquitinating enzymes (DUBs)). Enzymy deubikwitynujące dzieli się na sześć rodzin, z których pięć to proteazy cysteinowe (ang. ubiquitin-specific proteases (USPs), ang. ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs), ang. ovarian tumour proteases (OTUs), ang. Machado-Joseph disease proteases (MJDs), ang. MIU-containing novel DUB family (MINDY) proteases), podczas gdy jedna (ang. JAB1/MPN/Mov34 (JAMM) domain proteases) złożona jest z metaloproteinaz [10]. Funkcja większości enzymów deubikwitynujących pozostaje niedokładnie poznana; niemniej jednak fakt, że enzymy te często ulegają nadekspresji lub mutacji w chorobach takich jak transformacja nowotworowa świadczy o ich istotnym znaczeniu [11]. Potwierdzeniem tego są liczne badania, które wykazały, że enzymy deubikwitynujące regulują kluczowe funkcje komórki poprzez m. in. zapobieganie degradacji białek kontrolujących cykl komórkowy czy apoptozę. Do tych ostatnich należą tak istotne białka jak p53 czy białka z rodziny Bcl-2 [12-17]. Enzymy deubikwitynujące wchodzą również w skład części 19S proteasomu, gdzie są odpowiedzialne za deubikwitynację polipeptydów przeznaczonych do zniszczenia [18]. To z kolei pozwala na ponowne wykorzystanie ubikwityny w kolejnych cyklach ubikwitynacji jak również zapobiega degradacji białek, które uległy przedwczesnej lub błędnej ubikwitynacji.

Procesy ubikwitynacji, deubikwitynacji oraz degradacja białek przez system proteasomalny są przestrzennie ograniczone do cytoplazmy oraz jądra komórkowego. Enzymy katalizujące ubikwitynację oraz deubikwitynację występują jednak również na cytoplazmatycznej powierzchni innych organelli i reakcje te mogą tam zachodzić z dużą intensywnością. Na szczególną uwagę pod tym względem zasługuje retikulum endoplazmatyczne, będące największym organellum większości komórek, w którym syntetyzowane są białka szlaku sekrecyjnego oraz białka wydzielane do środowiska zewnątrzkomórkowego [19, 20]. Retikulum endoplazmatyczne jest również głównym miejscem biosyntezy tłuszczów oraz magazynem jonów wapnia [21, 22]. Około 30% wszystkich białek eukariotycznych kierowanych jest do retikulum endoplazmatycznego, gdzie ulegają one fałdowaniu a następnie są transportowane do innych organelli [23, 24]. Co istotne, białka, które nie osiągną odpowiedniej struktury są rozpoznawane przez czynniki kontroli jakości retikulum endoplazmatycznego, a następnie ulegają tzw. retrotranslokacji do cytoplazmy, gdzie są ubikwitynowane i niszczone w proteasomie. Proces ten zwany jest ERAD (ang. endoplasmic reticulum-associated degradation) [25].

Transport białek do wnętrza lub ich integracja w błonę retikulum endoplazmatycznego może zachodzić w sposób kotranslacyjny lub potranslacyjny, w zależności od tego czy są sprzężone z translacją na rybosomach [19, 20]. Mechanizm kotranslacyjny jest dominujący, a więc wykorzystywany przez większość białek, których miejscem docelowym są organella szlaku sekrecyjnego. W trakcie translacji tych białek kompleks rybonukleoproteinowy zwany SRP (ang. Signal Recognition Particle) rozpoznaje hydrofobowy peptyd sygnałowy lub pierwszą domenę transbłonową syntetyzowanego białka wkrótce po tym, jak segment ten opuszcza rybosom. SRP następnie dostarcza kompleks rybosom-nowosyntetyzowane białko (ang. ribosome-nascent chain complex, RNC) do receptora znajdującego się w błonie retikulum endoplazmatycznego. W kolejnym etapie kompleks rybosom-nowosyntetyzowane białko jest przenoszony do białkowego kanału w błonie retikulum endoplazmatycznego, zwanego kompleksem Sec61, przez który syntetyzowane białka dostają się do wnętrza retikulum endoplazmatycznego lub są wbudowywane w jego błonę.

Potranslacyjny transport białek do retikulum endoplazmatycznego został opisany stosunkowo niedawno i obejmuje kilka równoległych mechanizmów. W przypadku najlepiej opisanego szlaku, białka sekrecyjne i błonowe są rozpoznawane przez białko SGTA (ang. small-glutamine-rich-tetratricopeptide-repeat-containing-protein-alpha), które przekazuje takie

polipeptydy białka TRC40 za pośrednictwem kompleksu BAG6 (złożonemu z białka Bag6 i czynników pomocniczych, UBL4A i TRC35) [26-29]. TRC40 oddziałuje z receptorem złożonym z białek WRB i CAML, który jest zlokalizowany w błonie retikulum endoplazmatycznego i odpowiada za integrację przenoszonych białek w błonę retikulum endoplazmatycznego [29, 30]. Szlak ten jest wykorzystywany przez krótkie białka sekrecyjne oraz grupę białek błonowych zwanych „tail-anchored” (TA). Cechą charakterystyczną białek TA jest obecność pojedynczej domeny transbłonowej zlokalizowanej blisko C-końca, co powoduje, że w momencie terminacji translacji motyw ten jest wciąż wewnątrz kanału wyjściowego rybosomu (ang. ribosomal exit tunnel). To z kolei uniemożliwia kotranslacyjne rozpoznanie tej sekwencji przez SRP. Pomimo tego, że potranslacyjne mechanizmy kierowania białek do retikulum endoplazmatycznego są rzadziej wykorzystywane niż szlak kotranslacyjny, są one niezwykle istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Przykładowo, białka TA uczestniczą w tak ważnych procesach jak apoptoza, transport pęcherzykowy czy degradacja białek. Należy jednocześnie zaznaczyć, że wydajność zarówno kotranslacyjnego jak i potranslacyjnego transportu białek do retikulum endoplazmatycznego różni się w zależności od badanego polipeptydu i może ulec zmianie na skutek nieprawidłowego fałdowania białek, mutacji bądź przedwczesnej terminacji translacji [31]. To z kolei prowadzi do niewłaściwej lokalizacji takich białek do cytoplazmy, gdzie ze względu na swoje hydrofobowe właściwości i możliwość agregacji są one potencjalnie toksyczne dla komórki. Z tego też powodu takie niewłaściwie zlokalizowane białka (ang. mislocalised proteins, MLPs) ulegają zniszczeniu. Zaskakujące jest, że MLPs są nadal rozpoznawane przez białko Bag6, lecz w tym przypadku oddziałuje ono z ligazami ubikwityny E3 takimi jak RNF126, co stymuluje ubikwitynację MLPs i ich degradację w proteasomie [32, 33].

Podczas gdy rola białka Bag6 zarówno w potranslacyjnym transporcie białek do retikulum endoplazmatycznego jak i w degradacji MLPs została przekonywująco udokumentowana, udział innych czynników transportu potranslacyjnego w kontroli jakości MLPs był nieznany i dlatego stał się przedmiotem naszych badań (**Leźnicki and High, 2012**). Aby umożliwić badania kontroli jakości MLPs najpierw opracowany został system, który pozwalał na monitorowanie ubikwitynacji MLPs. System ten był oparty na modelowym białku TA zwanym Sec61 β , które otrzymano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym i oczyszczono metodami chromatograficznymi. Sec61 β dodane do lizatu z retikulocytów króliczych (charakteryzującego się wysoką aktywnością ubikwitynującą [34, 35] i służącym w tym

przypadku również jako źródło cytoplazmy) było wydajnie ubikwitynowane, a ilość tak zmodyfikowanego Sec61 β zależała od czasu reakcji. Lizat z retikulocytów króliczych użyty w tych doświadczeniach został uzupełniony oczyszczoną ubikwityną posiadającą znacznik FLAG na N-końcu, co znacząco ułatwiło detekcję ubikwitynowanego Sec61 β . Sec61 β nie jest normalnie MLP, jednak swoim zachowaniem powinno wiernie odwzorowywać MLP w sytuacji, gdy reakcje ubikwitynacji przeprowadzane są przy braku błon retikulum endoplazmatycznego, gdyż w takim przypadku hydrofobowa domena transbłonowa Sec61 β nie jest chroniona przez błonę tłuszczową. Założenie to zostało potwierdzone w dalszych doświadczeniach, które wykazały, że ubikwitynacja oczyszczonego Sec61 β jest w znacznym stopniu zablokowana jeśli przed rozpoczęciem reakcji ubikwitynacji lizat z retikulocytów został pozbawiony białka Bag6 poprzez użycie przeciwciał.

Mając do dyspozycji wyżej opisany system eksperymentalny możliwe było ustalenie czy ubikwitynacja MLPs jest również regulowana przez inne białka uczestniczące w potranslacyjnym transporcie białek do retikulum endoplazmatycznego. W tym celu reakcje ubikwitynacji oczyszczonego Sec61 β zostały uzupełnione rekombinowanym SGTA połączonym z HisTioredoksyną jako znacznikiem powinowactwa, oczyszczonym TRC40 lub HisTioredoksyną służącą jako białko kontrolne. Podczas gdy HisTioredoksyna oraz TRC40 nie wpłynęły na stopień ubikwitynacji Sec61 β , to egzogenne SGTA niemal całkowicie zablokowało ten proces. Co istotne, efekt ten nie był ograniczony do Sec61 β ponieważ ubikwitynacja dwóch innych oczyszczonych białek TA, RAMP4 (ang. ribosome-attached-membrane-protein-4) i synaptobrewiny-2, była również znacząco mniej wydajna w obecności egzogenne SGTA. Ponadto, SGTA (lecz nie białko kontrolne HisTioredoksyna) blokowało ubikwitynację białek błonowych wyprodukowanych *in vitro* w lizacie retikulocytów króliczych. Białka te obejmowały: Vpu (białko wirusa HIV); fragment cielej rodopsyny, której translacja została zakończona na reszcie aminokwasowej 91 (OP91); oraz 99 C-końcowych reszt aminokwasowych białka prekursorowego amyloidu (ang. amyloid precursor protein, APP) z przyłączonym do N-końca peptydem sygnałowym APP. Ten ostatni konstrukt jest używany w badaniach transportu i obróbki APP. Należy podkreślić, że SGTA nie miało wpływu na ubikwitynację białek, które nie są hydrofobowe, takich jak Ub-R-GFP i Ub-G76V-GFP [36], co z kolei pokazuje, że SGTA nie reguluje ogólnego procesu ubikwitynacji lecz działa wybiórczo na MLPs.

Zaskakujące było, że oczyszczone białko SGTA dodane do reakcji już zawierającej ubikwitynowane Sec61 β nie tylko zapobiegło dalszej ubikwitynacji tego substratu, ale również zmniejszyło ilość ubikwitynowanego Sec61 β . To sugerowało, że SGTA stymuluje deubikwitynację MLPs. Hipoteza ta została zweryfikowana poprzez przeprowadzenie reakcji ubikwitynacji Sec61 β w obecności SGTA oraz inhibitorów enzymów deubikwitynujących, aldehydu ubikwityny oraz winylsulfonu ubikwityny, które kowalencyjnie modyfikują katalityczną resztę cysteiny obecną w centrum aktywnym większości enzymów deubikwitynujących. Doświadczenia te pokazały, że zablokowanie aktywności enzymów deubikwitynujących za pośrednictwem inhibitorów niemal całkowicie hamuje rolę SGTA w zapobieganiu ubikwitynacji/stymulowaniu deubikwitynacji Sec61 β . Wydaje się wobec tego, że pomimo iż SGTA nie jest enzymem deubikwitynującym, to może pośredniczyć w oddziaływaniach między tymi enzymami a MLPs, co prowadzi do deubikwitynacji i stabilizacji MLPs.

Kolejnym krokiem było potwierdzenie wyników uzyskanych w warunkach *in vitro* również stosując bardziej fizjologiczny system jak np. kultury komórek ludzkich. W tym celu komórki HeLa zostały użyte do ekspresji dwóch wariantów polipeptydu odpowiadającego 99 C-końcowym resztom aminokwasowym APP. W pierwszym przypadku polipeptyd ten posiadał przyłączony do N-końca peptyd sygnałowy APP (APP-C99), zaś w drugim przypadku peptyd sygnałowy białka sekrecyjnego, preprolaktyny (PPL-C99). Wcześniejsze badania wykazały, że peptyd sygnałowy APP jest mało wydajny w kierowaniu białek do retikulum endoplazmatycznego, podczas gdy peptyd sygnałowy preprolaktyny zapewnia bardzo wysoki stopień transportu białek do retikulum endoplazmatycznego [31, 37]. W związku z powyższym, APP-C99 powinno zachowywać się w przybliżeniu jak MLP, w znaczącej części przekierowane do cytoplazmy, podczas gdy PPL-C99 powinno być wydajnie transportowane do retikulum endoplazmatycznego. Białka te uległy ekspresji w komórkach HeLa w obecności nadprodukowanego SGTA lub kontrolnego plazmidu, a ich poziom był monitorowany za pomocą metody Western blotting. Wyniki tych doświadczeń jednoznacznie wykazały, że SGTA znacząco stabilizuje APP-C99 lecz nie wpływa na poziom PPL-C99. To z kolei sugeruje, że w żywych komórkach SGTA działa wybiórczo na MLPs w celu ich stabilizacji.

W trakcie badań z zastosowaniem drożdżowego systemu dwuhybrydowego (ang. yeast two-hybrid system) mających na celu określenie molekularnych podstaw działania SGTA

zaobserwowano, że SGTA oddziałuje z proteasomalnym receptorem ubikwityny, Rpn13 (**Leźnicki et al., 2015**). Wynik ten został potwierdzony metodą „pull-down” w komórkach HeLa, gdzie nadprodukowano białka Rpn13 lub SGTA z przyłączonym znacznikiem do oczyszczania. W ten sam sposób udowodniono, że C-końcowa część Rpn13 (reszty aminokwasowe 150-407), która jest odmienna od regionu odpowiedzialnego za wiązanie proteasomu i ubikwityny, odpowiada za oddziaływanie z SGTA. Podobnie określono, że domena TPR (ang. tetratricopeptide repeat) SGTA jest niezbędna i wystarczająca do wiązania Rpn13. Następnie, poprzez użycie oczyszczonych rekombinowanych białek udowodniono, że oddziaływanie pomiędzy SGTA i Rpn13 jest bezpośrednie.

Ponieważ Rpn13 znajduje się w części 19S proteasomu, jego oddziaływanie z SGTA może skutkować proteasomalną lokalizacją SGTA, co zostało potwierdzone w ludzkich komórkach HEK293. Wydajne wiązanie SGTA do proteasomu wymagało użycia inhibitora proteasomu, MG132, co prowadzi do akumulacji ubikwitynowanych białek na proteasomie. W eksperymentach tych użyto zmodyfikowanej linii komórkowej (HEK293T^{Rpn11-HTBH}), w której podjednostka proteasomu, Rpn11, posiada znacznik powinowactwa, umożliwiając wyizolowanie całych proteasomów i związanych z nimi białek [38]. Co istotne, jednoczesna nadekspresja SGTA i modelowego białka MLP, OP91, prowadziła nie tylko do znacznej stabilizacji OP91, zgodnie z wcześniejszymi badaniami [39], ale skutkowała także dramatycznym wzrostem ilości OP91 związanego z proteasomem. Zaskakujące było to, że ekspresja OP91 powodowała, że znaczące ilości zarówno endo- jak i egzogenego SGTA wiązały się do proteasomu i że proces ten nie wymagał MG132. Wyniki te sugerują, że SGTA może stymulować deubikwitynację MLPs na proteasomie, przeciwdziałając w ten sposób ich degradacji nawet na końcowych etapach ich kontroli jakości.

Zakładając, że oddziaływanie pomiędzy SGTA i Rpn13 odgrywa rolę w kontroli jakości MLPs, zaburzenia tego oddziaływania powinny mieć wpływ na stabilizację MLPs zależną od SGTA. Aby stwierdzić, czy tak jest w rzeczywistości zbadano jaki jest skutek nadekspresji fragmentów Rpn13 na oddziaływanie SGTA z proteasomem i stabilizację MLPs. Wyniki tych badań jednoznacznie wykazały, że nadprodukcja C-końcowego fragmentu Rpn13 (reszty aminokwasowe 150-407), który oddziałuje z SGTA lecz nie z proteasomem, powoduje znaczące zmniejszenie ilości proteasomalnego SGTA w komórkach HEK293T^{Rpn11-HTBH} inkubowanych z MG132. Rpn13 pełnej długości oraz jego N-końcowy fragment (reszty aminokwasowe 1-150) nie miały takiego działania. Co niezwykle ważne, nadekspresja

Rpn13¹⁵⁰⁻⁴⁰⁷ również znacząco zmniejszyła ilość modelowych MLPs, OP91 i TASK⁸⁵ (fragment kanału potasowego, TASK-1), które normalnie są stabilizowane przez SGTA. Podobnie, mutacje w domenie TPR (SGTA^{K160E/R164E}), które zaburzają wiązanie Rpn13, znacząco zmniejszyły zdolność SGTA do zapobiegania degradacji OP91. Podsumowując, wyniki doświadczeń zaprezentowanych w artykule **Leźnicki et al., 2015** jasno wskazują na istotną rolę wiązania SGTA do proteasomu w procesie kontroli jakości MLPs i sugerują, że SGTA jest w stanie zapobiec degradacji MLPs nawet już po ich dostarczeniu do proteasomu. Należy jednocześnie zwrócić uwagę na możliwość występowania więcej niż jednego mechanizmu, poprzez który SGTA może stabilizować MLPs. Przykładowo, w systemie *in vitro* SGTA zapobiega ubikwitynacji oczyszczonego Sec61 β również przy braku proteasomów (**Leźnicki and High, 2012**). Podobnie, motyw TPR SGTA nie jest konieczny do stabilizacji APP-C99 w systemie komórkowym. Niezbędne są dalsze badania, aby określić czy różnice te zależą od użytego substratu oraz co określa minimalne wymagania niezbędne do stabilizacji MLPs przez SGTA.

W celu lepszego zrozumienia w jaki sposób kontrola jakości MLPs jest regulowana przez kompleks BAG6 i SGTA scharakteryzowano oddziaływanie pomiędzy tymi dwoma czynnikami oraz określono molekularne podstawy rozpoznawania hydrofobowych substratów przez białko Bag6 (**Leźnicki et al., 2013**). Oczyszczone białko SGTA oraz białka kontrolne HisTioredoksyna i BSA zostały immobilizowane na złożu i użyte do zbadania oddziaływania z fragmentami białka Bag6 uzyskanymi metodą translacji *in vitro*. To z kolei umożliwiło zbadanie która z opisanych domen białka Bag6: N-końcowa domena przypominająca ubikwitynę (ang. ubiquitin-like domain, UBL), C-końcowa domena BAG (ang. Bcl-2-associated-athanogene) czy centralny odcinek bogaty w proliny bierze udział w wiązaniu SGTA. W tym przypadku, ekstrakt z kielków pszenicy został wybrany jako system translacji *in vitro*, co pozwoliło zminimalizować potencjalny udział endogennych białek ssaczych obecnych w lizacie z retikulocytów króliczych. Wyniki doświadczeń jednoznacznie wykazały, że N-końcowa domena UBL jest niezbędna a jednocześnie wystarczająca do wiązania SGTA. Co istotne, używając tego samego podejścia eksperymentalnego udowodniono, że SGTA wiąże również domenę UBL obecną w innym komponencie kompleksu BAG6, UBL4A, oraz oddziałuje z taką domeną drożdżowego odpowiednika UBL4A, Get5. SGTA nie wiąże natomiast domen UBL białek takich jak UBL7 czy BAG1, co wskazuje na selektywność w rozpoznawaniu domen UBL przez SGTA. Porównanie sekwencji aminokwasowej różnych

domen UBL w oparciu o ich znane struktury krystaliczne wykazało, że SGTA ma preferencje do oddziaływania z tymi domenami UBL, które posiadają dodatnio naładowane reszty aminokwasowe na swojej powierzchni. Co ciekawe, mimo że SGTA jest w stanie oddziaływać z dwoma składnikami kompleksu BAG6: Bag6 i UBL4A; eksperymenty kompetycyjne wykazały, że nie jest ono w stanie wiązać jednocześnie zarówno Bag6 jak i UBL4A.

Aby poznać jak białko Bag6 rozpoznaje hydrofobowe polipeptydy powyższy system został wykorzystany ponownie, lecz tym razem białkiem immobilizowanym na złożu było oczyszczone modelowe białko błonowe, Sec61 β . Sec61 β pozbawione domeny transbłonowej zostało użyte jako białko kontrolne, nie posiadające hydrofobowego motywu, a więc nie będące substratem tego samego systemu kontroli jakości. Fragmenty białka Bag6 zostały wyprodukowane metodą translacji *in vitro* w ekstrakcie z kielków pszenicy i zbadano ich wiązanie do immobilizowanych wariantów białka Sec61 β . Doświadczenia te wykazały, że zarówno domena UBL jak i BAG są zbyteczne do rozpoznania hydrofobowego substratu, który z kolei jest wiązany przez centralny region białka Bag6, który jest bogaty w proliny. Wynik ten został potwierdzony również niezależnie w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. Ponieważ białko Bag6 posiada sygnał kierujący do jądra komórkowego (ang. nuclear localisation signal, NLS), jego ekspresja w komórkach drożdży powoduje przemieszczenie hydrofobowych białek takich jak Sed5 do jądra komórkowego [26]. Stosując takie komplementarne podejście wykazano, że domeny UBL i BAG nie są konieczne, aby białko Bag6 mogło oddziaływać z hydrofobowymi polipeptydami. Podsumowując, wyniki badań przedstawione w artykule **Leźnicki et al., 2013** przyczyniły się do lepszego zrozumienia złożonych oddziaływań w ramach systemu kontroli jakości opartego na kompleksie BAG6 i SGTA jak również pomogły w poznaniu mechanizmu rozpoznawania substratu przez kompleks BAG6.

Moja praca poświęcona degradacji MLP wskazuje na kluczową rolę enzymów deubikwitynujących w regulacji tego procesu. Enzymy deubikwitynujące cofają ubikwitynację białek i w chwili obecnej jest powszechnie akceptowane, że są związane z procesami, które prowadzą do lub są konsekwencją chorób człowieka [11]. Niemniej jednak dokładna rola większości enzymów deubikwitynujących jest enigmatyczna lub wręcz zupełnie nieznaną. Zastanawia fakt, że obecne techniki proteomiczne pozwalają na identyfikację ~20.000 – 30.000 ubikwitynowanych miejsc obecnych na tysiącach białek, a jednocześnie jest znanych zaledwie około 100 enzymów deubikwitynujących [40-42]. Nie jest jasne jak tak stosunkowo niewielka

liczba enzymów, z których niektóre są nieaktywne, jest w stanie regulować tysiące reakcji ubikwitynacji. Opierając się na opublikowanych wynikach zaproponowaliśmy, że funkcje enzymów deubikwitynujących mogą być regulowane i poszerzone poprzez ich oddziaływania z innymi białkami, modyfikacje potranslacyjne, obróbkę proteolityczną, alternatywną lokalizację w obrębie komórki oraz obecność alternatywnych izoform (**Leźnicki and Kulathu, 2017**).

W celu poznania do jakiego stopnia alternatywne izoformy poszerzają funkcje znanych enzymów deubikwitynujących skupiliśmy się na białku USP35 (**Leźnicki et al., 2018**), którego funkcja była nieznana i którego kilka izoform zostało wykrytych na poziomie mRNA. Co ważne, N-końcowe, acetylowane peptydy specyficzne dla przynajmniej dwóch takich izoform zostały wykryte metodami proteomicznymi w komórkach ludzkich, potwierdzając ich istnienie na poziomie białek [43]. USP35^{iso1} jest białkiem o długości 1018 reszt aminokwasowych, podczas gdy USP35^{iso2} nie posiada 269 N-końcowych reszt obecnych w USP35^{iso1}. W oparciu o strukturę krystaliczną blisko spokrewnionego białka, USP38, jest wysoce prawdopodobne, że N-końcowy fragment USP35^{iso1} zawiera domenę z powtórzeniami HEAT, które są motywem pośredniczącym w oddziaływaniach białko-białko. Ze względu na brak 269 N-końcowych reszt aminokwasowych występujących w USP35^{iso1}, USP35^{iso2} przypuszczalnie nie posiada domeny z powtórzeniami HEAT. Obydwie izoformy mają domenę katalityczną USP i w związku z tym powinny być aktywnymi enzymami. Krystalizacja domeny katalitycznej potwierdziła tę hipotezę i wykazała, że USP35 posiada typową domenę USP. Ponadto, dodatkowe badania biochemiczne wykazały, że USP35 jest aktywnym enzymem, który hydrolizuje polimery ubikwityny i nie wykazuje znaczącej preferencji wobec rodzaju połączenia pomiędzy monomerami ubikwityny.

W celu zbadania potencjalnych funkcji różnych izoform USP35, białka te zostały nadprodukowane ze znacznikiem GFP (ang. green fluorescent protein) w komórkach ludzkich U2OS, co umożliwiło śledzenie ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji. Badania te wykazały, że USP35^{iso1} jest w znacznej mierze białkiem cytoplazmatycznym zaś USP35^{iso2} znajduje się w retikulum endoplazmatycznym oraz kroplach lipidowych (ang. lipid droplets). Te ostatnie są wewnątrzkomórkowymi organellami pochodzącymi z retikulum endoplazmatycznego i służą jako główny magazyn tłuszczów obojętnych, takich jak triglicerydy i estry cholesterolu [44]. Analiza biochemiczna (np. ochrona przed proteolizą – ang. protease protection) wykazała, że USP35^{iso2} jest białkiem transbłonowym retikulum endoplazmatycznego. Czynn

to z USP35^{iso2} drugi, obok USP19 [45], transbłonowy enzym deubikwitynujący retikulum endoplazmatycznego i jednocześnie pierwszy taki enzym, który znajduje się na kroplach lipidowych. Wyniki te, uzyskane początkowo z użyciem nadprodukowanych białek, zostały następnie potwierdzone w ludzkiej linii komórkowej raka trzustki, HPAF-II, również na poziomie białka endogennego. Na podstawie analizy bioinformatycznej i biochemicznej określono, że rejon transbłonowy USP35^{iso2} jest przypuszczalnie utworzony przez reszty aminokwasowe 317-337 (numeracja w oparciu o USP35^{iso1}). Topologia takiego białka sugeruje, że jego krótki N-koniec znajduje się wewnątrz retikulum endoplazmatycznego, zaś część C-końcowa, wliczając domenę katalityczną, jest zlokalizowana w cytoplazmie. Co ciekawe, ten sam motyw transbłonowy jest obecny także w USP35^{iso1}, mimo że białko to nie występuje w retikulum endoplazmatycznym. Wyniki naszych badań sugerują, że jest to najprawdopodobniej spowodowane obecnością powtórzeń HEAT w USP35^{iso1}.

Dalsze eksperymenty wykazały, że zgodnie z różną lokalizacją wewnątrzkomórkową, izoformy USP35 pełnią również odmienne funkcje. Nadekspresja USP35^{iso2} powoduje stres w retikulum endoplazmatycznym (ang. ER stress), który wydaje się być spowodowany zaburzeniami biosyntezy cholesterolu, ponieważ jest blokowany przez statyny, inhibitory enzymu limitującego szlak biosyntezy cholesterolu. Jest to również zgodne z lokalizacją USP35^{iso2} w retikulum endoplazmatycznym i w kroplach lipidowych. Zwiększony poziom USP35^{iso2} prowadzi również do apoptozy, która nie jest hamowana przez statyny, co sugeruje, że stres retikulum endoplazmatycznego i apoptoza wywołane przez nadprodukcję USP35^{iso2} przypuszczalnie nie są ze sobą powiązane. W przeciwieństwie do USP35^{iso2}, nadekspresja USP35^{iso1} nie powoduje stresu w retikulum endoplazmatycznym ani nie skutkuje śmiercią komórkową. Zaskakujące jest, że chroni raczej komórki przed apoptozą wywołaną przez TRAIL (ang. tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand) i efekt ten wymaga aktywności katalitycznej USP35^{iso1}. Sugeruje to z kolei, że USP35^{iso1} jest nowym czynnikiem antyapoptotycznym. Twierdzenie to znalazło potwierdzenie w dalszych doświadczeniach, w których wykazano, że komórki HEK293 FlpIn (gdzie USP35^{iso1} jest główną, jeśli nie jedyną, izoformą USP35), w których USP35 zostało usunięte metodą CRISPR/Cas9 są znacząco bardziej podatne na apoptozę wywołaną przez TRAIL czy staurosporynę. Jest to również zgodne z sugerowaną rolą odpowiednika USP35 w *D. melanogaster*, zwanego DUBAI, któremu przypisano antyapoptotyczną funkcję [46]. Ponadto, tak jak wiele innych białek antyapoptotycznych USP35 jest hydrolizowane przez kaspazę-3 i/lub -6 podczas apoptozy wywołanej przez staurosporynę. Wszystkie te wyniki jednoznacznie pokazują, że alternatywne

izoformy mogą w znaczącym stopniu przyczyniać się do poszerzenia funkcji enzymów deubikwitynujących.

Podsumowując, moja podoktorska praca badawcza, której wyniki zostały opisane w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zaowocowała następującymi ważnymi odkryciami:

- identyfikacją SGTA jako nowego czynnika, który stabilizuje MLPs
- wykazaniem, że rola SGTA w regulacji MLPs wynika z działania enzymów deubikwitynujących
- wykazaniem, że cykl kontroli jakości MLPs, który jest oparty o białka Bag6 i SGTA może zachodzić na proteasomie
- scharakteryzowaniem oddziaływania pomiędzy SGTA a Bag6 i UBL4A, oraz pomiędzy Bag6 i białkami hydrofobowymi
- identyfikacją USP35^{iso1} jako nowego czynnika antyapoptotycznego
- wykazaniem, że USP35^{iso2} jest nowym białkiem transbłonowym retikulum endoplazmatycznego oraz pierwszym enzymem deubikwitynującym, który jest zlokalizowany na kroplach lipidowych
- powiązaniem USP35^{iso2} z regulacją śmierci komórkowej i homeostazy tłuszczów w retikulum endoplazmatycznym

Jestem przekonany, że wyniki mojej pracy przyczyniły się do znaczącego pogłębienia naszej wiedzy na temat procesów biogenezy i degradacji białek. Moim celem jest dalsza praca badawcza mająca na celu określenie jak enzymy deubikwitynujące wpływają na proces kontroli jakości białek oraz w jaki sposób regulują funkcje tak ważnych organeli wewnątrzkomórkowych jak retikulum endoplazmatyczne i krople lipidowe.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W 2004 roku ukończyłem studia licencjackie na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego). Tematem mojej pracy licencjackiej była agregacja białek, w szczególności tych powiązanych z chorobami człowieka takimi jak np. choroba Alzheimera. Wiedzę, którą zdobyłem w trakcie przygotowywania pracy

licencjackiej wykorzystałem następnie w celu opublikowania artykułu przeglądowego na temat agregacji i toksyczności białek posiadających liczne powtórzenia poliglutaminowe (polyQ) (**Leźnicki, 2005, IID-1, Załącznik 4**). Niepoprawne fałdowanie i agregacja tych białek są przyczyną śmiertelnych chorób takich jak choroba Huntingtona czy niektóre z form ataksji rdzeniowo-mózdkowej. Po ukończeniu studiów licencjackich, a w trakcie studiów magisterskich na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) kontynuowałem pracę nad agregacją białek w grupie badawczej Prof. Krzysztofa Liberka. Moim celem było określenie wpływu związku chemicznego, chlorowodoru guanidyny, na aktywność bakteryjnych i drożdżowych białek opiekuńczych z rodziny Hsp100. Białka te przeprowadzają deagregację agregatów białkowych oraz regulują dziedziczenie prionów w komórkach drożdży [47]. Wcześniejsze badania wykazały, że chlorowodorek guanidyny hamuje aktywność ATPazową białka Hsp104 (białka opiekuńczego Hsp100 *S. cerevisiae*) [48] oraz potrafi „wyleczyć” drożdże z prionów [49]. Z tego powodu zbadano wpływ chlorowodoru guanidyny na aktywność deagregacyjną białka Hsp104 i jego bakteryjnego homologa, ClpB. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że chlorowodorek guanidyny hamuje aktywność deagregacyjną zarówno Hsp104, jak i ClpB, pomimo że ma przeciwny wpływ na ich aktywności ATPazowe (**Nowicki et al., 2012, IIA-4, Załącznik 4**). Chlorowodorek guanidyny hamuje aktywność ATPazową Hsp104 lecz stymuluje tę aktywność w ClpB, i w obydwu przypadkach wydaje się stabilizować oligomeryczną formę białek opiekuńczych z rodziny Hsp100.

Po ukończeniu studiów magisterskich w 2006 roku moja dalsza praca naukowa prowadzona była w ramach studiów doktoranckich na Uniwersytecie w Manchesterze w Wielkiej Brytanii, w grupie Prof. Stephen’a High’a. Szczególna uwaga została poświęcona udziałowi białek opiekuńczych w potranslacyjnym dostarczaniu do retikulum endoplazmatycznego grupy białek błonowych zwanych „tail-anchored” (TA). Stosując system translacji *in vitro* wykazano bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy białkami TA oraz białkami opiekuńczymi z rodzin Hsp70 i Hsp40 (**Abell et al., 2007, IIA-8, Załącznik 4**). Ponadto, kombinacja oczyszczonych białek Hsp70 i Hsp40, które współdziałają ze sobą w procesie fałdowania białek, wydajnie stymulowała *in vitro* integrację białek TA w błonę retikulum endoplazmatycznego.

Wkrótce po opublikowaniu powyższych wyników prace w grupie Ramanujana Hegde (Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Wielka Brytania) doprowadziły do odkrycia

białka TRC40 (ang. „transmembrane domain recognition complex of 40 kDa”), którego główną funkcją jest pośredniczenie w potranslacyjnym transporcie białek do retikulum endoplazmatycznego [29]. Był to znaczący krok ku lepszemu zrozumieniu mechanizmów potranslacyjnego dostarczania białek do retikulum endoplazmatycznego choć molekularne podstawy działania TRC40 były nieznane. W celu ich lepszego poznania przeprowadziliśmy serię doświadczeń opartych na użyciu rekombinowanych oczyszczonych białek TA. Białka te zostały wykorzystane w doświadczeniach typu „pull-down” połączonych ze spektrometrią mas, co pozwoliło na identyfikację wielu nowych partnerów wiążących białka TA, wliczając w to białka Bag6 i SGTA (**Leźnicki et al., 2010, IIA-7, Załącznik 4**). Kolejne eksperymenty wykazały kluczową rolę białka Bag6 w dostarczaniu białek TA do retikulum endoplazmatycznego i pozwoliły na postawienie hipotezy, że Bag6 pośredniczy w tworzeniu produktywnego kompleksu pomiędzy TRC40 a białkami TA (**Leźnicki et al., 2010, IIA-7, Załącznik 4**). Hipoteza ta została następnie potwierdzona przez grupę Ramanujana Hegde, w kolejnym artykule opublikowanym przez tych badaczy, w którym wykazano, że Bag6 oraz dwa oddziałujące białka, UBL4A i TRC35, stymulują transfer białek TA do TRC40 [27]. Nasze dalsze badania we współpracy z Prof. Richardem Zimmermannem (Uniwersytet Saarland, Homburg, Niemcy) doprowadziły do odkrycia, że transport białek TA do błony retikulum endoplazmatycznego może być hamowany poprzez ich oddziaływanie z kalmoduliną (**Hassdenteufel et al., 2011, IIA-5, Załącznik 4**). Wykazały one także, że szlak TRC40 jest również wykorzystywany przez krótkie białka sekrecyjne, które ze względu na swoją niewielką długość podlegają potranslacyjnemu transportowi do wnętrza retikulum endoplazmatycznego (**Johnson et al., 2012, IIA-3, Załącznik 4**).

Proces, w wyniku którego białka TA osiągają błonę retikulum endoplazmatycznego można podzielić na dwa etapy: kierowanie z cytoplazmy do błony retikulum endoplazmatycznego i wbudowywanie domeny transbłonowej w tę błonę. Odkrycie roli białek Hsp70/40, TRC40 oraz Bag6 znacząco przybliżyło nas do poznania pierwszego z tych etapów. Molekularne podstawy drugiego etapu pozostawały jednak poznane zaledwie w niewielkim stopniu. Teoretycznie, do integracji w błonę retikulum endoplazmatycznego może dochodzić poprzez spontaniczną dyfuzję hydrofobowej domeny transbłonowej, w czym pośredniczyłyby oddziaływania hydrofobowe. Alternatywnym mechanizmem byłby udział białkowego kanału podobnego do kompleksu Sec61, który pośredniczy w kotranslacyjnym transporcie białek do retikulum endoplazmatycznego. Te dwie możliwości zostały zweryfikowane eksperymentalnie poprzez użycie oczyszczonych białek TA, w tym przypadku Sec61 β i cytochromu b5 (Cytb5)

(Leźnicki et al., 2011, IIA-6, Załącznik 4). Warianty tych białek posiadające jedną resztę cysteiny zostały oczyszczone i zmodyfikowane z użyciem związków reagujących z grupą sulfhydrylową cysteiny. Zaskoczeniem było, że tak zmodyfikowane białka wciąż były wydajnie dostarczane do i wbudowywane w błonę retikulum endoplazmatycznego nawet w sytuacji, gdy modyfikowana reszta cysteiny znajdowała się blisko środka domeny transbłonowej i została zmodyfikowana dużymi, hydrofilowymi odczynnikami takimi jak glikol polietylenowy (PEG)-5000 i -20000. Podobne wyniki uzyskano, gdy białka TA uległy homodimeryzacji wymuszonej przez użycie czynników sieciujących. W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ umiejscowienia PEG-5000 w obrębie domeny transbłonowej Sec61 β na integrację tego białka w błonę retikulum endoplazmatycznego. Eksperymenty te pokazały, że przyłączenie PEG-5000 bliżej końca Sec61 β zlokalizowanego wewnątrz retikulum endoplazmatycznego całkowicie blokuje integrację błonową Sec61 β zaś efekt ten nie jest obserwowany jeśli PEG-5000 jest umiejscowiony bliżej końca cytoplazmatycznego. Co ważne, wszystkie te białka wiązały TRC40, co pozwala wykluczyć defekt na etapie transportu z cytoplazmy do błony retikulum endoplazmatycznego. Sugeruje to natomiast, że wspomniane modyfikacje chemiczne Sec61 β blokują proces wbudowywania Sec61 β w błonę retikulum endoplazmatycznego. Analiza bioinformatyczna wskazała następnie, że uzyskane wyniki doświadczalne są całkowicie zgodne z obliczonym kosztem energetycznym, który byłby poniesiony w trakcie translokacji PEG-5000 do lub poprzez dwuwarstwę lipidową o składzie przypominającym retikulum endoplazmatyczne. Powyższe dane sugerują model, w którym rolą receptora dla TRC40 jest najprawdopodobniej umiejscowienie białek TA blisko błony retikulum endoplazmatycznego. Sam etap integracji natomiast jest podyktowany zasadami termodynamiki i dyfuzją do środowiska hydrofobowego, i w związku z tym nie wymaga specjalnego kanału w błonie retikulum endoplazmatycznego.

Praca, którą wykonałem w trakcie studiów doktoranckich zaowocowała odkryciem i scharakteryzowaniem nowych białek, które regulują biogenezę ssaczych białek TA. Wyniki uzyskane w tym czasie stanowiły podstawę dla mojej dalszej, choć tematycznie odrębnej, pracy nad kontrolą jakości białek MLP i deubikwitynacją. Poza wynikami zaprezentowanymi w sekcji „Osiągnięcie naukowe” zbadano również wewnątrzkomórkowe konsekwencje stabilizacji MLPs zależnej od SGTA. Zaskakujące było, że koekspresja SGTA i modelowych białek MLP, OP91 i TASK⁸⁵, w ludzkich komórkach HeLa prowadzi do agregacji białek MLP (Wunderley et al., 2014, IIA-1, Załącznik 4). Agregaty te zawierają SGTA, Bag6,

ubikwitynę, białka proteasomalne oraz białka opiekuńcze z rodziny Hsp70 a ich powstawanie najprawdopodobniej jest konsekwencją stabilizacji białek MLP przez SGTA, które agregują na skutek ich znacznej hydrofobowości. Sugeruje to również, że cykl kontroli jakości przeprowadzany przez Bag6 i SGTA może również wpływać na inne białka o znacznej tendencji do agregacji, takie jak np. huntingtyna, α -synukleina oraz inne białka będące przyczyną chorób neurodegeneracyjnych. Ponadto, używając metod biofizycznych takich jak np. spektroskopia NMR (ang. nuclear magnetic resonance) zdefiniowano na poziomie molekularnym oddziaływanie pomiędzy SGTA i domenami UBL Bag6 i UBL4A (**Darby et al., 2014, IIA-2, Załącznik 4**). Doświadczenia te pozwoliły również na zrozumienie, dlaczego wiązanie tych domen do SGTA nie może zachodzić jednocześnie, lecz wyklucza się wzajemnie.

Podsumowując, moje badania naukowe, które zostały przedstawione w tym podrozdziale, znacząco przyczyniły się do lepszego zrozumienia procesów agregacji i fałdowania białek oraz biogenezy białek retikulum endoplazmatycznego.

29/01/2019 Paweł Leźnicki

Bibliografia

1. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.
2. Yau, R., and Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nature cell biology* 18, 579-586.
3. Tomko, R.J., Jr., and Hochstrasser, M. (2013). Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual review of biochemistry* 82, 415-445.
4. Hamazaki, J., Iemura, S., Natsume, T., Yashiroda, H., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). A novel proteasome interacting protein recruits the deubiquitinating enzyme UCH37 to 26S proteasomes. *The EMBO journal* 25, 4524-4536.
5. Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., and Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453, 481-488.
6. Jorgensen, J.P., Lauridsen, A.M., Kristensen, P., Dissing, K., Johnsen, A.H., Hendil, K.B., and Hartmann-Petersen, R. (2006). Adrm1, a putative cell adhesion regulating protein, is a novel proteasome-associated factor. *Journal of molecular biology* 360, 1043-1052.
7. Qiu, X.B., Ouyang, S.Y., Li, C.J., Miao, S., Wang, L., and Goldberg, A.L. (2006). hRpn13/ADRM1/GP110 is a novel proteasome subunit that binds the deubiquitinating enzyme, UCH37. *The EMBO journal* 25, 5742-5753.
8. van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., and Vierstra, R.D. (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Molecular and cellular biology* 16, 6020-6028.
9. Yao, T., Song, L., Xu, W., DeMartino, G.N., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Cohen, R.E. (2006). Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nature cell biology* 8, 994-1002.
10. Wilkinson, K.D. (2009). DUBs at a glance. *Journal of cell science* 122, 2325-2329.
11. Heideker, J., and Wertz, I.E. (2015). DUBs, the regulation of cell identity and disease. *The Biochemical journal* 465, 1-26.
12. Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., and Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648-653.
13. Liu, H., Li, X., Ning, G., Zhu, S., Ma, X., Liu, X., Liu, C., Huang, M., Schmitt, I., Wullner, U., et al. (2016). The Machado-Joseph Disease Deubiquitinase Ataxin-3 Regulates the Stability and Apoptotic Function of p53. *PLoS biology* 14, e2000733.
14. Piao, S., Pei, H.Z., Huang, B., and Baek, S.H. (2017). Ovarian tumor domain-containing protein 1 deubiquitinates and stabilizes p53. *Cellular signalling* 33, 22-29.
15. Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., et al. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103-107.
16. Weber, A., Heinlein, M., Dengjel, J., Alber, C., Singh, P.K., and Hacker, G. (2016). The deubiquitinase Usp27x stabilizes the BH3-only protein Bim and enhances apoptosis. *EMBO reports* 17, 724-738.
17. Yuan, J., Luo, K., Zhang, L., Cheville, J.C., and Lou, Z. (2010). USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. *Cell* 140, 384-396.
18. D'Arcy, P., and Linder, S. (2012). Proteasome deubiquitinases as novel targets for cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 1729-1738.
19. Aviram, N., and Schuldiner, M. (2017). Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *Journal of cell science* 130, 4079-4085.
20. Shao, S., and Hegde, R.S. (2011). Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 25-56.
21. Jacquemyn, J., Cascalho, A., and Goodchild, R.E. (2017). The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO reports* 18, 1905-1921.
22. Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J.B., De Smedt, H., and Missiaen, L. (2011). Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
23. Chen, Y., Zhang, Y., Yin, Y., Gao, G., Li, S., Jiang, Y., Gu, X., and Luo, J. (2005). SPD--a web-based secreted protein database. *Nucleic acids research* 33, D169-173.
24. Wallin, E., and von Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society* 7, 1029-1038.

25. Olzmann, J.A., Kopito, R.R., and Christianson, J.C. (2013). The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
26. Leźnicki, P., Clancy, A., Schwappach, B., and High, S. (2010). Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins. *Journal of cell science* 123, 2170-2178.
27. Mariappan, M., Li, X., Stefanovic, S., Sharma, A., Mateja, A., Keenan, R.J., and Hegde, R.S. (2010). A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* 466, 1120-1124.
28. Shao, S., Rodrigo-Brenni, M.C., Kivlen, M.H., and Hegde, R.S. (2017). Mechanistic basis for a molecular triage reaction. *Science (New York, N.Y.)* 355, 298-302.
29. Stefanovic, S., and Hegde, R.S. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128, 1147-1159.
30. Vilardi, F., Stephan, M., Clancy, A., Janshoff, A., and Schwappach, B. (2014). WRB and CAML are necessary and sufficient to mediate tail-anchored protein targeting to the ER membrane. *PloS one* 9, e85033.
31. Levine, C.G., Mitra, D., Sharma, A., Smith, C.L., and Hegde, R.S. (2005). The efficiency of protein compartmentalization into the secretory pathway. *Molecular biology of the cell* 16, 279-291.
32. Hessa, T., Sharma, A., Mariappan, M., Eshleman, H.D., Gutierrez, E., and Hegde, R.S. (2011). Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature* 475, 394-397.
33. Rodrigo-Brenni, M.C., Gutierrez, E., and Hegde, R.S. (2014). Cytosolic quality control of mislocalized proteins requires RNF126 recruitment to Bag6. *Molecular cell* 55, 227-237.
34. Carlson, E., Bays, N., David, L., and Skach, W.R. (2005). Reticulocyte lysate as a model system to study endoplasmic reticulum membrane protein degradation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 301, 185-205.
35. Mayer, A., Gropper, R., Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (1989). Purification, characterization, and rapid inactivation of thermolabile ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *The Journal of biological chemistry* 264, 2060-2068.
36. Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M., and Masucci, M.G. (2000). Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nature biotechnology* 18, 538-543.
37. Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Robin, M.A., and Avadhani, N.G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *The Journal of cell biology* 161, 41-54.
38. Wang, X., Chen, C.F., Baker, P.R., Chen, P.L., Kaiser, P., and Huang, L. (2007). Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex. *Biochemistry* 46, 3553-3565.
39. Wunderley, L., Leźnicki, P., Payapilly, A., and High, S. (2014). SGTA regulates the cytosolic quality control of hydrophobic substrates. *Journal of cell science* 127, 4728-4739.
40. Clague, M.J., Heride, C., and Urbe, S. (2015). The demographics of the ubiquitin system. *Trends in cell biology* 25, 417-426.
41. Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., et al. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular cell* 44, 325-340.
42. Udeshi, N.D., Svinkina, T., Mertins, P., Kuhn, E., Mani, D.R., Qiao, J.W., and Carr, S.A. (2013). Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-epsilon-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12, 825-831.
43. Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Gholami, A.M., Lieberenz, M., Savitski, M.M., Ziegler, E., Butzmann, L., Gessulat, S., Marx, H., et al. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* 509, 582-587.
44. Welte, M.A. (2015). Expanding roles for lipid droplets. *Current biology : CB* 25, R470-481.
45. Hassink, G.C., Zhao, B., Sompallae, R., Altun, M., Gastaldello, S., Zinin, N.V., Masucci, M.G., and Lindsten, K. (2009). The ER-resident ubiquitin-specific protease 19 participates in the UPR and rescues ERAD substrates. *EMBO reports* 10, 755-761.
46. Yang, C.S., Sinenko, S.A., Thomenius, M.J., Robeson, A.C., Freel, C.D., Horn, S.R., and Kornbluth, S. (2014). The deubiquitinating enzyme DUBA1 stabilizes DIAP1 to suppress Drosophila apoptosis. *Cell death and differentiation* 21, 604-611.
47. Liberek, K., Lewandowska, A., and Zietkiewicz, S. (2008). Chaperones in control of protein disaggregation. *The EMBO journal* 27, 328-335.
48. Grimminger, V., Richter, K., Imhof, A., Buchner, J., and Walter, S. (2004). The prion curing agent guanidinium chloride specifically inhibits ATP hydrolysis by Hsp104. *The Journal of biological chemistry* 279, 7378-7383.

49. Tuite, M.F., Mundy, C.R., and Cox, B.S. (1981). Agents that cause a high frequency of genetic change from [psi+] to [psi-] in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 98, 691-711.