

Łukasz Piotr Biały

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Centrum Biostruktury

I Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny

AUTOREFERAT

Warszawa, 2018

1. Imię i nazwisko: Łukasz Biały

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

1995-2001 studia na I Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
Dyplom lekarza nr: L 16673/31512/01

W tym:

1997-2001 członek Koła Naukowego przy Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii pod opieką naukową Prof. Jana Rowińskiego (prace nad mysim modelem dystrofii mięśniowej i histofizjologią tkanki łącznej) a od 1999 pod opieką dr. Cezarego Wójcika (prace w dziedzinie proteolizy przez proteasomy)

2002: **Prawo Wykonywania Zawodu Lekarza:** Okręgowa Izba Lekarska im. Jana Nielubowicza w Warszawie (nr 5458077)

2007 **Stopień naukowy doktor nauk medycznych (w dyscyplinie: medycyna),**
nadany przez :
Radę Naukową Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie,
na podstawie rozprawy doktorskiej pt.:
The effect of interferon gamma on turn-over of ubiquitinylated proteins
Promotor: Prof. dr hab. Peter Michael Kloetzel ;

2018 **Tytuł zawodowy:**
Specjalista medycyny rodzinnej
Opiekun specjalizacji: Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Życińska

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2001-2002 – Centralny Szpital Kliniczny AM Warszawa - staż podyplomowy

2001-2006 Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie, asystent
W tym:

2003-2006 Instytut Biochemii Charité - Humboldt Universitaet Berlin: doktorant,
stypendysta

od 2006 Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
adiunkt

2013-2018 – Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny WUM, Warszawa:
szkolenie specjalizacyjne z medycyny rodzinnej

Staż zagraniczne

2003-2006 Staż naukowy w Instytucie Biochemii Charité w Berlinie (Humboldt
Univestiteat zu Berlin) w ramach stypendium KAAD (Katolischer
Akademischer Auslander Dienst) DKG (Deutsche Krebs Gesellschaft) i
Charité

Dyrektor Instytutu: Prof. Dr rer. nat. Peter Michalel Kloezel

Kierownik stażu naukowego i Prof. Dr. med. Ulrike Seifert

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Badanie udziału pozalizosomalnych układów proteolitycznych w utrzymaniu homeostazy białek w komórkach

a) (autor/autorzy, tytuł./tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1H. Seifert U, **Biały LP**, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Krüger E.

Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress
Cell. 2010 Aug 20;142(4):613-24.

IF 32,406 pkt 40

2H. **Biały LP**, Kuckelkorn U, Henklein P, Fayet J, Wilczyński GM, Kamiński A and Mlynarczuk-Biały I

Changes in spatio-temporal localization of tripeptidyl peptidase II (TPPII) in murine colon adenocarcinoma cells during aggresome formation: a microscopy study based on a novel fluorescent proteasome inhibitor

Histology and Histopathology 2018: DOI: 10.14670/HH-18-042

IF 2,015 pkt 25

3H. **Biały LP** Fayet J, Wilczynski GM and Mlynarczuk-Biały I

Semispecific TPPII inhibitor Ala-Ala-Phe-chloromethylketone (AAF-cmk) displays cytotoxic activity by induction of apoptosis, autophagy and protein aggregation in U937 cells

Folia Histochemica et Cytobiologica 2018 (4) DOI: 10.5603/FHC.a2018.0020

IF 1,586 pkt 15,

H4. **Biały LP**, Zaręba Ł, Mlynarczuk-Biały I

Detection of newly synthesized proteins in cancer cells: A practical approach

Review and Research on Cancer Treatment 2018; 4(1): 13-22 ISSN 2544-2147

RAZEM (prac na osiągnięcie habilitacyjne) IF: 36.007: MNiSW: 80

b) Omówienie celów naukowych ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Głównym celem prac składających się na przedstawiane osiągnięcie naukowe było zbadanie i charakterystyka udziału pozalizosomalnych układów proteolitycznych w utrzymaniu homeostazy białek w komórkach. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły specyficznych agregatów poliubikwitynowanych białek zlokalizowanych w cytoplazmie komórek. Agregaty te zawierają głównie nowo-syntetyzowane białka frakcji DRiP (Deffective Ribosomal Products), czyli białek o ekstremalnie krótkim czasie życia, powodowanym prawdopodobnie błędami w obróbce potranslacyjnej. Agregaty takie określane są jako agresomy i/lub Aggresome- Like Structures (ALIS). Przedmiotem moich badań była także dynamika ich powstawania i rozkładu w komórkach jak również metody ich detekcji.

W tym kontekście badałem następujące procesy: syntezy i agregacji białek, a także ubikwitynacji oraz degradacji białek przez dwa główne pozalizosomalne układy proteolityczne, czyli układ ubikwityna - proteasom (UPS) oraz trójpeptydylopeptydazę drugą (TPPII).

Najważniejszymi odkryciami moich z badań są:

1. Wykazanie, że w warunkach imitujących stan zapalny dochodzi do przejściowej agregacji białek w formie Aggresome Like Structures (ALIS) w różnych typach komórek;

2. Udowodnienie, że mechanizmem tej agregacji jest stymulacja ubikwitynacji oraz zwiększanie syntezy białek frakcji DRiP przez interferon-gamma;
3. Ukazanie, że spadek ilości agregatów białkowych ściśle koreluje z indukcją immunoproteasomu;
4. Wykazanie, że trójpeptydylopeptydaza druga (TPPII) jest rekrutowana w skład agresomów zawierających nowo-syntetyzowane białka w komórkach mysiego gruczołakoraka okrężnicy C26;
5. Opisanie dynamiki tworzenia agresomów w komórkach C26 i rekrutacji do nich TPPII a także opisanie struktury tych agresomów, które w komórkach C26 składają się z gęstego rdzenia zawierającego proteasomy i poliubikwitynowane białka oraz płaszczu zawierającego TPPII;
6. Opisanie nowego typu agregatów białkowych Aggresome Like Structures Not Associated with ER (**ALISNER**) powstających w pod wpływem semi-specyficznego inhibitora trójpeptydylopeptydazy drugiej (AAF-cmk) w komórkach ludzkiej białaczki monocytarnej linii U937;
7. Wykazanie, że AAF-cmk wykazuje efekt cytostatyczny/cytotoksyczny wobec komórek linii U937, który zależy od jednoczesnej indukcji apoptozy (w mechanizmie wewnątrzpochodnym) oraz autofagii w tych komórkach;
8. Opracowanie i standaryzacja nowej metody cytochemicznej: przyżyciowego znakowania proteasomu z wykorzystaniem fluorescencyjnie zmodyfikowanego inhibitora BSc2118;
9. Adaptacja wyżej opisanej metody do szybkiej jednostopniowej wizualizacji agresomów w komórkach i jej przystosowanie do połączenia z klasyczną immunocytochemią pośrednią w mikroskopii konfokalnej;
10. Adaptacja nieradioaktywnej metody znakowania syntetyzowanych białek techniką Klik-IT do celów wizualizacji agresomów w mikroskopii konfokalnej.

Stan wiedzy przed rozpoczęciem badań:

Układ Ubikwityna-Proteasom (UPS) w procesie degradacji nowo-syntetyzowanych białek

Układ Ubikwityna-Proteasom jest konserwatywnym ewolucyjnie układem proteolitycznym rozkładającym większość białek w komórkach. Składa się on z: 1) kaskady enzymów (E1, E2, E3) przeprowadzających ubikwitynację białka przeznaczonego do degradacji poprzez dodanie do niego łańcucha składającego się z wielu cząsteczek ubikwityny oraz 2) proteasomu pełniącego funkcję kompleksu proteolitycznego rozkładającego białko na oligopeptydy. Ubikwityna jest 76-aminokwasowym polipeptydem, który jest kowalencyjnie przyłączony do substratu białkowego w postaci łańcucha poliubikwitynowanego służącego jako sygnał do degradacji.

W procesie ubikwitynacji cząsteczka ubikwityny jest aktywowana w sposób zależy od ATP przez enzym aktywujący ubikwitynę (E1), a następnie przeniesiona na enzym koniugujący ubikwitynę (E2). W końcowej fazie ligaza ubikwityny (enzym E3) katalizuje sprzężanie ubikwityny z docelowym białkiem. W obrębie cząsteczki ubikwityny znajduje się 7 wewnętrznych reszt lizynowych, z których każda może być użyta do wiązania kolejnej cząsteczki ubikwityny i utworzenia łańcucha. Tylko łańcuch połączony przez lizynę 48 (łańcuch K48) służy, jako sygnał do degradacji białka przez proteasomy.

Proteasom jest kompleksem enzymatycznym złożonym z rdzenia 20S i dwóch cząsteczek regulatorowych 19S, tworzących razem kompleks proteasomu 26S. Proteasom 20S utworzony jest z podjednostek ułożonych w cztery heptameryczne pierścienie tworzące centralny cylinder z komorą katalityczną o trzech głównych aktywnościach enzymatycznych: chymotrypsyno-podobnej, trypsyno-podobnej i kaspazopodobnej przypisanych do podjednostek $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$.

Jednostki regulatorowe 19S rozpoznają poliubikwitynowane białko, które jest przeznaczone do degradacji. Rdzeń proteasomu 20S wykazuje dodatkowo zdolność

do degradacji niesfałdowanych łańcuchów białkowych bez uprzedniej poliubikwitynacji.

W warunkach stanu zapalnego interferon-gamma stymuluje powstanie immunoproteasomu poprzez aktywację ekspresji immuno-podjednostek ($\beta 1i$, $\beta 2i$ i $\beta 5i$) które zastępują w rdzeniu 20S konstytutywne ($\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 5$). Dodatkowo interferon-gamma stymuluje ekspresję alternatywnej podjednostki regulatorowej PA28. Immunoproteasom jest wyspecjalizowany do generowania peptydów antygenowych prezentowanych przez cząsteczki MHC klasy I oraz został on filogenetycznie zaadoptowany przez komórki do walki z infekcjami wirusowymi.

Nowo-syntezowane białka i Defective Ribosomal Products

Od lat 70. XX wieku na podstawie kinetyki degradacji białka komórkowe dzieli się na dwie główne grupy: "krótko-żyjące/short-lived" (z szybką degradacją) i "długo-żyjące/long-lived" (o znacznie wolniejszej szybkości degradacji). Obie kinetyki degradacji rozdzielono przez wyraźną nieliniowość krzywych procesu rozkładu. Wyodrębnione na tej podstawie dwie grupy białek zidentyfikowano we wszystkich komórkach. Ponadto niedawno, wśród białek krótko żyjących, wyróżniono dodatkową frakcję o ekstremalnie krótkim czasie życia. Badania wykazały, że 30% nowo syntetyzowanych białek w komórkach jest eliminowanych z okresem półtrwania $T_{1/2} < 10$ minut, co doprowadziło do nazwania tej części skrajnie krótko-żyjących białek Defective Ribosomal Products (DRiP) czyli wadliwe produkty rybosomalne lub Rapidly Degraded Proteins (RDP) czyli gwałtownie degradowane białka. Nazwa DRiP sugeruje, że białka te są wadliwe na skutek błędów pojawiających się przy translacji i w procesie obróbki potranslacyjnej. Nieprawidłowości te powodują, że białka DRiP nigdy nie osiągają swojej natywnej struktury i są degradowane w sposób ko-translacyjny. Istnienie tej frakcji białek jest bezspornym faktem, jednak nie udowodniono dokładnie, jakie błędy w ich strukturze powodują tak szybką ich degradację. Wykazano, że 75% białek tej frakcji jest degradowane po uprzedniej ubikwitynacji przez proteasomy 26S, a pozostałe 25% rozkładane ko-translacyjnie przez kompleks proteasomu 20S w sposób niezależny od ubikwityny. Do tej pory nie badano udziału innych układów proteolitycznych w ich degradacji.

Agregaty białkowe w komórkach oraz implikacje dla terapii nowotworów

Zahamowanie aktywności proteasomu prowadzi do akumulacji nowo-syntetyzowanych białek (głównie z frakcji DRiP) i składników UPS w formie agregatów komórkowych. Po zablokowaniu proteasomu ubikwitynowane białka gromadzą się lokalnie wokół mikrotubul i są transportowane do obszaru okołocentriolarnego tworząc duży agregat nazywany **agresomem**. Tworzenie agresomu uważane jest za główny mechanizm indukcji śmierci komórki po zablokowaniu proteasomu. W niektórych komórkach średnica agresomu może być porównywalna do średnicy jądra komórkowego. Zablokowanie aktywności proteasomu powoduje ponadto stres siateczki śródplazmatycznej oraz Unfolded Protein Response (UPR) poprzez to indukuje proces programowej śmierci komórki – apoptozę oraz kieruje proteolizę na szlak autofagii.

Nienowotworowe komórki są stosunkowo odporne na działanie inhibitorów proteasomu, podczas gdy funkcjonowanie komórek nowotworowych wykazujących intensywny obrót białek jest znacznie zaburzane przez zahamowanie proteasomu. Obecnie inhibitory proteasomu są stosowane w leczeniu szpiczaka mnogiego, chłoniaka z komórek płaszczka i guzów zrębu żołądkowo-jelitowego.

Nagromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek wewnątrz agresomu jest głównym z postulowanych mechanizmów działania inhibitorów proteasomu jako leków przeciwnowotworowych. Niemniej jednak, rozbitcie struktury agresomów przez inhibitory deacetylazy histonowej, czy środki działające na mikrotubule zwiększają siłę działania przeciwnowotworowego inhibitorów proteasomu. Dlatego tworzenie agresomu w komórkach nowotworowych prawdopodobnie chroni je przed stresem siateczki śródplazmatycznej wywołanym przez inhibitory proteasomu i dlatego może ograniczyć działanie przeciwnowotworowe tychże związków.

Drugim typem opisywanych agregatów zawierających poliubikwitynowane białka są **ALIS** (Aggresome Like Structures), które zostały opisane pierwotnie w dojrzewających komórkach dendrytycznych, jako **DALIS** (Dendritic cells Aggresome Like Structures). ALIS zawierają, podobnie do agresomu, poliubikwitynowane białka, jednak zwykle wstępują jako mnogie struktury w komórkach, a ich powstawanie jest wywołane innymi czynnikami niż zablokowanie aktywności proteasomu. Opisane w

dojrzewających komórkach dendrytycznych DALIS są strukturami, które przejściowo gromadzą poliubikwitynowane białka do czasu dojrzałości komórki, następnie zmagazynowane białka są używane jako substraty do generacji peptydów antygenowych przez dojrzałe komórki dendrytyczne. Kolejnymi komórkami, w których opisano ALIS, były makrofagi stymulowane lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS).

Trójpeptydylopeptydaza II (TPPII) jako pozalizosomalny układ proteolityczny

W komórkach funkcja UPS jest uzupełniana przez inne proteazy degradujące generowane przez proteasomy oligopeptydy. Trójpeptydylopeptydaza II (TPPII) jest największą znaną peptydazą tworzącą samokompartmentujący się kompleks enzymatyczny rozkładający oligopeptydy do trójpeptydów. Jest ona tak samo konserwatywna filogenetycznie jak proteasom. Składa się z dwóch skręconych wobec siebie stosów podjednostek, tworzących wiele komór katalitycznych w obrębie jej cząsteczki. TPPII wykazuje dwie aktywności enzymatyczne: egzo- jak i endoproteolityczną.

N-końcowa aktywność egzoproteolityczna TPPII jest zlokalizowana w komorach katalitycznych dwóch ułożonych w stos dimerów. Może ona uzupełniać funkcje proteasomu w sekwencyjnej degradacji białka przez odcinanie trójpeptydów z oligopeptydów uwalnianych przez proteasom. Ponadto, TPPII może samodzielnie degradować peptydy dłuższe niż 15 aminokwasów (do około 75 aminokwasów) poprzez swoją aktywność endoproteolityczną, dając TPPII zdolność do działania także równoległe do proteasomu. W ten sposób TPPII dodatkowo uzupełnia działanie proteasomu.

Ponadto wykazano eksperymentalnie, że w specyficznych warunkach TPPII może zastępować niektóre funkcje proteasomu. TPPII jest zaangażowana w wytwarzanie niektórych epitopów MHC klasy I w sposób niezależny od proteasomu np. Nef wirusa HIV. Może ona zastępować sam proteasom w tym procesie, zwłaszcza, gdy upośledzona jest funkcja proteasomu poprzez inhibitory. Ponadto, TPPII bierze udział w wielu innych ważnych procesach: podział komórek, żywotność i apoptoza, regulacja szlaków kinazy MAP, także zanik mięśni i otyłość. TPPII ulega nadmiernej

ekspresji w niektórych typach nowotworów, a inhibitor TPPII AAF-cmk uwrażliwił komórki białaczkowe na proapoptotyczne działanie cytokin z rodziny czynnika martwicy nowotworów.

WKŁAD WŁASNY HABILITANTA

Badania nad degradacją białek i agregatami białkowymi w komórkach rozpocząłem jeszcze podczas prac w zespole badawczym dr. Cezarego Wójcika badając wpływ inhibitora ubikwitynacji na ultrastrukturę agregatów białkowych w komórkach **[publikacja 12P - pkt 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych]**, następnie prowadziłem je w zespole Prof. Petera Michalela Kloetzela i Prof. Ulrike Seifert w Instytucie Biochemii w Berlinie.

Po uzyskaniu doktoratu swoje badania nad pozalizosomalnymi układami proteolitycznymi w utrzymaniu homeostazy białkowej ze szczególnym uwzględnieniem agregatów białkowych w komórkach znacznie poszerzyłem i pogłębiłem pracując w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii WUM. Praca ta zaowocowała pierwszą publikacją wchodzącą w skład prezentowanego w niniejszym autoreferacie osiągnięcia naukowego a opublikowaną w czasopiśmie The Cell **[publikacja 1H]**.

W publikacji tej jako pierwszy wykazałem, że w komórkach w warunkach imitujących stan zapalny pod wpływem interferonu-gamma dochodzi do przejściowej agregacji białek pod postacią agregatów podobnych do agresomu: Aggresome-Like Structures (ALIS), które zawierają poliubikwitynowane białka. Agregaty te uwidaczniałem metodą immunocytochemii pośredniej w mikroskopii fluorescencyjnej **[publikacja 1H: Figura 5A]**. Przed moim odkryciem wiadomo było, że agregaty poliubikwitynowanych białek powstają w komórkach w następstwie zablokowania proteasomu (agresomy) lub w odpowiedzi na stresy komórkowe, takie jak szok cieplny. Nie było jednak żadnych danych na temat wpływu interferonu-gamma na ich powstawanie.

W następnym etapie badań przeanalizowałem dynamikę zmian ilości poliubikwitynowanych białek w komórkach metodą Western-blot. Wykazałem, że pod wpływem interferonu-gamma, po przejściowym znacznym wzroście, liczba poliubikwitynowanych białek spada do poziomu wyjściowego po upływie 48h. Spadek ilości poliubikwitynowanych białek wyraźnie korelował z silną indukcją podjednostki immunoproteasomu $\beta 5i/LMP7$ **[publikacja 1H: Rycina1A]**. Obserwacja ta miała kluczowe znaczenie dla dalszych badań w tym projekcie, dotyczących udziału immunoproteasomu w degradacji poliubikwitynowanych białek. Ten wątek był kontynuowany także przez innych członków zespołu badawczego i doprowadził do wykazania, że immunoproteasom jest efektywniejszy od proteasomu konstytutywnego w ich degradacji. Indukcja immunoproteasomu przywracała równowagę białek w komórkach natomiast komórki pozbawione możliwości indukcji immunoproteasomu nie były zdolne do usuwania agregatów poliubikwitynowanych białek.

Następnie kontynuowałem dalsze badania, aby dokładniej scharakteryzować wpływ interferonu-gamma na proces ubikwitynacji. Przed ukazaniem się powyższej pracy taki wpływ nie był znany. Udowodniłem, że interferon-gamma selektywnie stymuluje postawanie łańcuchów poliubikwityny znakujących białka do degradacji przez proteasom, czyli łańcuchów utworzonych przez wiązanie z lizyną 48 cząsteczki ubikwityny (K48) **[publikacja 1H: Rycina1D]**. Ponadto pokazałem, że zwiększona aktywność ubikwitynująca utrzymuje się dłużej niż agregacja poliubikwitynowych białek **[publikacja 1H: Rycina2A]**. Wskazuje to wyraźnie, że następujący spadek ilości poliubikwitynowanych białek zależy od ich degradacji przez wydukowany przez interferon immunoproteasom.

Następnie w eksperymentach typu "pulse-chase" z inhibitorem syntezy białek - cykloheksymidem wykazałem, że wzrost poziomu znakowanych radioaktywnie immunoprecypitowanych nowo syntetyzowanych poliubikwitynowych białek był silnie zależny od translacji **[publikacja 1H: Rycina1E]**. Wynik ten sugerował, że interferon-gamma nie tylko wpływa na ubikwitynację ale także zwiększa licznę nowo syntetyzowanych białek, dlatego następnie charakteryzowałem wpływ interferonu-gamma na ilość nowo syntetyzowanych białek z frakcji Defective Ribosomal Products (DRiP). Wymagało to wykonania trudnych technicznie i pracochłonnych

eksperymentów typu pulse-chase z użyciem dużej ilości radioaktywnych izotopów (5mCi/ml pożywki) z następczą elektroforezą SDS-PAGE radioaktywnych białek. W eksperymentach tych udowodniłem, że interferon-gamma znacznie zwiększa ilość białek z puli DRiP w komórkach [**publikacja 1H: Rycina7 A-B**].

Podsumowując: Przedstawione w tej pracy dane mają znaczny wpływ w rozwój wiedzy na temat homeostazy białek w komórkach w warunkach zapalnych. Wskazują one na istotną rolę indukcji immunoproteasomu w odpowiedzi na zwiększoną ilość substratów z puli DRIP a poprzez to zwiększone zapotrzebowanie na proteolizę, która jest niezbędna dla prawidłowo funkcjonowania komórek w tych warunkach. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do opracowania lepszych metod terapii chorób o podłożu zapalnym.

Następnie prowadziłem badania w innym zakresie tzn. nad nowymi inhibitorami kinaz i charakterystyką nowego inhibitora proteasomu BSc2118, które zaowocowały pracami omawianymi w dalszej części autoreferatu (**pkt 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**). Powróciłem także do aktywnego klinicznego wykonywania zawodu lekarza rozpoczynając specjalizację z zakresu medycyny rodzinnej. Po uzyskaniu tytułu specjalisty medycyny rodzinnej powróciłem do badań laboratoryjnych nad homeostazą białek w komórkach, w szczególności nad agregatami białkowymi. Jednocześnie cały czas kontynuując pracę z pacjentami, jako lekarz rodzinny. Moje badania laboratoryjne zaowocowały trzema kolejnymi pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego opublikowanymi kolejno w: Histology and Histopathology [**Publikacja 2H**], Folia Histochemica et Cytobiologica [**Publikacja 3H**] oraz Review and Research on Cancer Treatment [**Publikacja 4H**].

Prowadząc badania nad nowym inhibitorem proteasomu BSc2118, jako potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym zaobserwowałem, że w zależności od typu komórek można wyróżnić dwa podstawowe typy agresomów powstających po zablokowaniu proteasomu: duże pojedyncze lub drobne rozproszone. Obserwacja ta pozwoliła mi wybrać najlepszą linię do badań morfologicznych nad dynamiką tworzenia agresomów. Do tych badań wybrałem komórki C26- mysiego gruczolaka okrężnicy [**publikacja 2H**]. Wybór tej linii podyktowany był ich względną opornością na inhibitor BSc2218 oraz tworzeniem bardzo dużych agresomów [**publikacja 2H: Rycina 1 A-D**]. Na wstępie tych badań opracowałem i walidowałem nową metodę

cytochemiczną polegającą na zastosowaniu fluorescencyjnej pochodnej inhibitora BSc2118 do przyżyciowego znakowania proteasomu w komórkach, oraz walidowałem połączenie tej techniki z klasyczną immunocytochemią wykrywającą inne białka w komórce w celu obserwacji w mikroskopie konfokalnym **[publikacja 2H Rycina 1C-D]**, **[także publikacja 6P - patrz pkt. 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych]**. Metoda ta polega na przyżyciowym znakowaniu proteasomów w komórce z wykorzystaniem inhibitora BSc2118 sprzężonego z fluorochromem BODIPYTM-FL (zielona fluorescencja) lub BODIPYTM-581/591 (czerwona fluorescencja). Pozwala ona na jednostopniową szybką wizualizację lokalizacji proteasomów w komórkach i śledzenie zmian ich lokalizacji w trakcie tworzenia agresomów. Ponadto dzięki połączeniu z następczym utrwaleniem w zbuforowanych roztworach alkoholowych (zachowujących dobrze antygeny i permeabilizujących błony komórkowe) może ona być połączona z klasycznymi technikami immunocytochemii pośredniej z wykorzystaniem przeciwciał. W wyniku standaryzacji metody uzyskałem trwały sygnał fluorescencyjny inhibitora nieulegający osłabieniu w trakcie następczych procedur immunocytochemicznych.

Przy wykorzystaniu tej oryginalnej techniki cytochemicznej przeanalizowałem dynamikę procesu tworzenia agresomu w komórkach mysiego gruczolaka okrężnicy-C26 oraz opisałem dokładnie lokalizację TPPII w tych komórkach, zarówno w warunkach spoczynkowych oraz po zablokowaniu proteasomu.

Wykazałem, że TPPII w warunkach spoczynkowych lokalizuje się wyłącznie na obszarze cytoplazmy tych komórek w sposób homogenny. W przeciwieństwie do proteasomu nie wykazuje wzmocnienia sygnału w obrębie obszaru okołojądrowego **[publikacja 2H Rycina 2A, 3A]**. Obszar ten jest tzw. centrum proteolitycznym komórki, w którym zachodzi intensywne degradacja krótko-żyjących białek frakcji DRiP. W tym obszarze dochodzi także do zainicjowania powstawania agresomu. Uzyskane przeze mnie dane sugerują, że w warunkach spoczynkowych, w pełni aktywny układ ubikwityna-proteasom jest wystarczający do zapewnienia całkowitej proteolizy w obszarze przyjądrowym, bez konieczności znaczącego zaangażowania TPPII w ten proces. Ponieważ TPPII posiada wiele komór proteolitycznych a proteasom jedną, możliwe jest także, że taka niewielka ilość TPPII w tym obszarze

jest wystarczająca dla prawidłowego rozkładu oligopeptydów generowanych przez proteasom.

Głównym odkryciem mojej pracy było wykazanie, że po zablokowaniu proteasomu, TPPII jest rekrutowana do tworzącego się w obszarze okołojądrowym agresomu. Początkowo TPPII jest zlokalizowana w centrum tworzącego się agresomu pomiędzy ubikwitynowanymi białkami i proteasomami [**publikacja 2H Rycina 3B, 3C**]. Następnie wraz z powiększaniem się agresomu TPPII stopniowo przemieszcza się na powierzchnię agresomu, a w części centralnej powstaje rdzeń zawierający poliubikwitynowane białka oraz proteasomy [**publikacja 2H Rycina 3D**]. W pełni uformowanym agresomie, w komórkach C26, TPPII tworzy płaszcz leżący na powierzchni tego rdzenia [**publikacja 2H Rycina 4 A-C**]. W podsumowaniu pracy zaproponowałem model zmian w lokalizacji TPPII podczas tworzenia agresomu w komórkach C26 [**publikacja 2H Rycina 5**].

Podsumowując: uzyskane przeze mnie wyniki stanowią całkowicie nowe odkrycie dotyczące udziału TPPII w homeostazie białek w komórkach. Ponadto wyniki te uzyskałem przy użyciu nowej opracowanej przeze mnie procedury cytochemicznej, dlatego praca ta stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny cytochemii. Ponadto warto podkreślić, że do tej pory w literaturze nie było żadnych doniesień wskazujących na obecność TPPII w agresomach po zablokowaniu proteasomu. Inhibitory proteasomów są stosowane jako leki przeciwnowotworowe dlatego też wykazanie, że także TPPII jest rekrutowana do agresomu pod ich wpływem otwiera pole do potencjalnego wykorzystanie TPPII jako celu w terapii nowotworów, ponieważ agresomy są związane z przeciwnowotworowym działaniem inhibitorów proteasomów.

W następnej fazie swoich badań postanowiłem sprawdzić czy zablokowanie TPPII będzie miało wpływ na żywotność i ultrastrukturę komórek ludzkiej białaczki monocytarnej linii U937, ponieważ inhibitory proteasomów są stosowane w leczeniu nowotworów hematologicznych [**publikacja 3H**]. Do badań użyłem AAF-cmk, który jest semispecyficznym inhibitorem TPPII, w stężeniach, które są specyficzne dla TPPII.

W badaniach tych wykazałem, że AAF-cmk istotnie obniża żywotność komórek linii U937 w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji **[publikacja 3H Rycina 1 A, B]**. Ponadto efekt cytostatyczny/cytotoksyczny AAF-cmk na komórki U937 był zależny od aktywności kaspaz, gdyż inhibitor kaspaz odwracał ten efekt **[publikacja 3H Rycina 1C]** sugerując indukcję procesu apoptozy. Indukcję śmierci komórek w mechanizmie apoptozy potwierdziłem badając eksternalizację fosfatydyloseryny przy użyciu AneksynyV sprzężonej z fluorochromem w mikroskopii fluorescencyjnej **[publikacja 3H Rycina 2B]** oraz analizując ultrastrukturę komórek poddanych działaniu AAF-cmk w transmisyjnej mikroskopii elektronowej **[publikacja 3H Rycina 3 B, K, L]**. Ponadto wykazałem, że indukcja apoptozy pod wpływem AAF-cmk zachodzi w mechanizmie wewnątrzpochodnym (aktywacja kaspazy 9) **[publikacja 3H Rycina 2 A]**.

W przeprowadzonej przez mnie analizie mikroskopowo-elektronowej udowodniłem, że oprócz apoptozy, AAF-cmk indukuje w komórkach linii U937 proces autofagii. Dlatego prześledziłem dynamikę tworzenia struktur autotofagocytarnych od błon izolacyjnych **[publikacja 3H Rycina 3 C, D]** poprzez pierwotne autofagosomy **[publikacja 3H Rycina 3 E, F]**, po wtórne struktury autofagosomalne, z następczymi zmianami wstecznymi w cytoplazmie **[publikacja 3H Rycina 3 M, N, S, T]**. Autofagia jest procesem, który może prowadzić do śmierci komórki w mechanizmie tzw. śmierci autofagalnej (autophagic cell death), natomiast w komórkach linii U937 pod wpływem AAF-cmk zaobserwowałem połączenie obu procesów: apoptozy i autofagii.

Jednak najważniejszym odkryciem przeprowadzonych przeze mnie badań było opisanie przez mnie nowego typu agregatów białkowych w komórkach **[publikacja 3H Rycina 3 I, J]**. Oprócz obserwowanych wcześniej struktur podobnych do agresomów (ALIS) opisałem drugi typ agregatów.

W komórkach U937 poddanych działaniu AAF-cmk pierwszy typ agregatów, który odpowiada agresomom lub strukturom do nich podobnym (ALIS) był zlokalizowany w obrębie ergastoplazmy w regionie okołojądrowym **[publikacja 3H Rycina 3 H]**. Dodatkowo, agregaty te były otoczone przez wiele struktur lizosomalnych, co sugeruje ich udział w indukcji autofagii. Z opublikowanych danych wiadomo, że zarówno agresomy jak i ALIS są substratami dla autofagii.

Natomiast drugi typ agregatów, w przeciwieństwie do ALIS czy agresomów, nie był związany z elementami szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, ale raczej z wolnymi rybosomami. Ponieważ ten typ nie odpowiadał agresomom i ALIS ani w lokalizacji, ani w strukturze, zaproponowałem nowy akronim je opisujący **ALISNER** (Aggresome-Like Structure Not Associated With the ER). Obecność ALISNER można zinterpretować, jako wynik upośledzonej degradacji współtranslacyjnej białek na wolnych rybosomach. Podczas syntezy białka, jego koniec aminowy wystaje z wolnego rybosomu, a ponieważ TPPII jest N-końcową peptydazą, sugeruję w pracy, że TPPII może bezpośrednio uczestniczyć w przycinaniu takich powstających białek. Jednak w przeciwieństwie do proteasomu brak jest danych eksperymentalnych na temat udziału TPPII w ko-translacyjnej degradacji nowo-syntetyzowanych białek (DRiP).

Podsumowując: Prezentowane w tej pracy dane stanowią powiedzenie, że TPPII może być rozważana za cel terapeutyczny w terapii przeciwnowotworowej. Ponadto opisałem nowy typ agregatów białkowych w komórkach poddanych działu inhibitora TPPII i zaproponowałem dla nich nowy akronim ALISNER.

Kontynuując badania nad nowo-syntetyzowanymi białkami z frakcji DRiP adoptowałem następnie nieradioaktywną metodę znakowania białek techniką Klik-IT do celów wizualizacji agresomów w mikroskopii konfokalnej **[publikacja 4H]**. W części eksperymentalnej tej pracy najpierw adoptowałem tę technikę do potrzeb konfokalnej mikroskopii i utrwalania komórek na bazie etanolu. Następnie potwierdziłem, że w komórkach C26 mysiego raka okrężnicy, agresom powstający na skutek zhamowania proteasomu składa się z gęstego rdzenia **[publikacja 4H, Rycina 1, strzałki w panelu C]** oraz płaszczka zawierającego mniej gęsty materiał **[publikacja 4H, Rycina 1, grotty strzałek w panelu C]**. Obserwacja ta potwierdza strukturę agresomu w komórkach mysiego gruczolaka okrężnicy linii C26 opisaną w poprzedniej publikacji 2H.

Ponad to w tej pracy przedyskutowałem znaczenie syntetyzowanych białek z frakcji DRiP w fizjologii komórki oraz dokonałem szerokiego porównania metod detekcji

nowo-syntetyzowanych białek z frakcji DRiP w oparciu o opublikowaną literaturę i własne doświadczenia [publikacja 4H Tabela 1].

Podsumowując: W pracy tej potwierdziłem dwuczęściową strukturę dojrzałego agresomu w komórkach C26, który składa się z rdzenia i płaszczka a obie jego części zawierają nowo syntetyzowane białka.

Uwagi końcowe:

Wszystkie prace składające się na osiągnięcie habilitacyjne dotyczą homeostazy białek w komórkach ze szczególnym uwzględnieniem tworzonych przez nie agregatów. W tym kontekście badałem udział dwóch pozalizosomalnych układów proteolitycznych: układ ubikwityna-proteasom (UPS) oraz trójpeptydylopeptydazę II (TPPII).

Wykazałem że w warunkach imitujących stan zapalny dochodzi do przejściowej agregacji białek w formie ALIS (Aggresome-Like Structures) w różnych typach komórek a mechanizmem tej agregacji jest stymulacja syntezy białek frakcji DRiP oraz ich ubikwitynacji przez interferon-gamma. Równowagę białkową przywraca dopiero indukcja immunoproteasomu, który szybciej i efektywniej przeprowadza degradację białek frakcji DRIP a komórki pozbawione możliwości wytworzenia immunoproteasomu mają zaburzoną homeostazę tych białek.

Następnie badałem dynamikę tworzenia agregatów białkowych po zablokowaniu proteasomu czyli tzw. agresomów. Wykazałem, że w procesie tworzenia agresomów w komórkach mysiego gruczolakoraka okrężnicy C26 nie tylko proteasom ale i trójpeptydylopeptydaza druga (TPPII) jest rekrutowana w ich obręb. Do czasu moich badań nie było żadnych doniesień wskazujących na obecność TPPII w agresomach. Ponadto, opisałem strukturę tych agresomów, które składają się z gęstego rdzenia zawierającego proteasomy i poliubikwitynowane białka oraz płaszczka zawierającego TPPII. Wykazałem też, że obie jego części zawierają nowo syntetyzowane białka. Prześledziłem dokładnie dynamikę tworzenia agresomów oraz rekrutacji w ich strukturę TPPII a także jej relokację z centrum tworzącego się agresomu na jego powierzchnię.

Następnie, opisałem nowy typ agregatów białkowych powstających pod wpływem semi-specyficznego inhibitora TPPII (AAF-cmk) w komórkach ludzkiej białaczki monocytarnej linii U937 oraz zaproponowałem dla nich nowy akronim: **ALISNER** (Aggresome Like Structures Not Associated with ER). Ponadto badając właściwości biologiczne AAF-cmk wykazałem, że wykazuje on efekt cytostatyczny/cytotoksyczny wobec komórek białaczki monocytarnej linii U937, który zależy od jednoczesnej indukcji apoptozy oraz autofagii. Udowodniłem, że AAF-cmk indukuje apoptozę w mechanizmie wewnątrzpochoicznym oraz prześledziłem dynamikę zmian struktur autofagalnych w tych komórkach w mikroskopii elektronowej.

Dodatkowo w swoich badaniach opracowałem i wystandaryzowałem nową metodę cytochemiczną wykorzystując fluorescencyjnie zmodyfikowany inhibitor proteasomu BSc2118 do przyżyciowego znakowania proteasomu w komórkach. Adaptowałem tę metodę do połączenia z klasyczną immunocytochemią pośrednią w mikroskopii konfokalnej. Metoda pozwala na szybką jednostopniową wizualizację agresomów w komórkach. Adaptowałem także nieradioaktywną metodę znakowania syntetyzowanych białek techniką Click-IT do celów wizualizacji agresomów w mikroskopii konfokalnej.

Warto też podkreślić, że prowadzone przeze mnie badania miały charakter badań podstawowych z zakresu medycznej fizjologii komórki i stanowią nowe odkrycia dotyczące proteolizy wewnątrzkomórkowej i homeostazy białek, jednakże mają one potencjalne znacznie aplikacyjne i mogą stymulować rozwój dalszych badań translacyjnych.

Wykazanie istotnej roli immunoproteasomu w równowadze białek w warunkach stanu zapalnego otwiera nowe perspektywy umożliwiające opracowanie lepszych metod terapii chorób o podłożu zapalnym np. poprzez stosowanie selektywnych inhibitorów immunoproteasomu. Inhibitory proteasomów są stosowane obecnie jako leki przeciwnowotworowe. Wyniki moich badań wskazują, że TPPII może być rozważana za cel terapeutyczny w terapii przeciwnowotworowej, gdyż jest rekrutowana do agresomu a inhibitor TPPII indukuje śmierć komórek białaczki w warunkach *in vitro* w mechanizmie apoptozy i autofagii.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Poza powyższym cyklem prac, stanowiących osiągnięcie do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, w mojej pracy badawczej zajmowałem się przede wszystkim tematyką związaną z nowymi potencjalnymi lekami o działaniu przeciwnowotworowym oraz formami eksperymentalnej terapii onkologicznej, układem ubikwityna-proteasom w plemnikach oraz medycyną rodzinną. Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych, podręcznikach oraz jestem współredaktorem dwóch książek monograficznych.

Prace nad nowymi potencjalnymi lekami o działaniu przeciwnowotworowym oraz formami eksperymentalnej terapii onkologicznej:

Cztery publikacje z tego zakresu dotyczyły także pozalizosomalnych układów proteolitycznych: proteasomy oraz trójpeptydylopeptydaza II. Z czego w trzech publikacjach współuczestniczyłem w badaniach nad tymi samymi inhibitorami, które badałem w pracach wchodzących w skład osiągnięcia: nad nowym inhibitorem proteasomów BSc2118 [**publikacja 6P**], [**publikacja 15M**] oraz nad inhibitorem TPPII AAF-cmk [**publikacja 10P**].

Inhibitor BSc2218

Współuczestniczyłem w scharakteryzowaniu właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych inhibitora proteasomów BSc2118 w modelu zwierzęcym i badaniu jego efektów przeciwnowotworowych [**publikacja 6P**]. W wyniku tych prac ustalono, że lokalna iniekcja (doguzowa) BSc2118 blokuje w 100% aktywność proteasomu w tkance nowotworowej i w 60% w erytrocytach. Iniekcja dootrzewnowa BSc2118 w 80% blokuje aktywność proteasomu w erytrocytach i w 70% w tkankach

guza. Po 24h od podania doguzowego 90% aktywności proteasomu w guzie jest nadal zablokowana, a we krwi obwodowej stwierdzono około 50% aktywności proteasomu. Po 24h od podania dootrzewnowego nie stwierdzono zahamowania aktywności proteasomu w tkance guza, a we krwi obwodowej wciąż 40% aktywności jest zablokowane. Wyjątkiem od tej reguły są tkanki mózgu, w których proteasom nie był istotnie zablokowany po 1h od iniekcji a po 24 h obserwowano około 10 % zahamowanie proteasomu. Ponadto BSc2118 w modelu czerniaka wywoływał remisję u 30% badanych zwierząt przy podaniu doguzowym. W powyższych eksperymentach współuczestniczyłem w oznaczaniu aktywności proteasomu, nastrzykiwaniu zwierząt i pobieraniu tkanek.

Moim oryginalnym wkładem w tę pracę była standaryzacja cytochemicznego znakowania proteasomów w komórkach przy użyciu fluorescencyjnej pochodnej BSc2118-FL. W stężeniach 0,1 μ M – 1 μ M BSc2118-FL nie jest toksyczny dla komórek w krótkim czasie inkubacji (1-3 min) znakuje specyficznie proteasomy umożliwiając szybką i skuteczną wizualizację ich lokalizacji w komórkach [**publikacja 6P Ryciny 2 C, E**]. (*Patrz także publikacja 2H*). Następnie omówiłem opracowaną metodę i przedstawiłem możliwości zastosowania jej do wizualizacji agresomów w komórkach w publikacji metodycznej [**publikacja 15M**].

Inhibitor AAF-cmk

Współuczestniczyłem w badaniach, w których wykazaliśmy, że zablokowanie TPPII wzmacnia przeciwnowotworowe działanie cytokiny TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) poprzez stabilizację białka I κ B α . W pracy tej przeprowadziłem analizę indukcji apoptozy w transmisyjnej mikroskopii elektronowej [**publikacja 10P Rycina 4 A-F**].

Ponadto współuczestniczyłem też w oznaczaniu aktywności proteasomu w pracy dotyczącej cytostatycznego działania leku hipoglikemizującego - pioglitazonu [**publikacja 8P Rycina 1 i 2**].

Inne:

Wykorzystując swoje doświadczenie biochemiczne, w latach 2002-2005 byłem wykonawcą projektu KBN w ramach którego analizowałem nowe związki chemiczne projektowane i syntetyzowane jako inhibitory kinaz **[Publikacja 7P]**.

W badaniach tych określałem aktywność rekonstruowanej *in vitro* kaskady kinaz MAP: MEK/ERK oraz aktywnej kinazy pErk1 wobec substratu MBP (zasadowe białko mieliny) w badaniach w warunkach spoczynkowych i stopień jej zablokowania pod wpływem syntetyzowanych w ramach tego projektu związków chemicznych. Dokonałem też pomiaru zahamowania całkowitej aktywności kinazowej *in vivo* (całkowita fosforylacja białek w komórkach) po wpływie tych związków w porównaniu z komercyjnie dostępnym inhibitorem kinazy MEK.

Moje badania pozwalały selekcjonować związki wykazujące zahamowanie aktywności kinazowej do dalszych syntez i modyfikacji struktur chemicznych. Po przebadaniu wielu związków wyselekcjonowano najbardziej specyficzne i wykazujące największy efekt cytostatyczny/cytotoksyczny. Dla tych związków przeprowadziłem analizę zahamowania aktywności kinaz MEK/ERK dla poszczególnych stereoizomerów (R, S) po wyizolowaniu ich z mieszaniny racemicznej **[Publikacja 7P, Rycina 1]**. Oraz określałem typ oddziaływań między inhibitorem a enzymem (inhibicja kompetycyjna, niekompetycyjna) **[Publikacja 7P, Rycina 3]**. W opublikowanej pracy przedstawiono wyniki tylko dla jednego związku, który cechował się najlepszymi parametrami.

Badania nad cytostatycznym działaniem związków kontynuowałem współpracując w badaniach nad nowymi pochodnymi podofilotoksyny **[Publikacja 16M]**, a także agonistów/antagonistów błonowego receptora dla estrogenów (GPER) **[Publikacja 14M]**.

Uczestniczyłem też w pracach nad nefarmakologiczną eksperymentalną terapią nowotworów poprzez połączenie terapii fotodynamicznej z terapią komórkami dendrytycznymi w mysim modelu raka okrężnicy **[Publikacja 9P]**. W pracach tych współuczestniczyłem w wykonywaniu badań morfologicznych. Publikacja ta wchodziła w skład szeregu prac nagrodzonych Nagrodą Zespołową Ministra Zdrowia.

Proteasomy w plemnikach

Na początku swojej pracy naukowej pracując w zespole dr Cezarego Wójcika, zajmowałem się tematyką obecności nowych wtedy proteaz– proteasomów w ludzkich plemnikach. Z tego okresu pochodzą dwie moje ważne prace [**Publikacja 11P i 13P**]. W pracach tych po raz pierwszy pokazałem ultrastrukturalną immunochemiczną lokalizację proteasomów w ludzkich plemnikach. Wykazałem, że proteasomy lokalizują się na akrosomie ludzkich plemników. Po latach inni badacze udowodnili, że to akrosomalne proteasomy w nie akrozyna są odpowiedzialne za penetrację plemników przez osłonkę przejrzystą w trakcie zapłodnienia.

Z tego okresu pochodzi też moja pierwsza praca związana z agregatami białkowymi w komórkach i procesem ubikwitynacji [**Publikacja 12P**]

Praca z zakresu medycyny klinicznej

W 2018 roku w czasopiśmie Biomedical Papers (IF 1, 2) ukazała się praca, będąca owocem mojej pracy klinicznej i podjęcia się trudu uzyskania tytułu specjalisty medycyny rodzinnej. Opisałem w niej wybrane leki hipotensyjne do podawania w systemie przezśluzówkowym jako alternatywę do podawania parenteralnego w przypadku, kiedy podawanie drogą doustną jest niemożliwe.

W praktyce klinicznej opracowałem własny autorski model dawkowania czterech leków hipotensyjnych aplikowanych podjęzykowo i doodbytniczo na potrzeby farmakoterapii nadciśnienia tętniczego stopnia III u pacjentki z poresekcyjnym zwężeniem żołądka (operacja modo Billroth II), która nie była w stanie przyjmować leków doustnie z powodu wymiotów i zalegania treści w kikutie żołądka. Taki schemat terapii był akceptowany przez pacjentkę i pozwolił na uzyskanie zadawalającej kontroli ciśnienia w długoterminowym leczeniu choroby nadciśnieniowej w praktyce ambulatoryjnej.

Praca ta jest także pierwszym w literaturze doniesieniem dotyczącym transrektalnego podawania furosemidu u ludzi, a drugim odnośnie winianu metoprololu jak również pierwszym dotyczącym długotrwałego podania przezśluzówkowego (podjęzykowo i doodbytniczo) czterech leków hipotensyjnych. W artykule dokonałem także przeglądu leków hipotensyjnych aplikowanych w systemie przezśluzówkowym (podjęzykowym) dostępnych w Unii Europejskiej. Przy pisaniu tej pracy powróciłem znowu do współpracy z dr hab. Cezarym Wójcikiem, (w którego zespole przed laty stawiałem pierwsze kroki naukowe) który pracuje obecnie w Zakładzie Medycyny Rodzinnej Uniwersytetu Medycznego w Oregonie.

Publikacja książkowe i monograficzne

Na koniec przedstawię swoje publikacja książkowe i monograficzne. Jako najważniejszą uznaję współautorstwo w książce monograficznej zatytułowanej „**The ubiquitin proteasome system in the central nervous system: From physiology to pathology**”, ze względu na fakt, że zostałem zaproszony do napisania rozdziału w książce, w której jeden z innych rozdziałów pisał laureat nagrody Nobla z dziedziny chemii Aaron Ciechanover, którego miałem okazję poznać podczas prac nad książką w trakcie mojego stażu naukowego w Berlinie.

Rozdział, którego byłem współautorem zatytułowany „General aspects of ubiquitin proteasome system in the mature central nervous system” stanowił przegląd literatury na ten temat, zwłaszcza dyskutowanej wówczas koncepcji neuroproteasomu analogicznego do immunoproteasomu.

Jestem także autorem rozdziału dotyczącego budowy i funkcji kolagenu w podręczniku do Cytofizjologii [**Publikacja 19M**].

W ostatnim roku ukazały się także dwie książki monograficzne dotyczące zagadnień biomedycznych, których jestem współredaktorem [**Publikacja 20M i 21M**].

Ponadto jestem współautorem licznych doniesień zajazdowych, z których wybrane są przedstawione w analizie bibliometrycznej.

Tabelaryczne podsumowanie dorobku publikacyjnego

Prace jako pierwszy, ostatni lub korespondencyjny autor -

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	5	3	5,247	64
Artykuły przeglądowe	1		1,087	15
Łącznie	6	3	6,334	79

Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	5		9,513	53
Artykuły przeglądowe				
Łącznie	5		9,513	53

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	6	4	43,132	148
Artykuły przeglądowe	1		1,087	15
Łącznie	7	4	44,219	163

Publikacje ogółem

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	11	4	52,645	201
Artykuły przeglądowe	1		1,087	15
Łącznie	12	4	53,732	216

1. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS):**428** (bez autocytowań)
2. Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **6**
3. Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**36,007**

(80 pkt. MNiSW)

Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o pozostałych osiągnięciach habilitanta (m.in. dydaktycznych, uzyskanych nagrodach, popularyzacji nauki) zostały zamieszczone w załączniku nr 4. pt „Wykaz dorobku naukowego”.

Warszawa 21.12.2018

Lukasz Piotr-Biały