

**ZAŁĄCZNIK nr 2**  
**Autoreferat w języku polskim**

## Autoreferat

**1. Imię i Nazwisko:** Jakub Drożak

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

- a) doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, 2006; praca doktorska pt. „*Mechanizm hamującego działania L-DOPA i L-deprenylu na syntezę glukozy w kanalikach kory nerki królika*”. Promotor: prof. dr hab. Jadwiga Bryła.

**Rozprawa została nagrodzona przez J.M. Rektora Uniwersytetu Warszawskiego (2008).**

- b) magister biotechnologii (**dyplom z wyróżnieniem**), Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, 2002; praca magisterska pt. „*Zmiany zawartości i stanu zredukowanego wewnątrzkomórkowego glutationu w kanalikach kory nerki królika*” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jadwigi Bryły.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

od 15.12.2006	adiunkt w Zakładzie Regulacji Metabolizmu na Wydziale Biologii Uniwersytet Warszawski
01.02.2008 – 31.07.2010	staż podoktorski w Laboratorium Chemii Fizjologicznej Instytutu de Duve na Wydziale Medycznym Katolickiego Uniwersytetu Louvain w Belgii
01.10.2002 – 30.11.2006	studia doktoranckie w Zakładzie Regulacji Metabolizmu na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

**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. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**a) tytuł osiągnięcia naukowego**

*Identyfikacja molekularna i charakterystyka biochemiczna wybranych enzymów metabolizmu  $\beta$ -alaniny oraz  $\beta$ -alanylo-L-histydyny (karnozyny) u kregowców*

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy**

**1. Drożak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, Van Schaffingen E. (2010)** Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J Biol Chem.*, 285: 9346-56.

IF<sub>2010</sub> = **5,328**, IF<sub>5-letni</sub> = **5,498**; **35** punktów MNiSW; **44** cytowań wg bazy Web of Science (WoS)

*Wkład habilitanta: 50%. Współudział w opracowaniu koncepcji badań; zaplanowanie i wykonanie większości doświadczeń; analiza i interpretacja większości wyników; udział w przygotowaniu maszynopisu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie wszystkich rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.*

**2. Drożak J, \*Chrobok L, \*Poleszak O, Jagielski AK, Derlacz R. (2013)** Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-methyltransferase-like protein (hnmt-like). *PLoS One.*, 8: e64805.

IF<sub>2013</sub> = **3,534**, IF<sub>5-letni</sub> = **4,015**; **40** punktów MNiSW; **9** cytowań (WoS)

*Wkład habilitanta: 75%. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie wszystkich doświadczeń i wykonanie ich większej części; analiza i interpretacja wszystkich wyników; kompletne przygotowanie maszynopisu (całości tekstu oraz wszystkich rycin i tabel); pozyskanie finansowania badań (grant MNiSW Inventus Plus nr 0081/P01/2010/70, realizowany w latach 2010-2011); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.*

**3. Drożak J, Veiga-da-Cunha M, \*Kadziolka B, Van Schaffingen E. (2014)** Vertebrate Acyl CoA synthetase family member 4 (ACSF4-U26) is a  $\beta$ -alanine-activating enzyme homologous to bacterial non-ribosomal peptide synthetase. *FEBS J.*, 281: 1585-97.

IF<sub>2014</sub> = **4,001**, IF<sub>5-letni</sub> = **4,068**; **30** punktów MNiSW; **1** cytowanie (WoS)

*Wkład habilitanta: 60%. Współudział w opracowaniu koncepcji badań; zaplanowanie wszystkich doświadczeń i wykonanie ich większej części; analiza i interpretacja wszystkich wyników; udział w przygotowaniu maszynopisu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie tabeli i rycin (oprócz Ryc. 1); pozyskanie finansowania badań (grant FNP HOMING PLUS/2010-2/2, realizowany w latach 2011-2013).*

**4. Drożak J, \*Piecuch M, \*Poleszak O, Kozłowski P, \*Chrobok L, Baelde HJ, de Heer E. (2015)** UPF0586 Protein C9orf41 Homolog Is Anserine-Producing Methyltransferase. *J Biol Chem.*, 290: 17190-205.

IF<sub>2014</sub> = **4,573**, IF<sub>5-letni</sub> = **4,693**; **35** punktów MNiSW; **0** cytowań (WoS)

*Wkład habilitanta: 70%. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie wszystkich doświadczeń i wykonanie ich większej części; analiza i interpretacja wszystkich wyników; kompletne przygotowanie maszynopisu (całości tekstu oraz wszystkich rycin i tabel); pozyskanie finansowania badań (grant NCN Opus 6 nr 2013/11/B/NZ1/00078, realizowany w latach 2014-2016); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.*

\*studenci wykonujący pracę magisterską pod moją opieką. Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej z powyższych prac zamieszczono w Załączniku nr 7 (Oświadczenia współautorów). Nie przewiduje się wykorzystania którejkolwiek z wymienionych prac jako osiągnięcia w innym postępowaniu awansowym.

Dla prac opublikowanych w roku 2015 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość  $IF_{2014}$

Wyniki przedstawione w ww. publikacjach zostały także częściowo opisane i przedyskutowane w pracy, będącej jednym z rozdziałów większej monografii poświęconej różnym aspektom badań nad dipeptydami imidazolowymi, której jestem współautorem (Drożak i wsp., 2015).

Łączny współczynnik oddziaływania (*impact factor*) czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **17,436**; punkty MNiSW – **140**; liczba cytowań wg bazy Web of Science – **54**.

### **c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **WSTĘP**

##### *Enzymy sieroce*

Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny rozwój bioinformatyki oraz wysokowydajnych technik sekwencjonowania DNA zaowocował gwałtownym wzrostem informacji o pełnych sekwencjach genomów licznych żywych organizmów. Najnowsze edycje baz KEGG oraz NCBI (sierpień 2015) zawierają sekwencje genomów 313 organizmów eukariotycznych oraz blisko 3700 gatunków prokariotycznych. Co ciekawe, analiza uzyskanych informacji wskazuje, że dokładna funkcja blisko 40% potencjalnych białek kodowanych przez typowy genom prokariotyczny oraz ponad 50% białek eukariotycznych jest nieznana (Hanson i wsp., 2009). Przypuszcza się, że znaczny odsetek „białek bez przypisanej funkcji” może posiadać aktywność enzymatyczną, odgrywając mniej lub bardziej istotną rolę w metabolizmie gospodarza (Bradbury i wsp., 2013). Z drugiej strony, spośród blisko 5100 aktywności enzymatycznych sklasyfikowanych dotychczas przez Komisję Enzymatyczną (*Enzymatic Commission, EC*) ponad 1100 jest warunkowana przez enzymy kodowane przez niezidentyfikowane geny (tzw. enzymy sieroce, *ang.* orphan enzymes). Według najnowszych danych, co najmniej 26% aktywności enzymatycznych opisanych u organizmów eukariotycznych jest katalizowana przez enzymy sieroce (Sorokina i wsp., 2014). Co więcej, ponieważ około 4100 reakcjom nie nadano jeszcze numeru EC, uważa się, że liczba enzymów bez znanej sekwencji aminokwasowej może być istotnie wyższa (Sorokina i wsp., 2014).

Brak informacji o genach kodujących znane aktywności enzymatyczne stanowi problem wielowymiarowy. Z jednej strony nie ma możliwości uzyskania czystego rekombinowanego białka takiego enzymu, co z kolei uniemożliwia np.: i) wykonanie jego rzetelnej i wyczerpującej

charakterystyki biochemicznej, ii) identyfikację mechanizmów regulacji jego aktywność (modyfikacje potranslacyjne) lub iii) określenie jego precyzyjnej lokalizacji tkankowej (techniki immunohistochemiczne). Z drugiej strony, znaczna liczba enzymów sierocych poważnie utrudnia badania z dziedziny genomiki porównawczej, ograniczając możliwość rzetelnego przewidywania funkcji białek homologicznych i rekonstrukcję szlaków metabolicznych u odległych ewolucyjnie organizmów. Także informacje otrzymywane w wielkoskalowych badaniach proteomicznych i transkryptomicznych nie mogą być poprawnie zinterpretowane ze względu na brak informacji o funkcji zidentyfikowanych białek-enzymów.

Problem istnienia „enzymów sierocych” oraz „białek o nieznannej funkcji” został poruszony po raz pierwszy przeszło 10 lat temu przez Karpa (2004) i chociaż w literaturze naukowej systematycznie pojawiają się apele o wzmożenie prac nad identyfikacją genów kodujących znane aktywności enzymatyczne (Lespinet i Labedan, 2006; Pouliot i Karp, 2007; Hanson i wsp., 2009; Sorokina i wsp., 2014) oraz odnotowano liczne sukcesy w tej materii, całkowita liczba enzymów sierocych sklasyfikowanych w dedykowanych bazach danych (ORENZA, The Orphan Enzymes Project) nie maleje.

#### *Dipeptydy imidazolowe*

Brak informacji o tożsamości molekularnej dotyczy nie tylko enzymów katalizujących bardzo swoiste reakcje u prostych organizmów pro- lub eukariotycznych, lecz stanowi także istotny problem w badaniach metabolizmu i fizjologii kręgowców, w tym także człowieka. Jednym z przykładów szlaku metabolicznego, który występuje u większości kręgowców, a którego reakcje katalizowane są przez enzymy zaliczane do białek sierocych (do czasu opublikowania prac stanowiących przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe) jest biosynteza dipeptydów imidazolowych.

Dipeptydy imidazolowe (dipeptydy zawierające L-histydyne) - to grupa związków, w których budowie można wyróżnić występowanie aminokwasu niebiałkowego:  $\beta$ -alaniny lub kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) oraz L-histydyny (Boldyrev i wsp., 2013). Związki te występują w wysokich stężeniach w mięśniach szkieletowych (0,5-45 mM) oraz mózgu (0,5-1,5 mM) większości kręgowców. Najlepiej poznanymi i dominującymi w tkankach przedstawicielami tej grupy związków są karnozyna ( $\beta$ -alanylo-L-histydyna) i jej metylowa pochodna anseryna ( $\beta$ -alanylo-N $\pi$ -metylo-L-histydyna) (Boldyrev i wsp., 2013). Natomiast w mózgu stwierdza się także obecność homokarnozyny (GABA-L-histydyna) oraz homoanseryny (GABA-N $\pi$ -metylo-L-histydyna).

Rola fizjologiczna dipeptydów imidazolowych nie została dotychczas ostatecznie wyjaśniona. W tkance mięśniowej wydają się one pełnić rolę związków buforowych,

utrzymujących homeostazę kwasowo-zasadową, a w ośrodkowym układzie nerwowym mogą działać jako neuromodulatory lub/i neuroprzekaźniki (Boldyrev, 2007). Postuluje się także, że związki te są głównymi endogennymi chelatorami jonów  $\text{Cu}^{+2}$  oraz działają antyoksydacyjnie i przeciwglikacyjnie (Boldyrev i wsp., 2013). Za główną trudność w badaniach roli fizjologicznej dipeptydów imidazolowych uważano dotychczas brak informacji odnośnie enzymów katalizujących syntezę tych związków (Bauer, 2005). Co prawda, już na przełomie lat 50- i 60-tych XX wieku wykazano, że zarówno karnozyna jak i homokarnozyna powstają z odpowiednich aminokwasów w reakcji katalizowanej przez syntazę karnozynową (EC 6.3.2.11; Kalyankar i Meister, 1959), a anseryna wydaje się być produktem aktywności *N*-metylotransferazy karnozynowej (EC 2.1.1.22; McManus, 1962). Jednak dopiero realizacja badań, których wyniki stanowią treść przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego, zaowocowała identyfikacją genów syntazy karnozynowej i *N*-metylotransferazy karnozynowej oraz umożliwiła poznanie właściwości biochemicznych i molekularnych tych enzymów.

#### *Cel badań*

**Celem badań była identyfikacja genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy dipeptydów imidazolowych u kręgowców oraz charakterystyka biochemiczna tych białek. Realizacja tego zadania pozwoliła nie tylko na poznanie molekularnych podstaw biosyntezy karnozyny i anseryny, lecz również zaowocowała identyfikacją nowego, jeszcze dotychczas nie opisanego, enzymu metabolizmu  $\beta$ -alaniny u kręgowców.** Uzyskane wyniki zostały opublikowane w czterech recenzowanych artykułach eksperymentalnych, które wchodzi w skład osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny. Najważniejsze z otrzymanych wyników omówiono poniżej.

#### **WYNIKI**

---

**Publikacja:** Drożak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, Van Schaftingen E. (2010) **Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1).** *J Biol Chem.*, 285: 9346-56.

---

W pracy zamieszczono wyniki badań, które doprowadziły do identyfikacji syntazy karnozynowej kręgowców jako białka zawierającego domenę ATP-grasp (ang. *ATP-grasp domain-containing protein 1*, ATPGD1, UniProtKB: A5YM72). Doświadczenia były prowadzone przeze mnie w ramach stażu doktorskiego w laboratorium kierowanym przez prof. Emila Van Schaftingena, Instytut de Duve, Belgia.

Wykorzystując test radioizotopowy do śledzenia zmian aktywności syntazy karnozynowej podczas jej sekwencyjnego oczyszczania z mięśni piersiowych kury (bogatego źródła enzymu)

z użyciem chromatografii jonowymiennej, sączenia molekularnego oraz chromatografii powinowactwa, uzyskałem niemal homogeny preparat enzymu. Charakterystyka chromatograficzna produktów reakcji katalizowanej przez oczyszczony enzym wykazała, że syntezie karnozyny z  $\beta$ -alaniny oraz L-histydyny towarzyszy hydroliza ATP z wytworzeniem ADP i  $P_i$ , a nie AMP oraz  $PP_i$  jak dotychczas sądzono (Kalyankar i Meister, 1959; Boldyrev i wsp., 2013).

Wstępna identyfikacja białek występujących w uzyskanym preparacie techniką tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) nie pozwoliła na wytypowanie białka, które mogłoby być poszukiwanym enzymem. Założono, że negatywny wynik analiz MS/MS jest efektem braku kompletności proteomu/genomu kury domowej (w latach 2008-2009). Wykorzystując uzyskane informacje o mechanizmie katalizowanej reakcji oraz profile ekspresji genów kręgowców dostępne w bazie BioGPS, spośród białek obecnych w bazie rodzin białkowych „pfam” wytypowano białko ATPGD1 jako jedyną potencjalną syntazę karnozynową. Ponieważ zarówno sekwencja genu jak i mRNA kodującego białko ATPGD1 kury domowej rzeczywiście nie występowała w ówczesnych bazach danych, używając dostępnych sekwencji ESTs (Expressed Sequence Tags) wykonałem sekwencjonowanie cDNA kodującego białko ATPGD1 kury, a uzyskane dane zostały umieszczone w publicznej bazie danych (GenBank: GU453679.1). Powtórna analiza wyników identyfikacji białek techniką MS/MS z użyciem banku danych uzupełnionego o poznaną sekwencję aminokwasową ATPGD1, potwierdziła dominującą jego obecność w oczyszczonym preparacie enzymu.

Wykorzystując zarówno homogenne rekombinowane białko ATPGD1 myszy oraz człowieka jak i preparat oczyszczonego natywnego enzymu kury, wykonano wyczerpującą charakterystykę biochemiczną syntazy karnozynowej. Wyniki analizy chromatograficznej oraz MS/MS potwierdziły, że produktem aktywności badanych białek jest karnozyna. Ustaliłem rodzaj kinetyki enzymatycznej badanej reakcji (Michaelisa-Menten), wyznaczyłem jej podstawowe parametry kinetyczne ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ) oraz wyczerpująco określiłem swoistość substratową badanych enzymów. W szczególności, wykazałem niską swoistość substratową syntazy karnozynowej względem akceptora  $\beta$ -alaniny. Istotne jest również to, że wyniki te zapoczątkowały kolejne badania prowadzone przez zespół prof. Van Schaftingena, które zaowocowały identyfikacją nowego enzymu tzw. korekty metabolicznej (ang. *metabolite proofreading enzyme*) (Veiga-da-Cunha i wsp., 2014). Białka zaliczane do tej grupy enzymów usuwają „wadliwe” i często toksyczne metabolity powstające jako uboczne produkty aktywności enzymów na skutek ich niedoskonałości katalitycznej (Van Schaftingen i wsp., 2013).

Poznanie genu kodującego syntazę karnozynową (*CARNS1*, *ATPGD1*) stanowi „przełom w badaniach nad karnozyną” (Boldyrev i wsp., 2013). Osiągnięcie to, umożliwia precyzyjną

identyfikację tkanek i komórek, w których enzym jest wyrażany oraz daje możliwość poznania mechanizmów regulacji jego aktywności, przyczyniając się do pełnego zrozumienia jego roli fizjologicznej. Ponadto, możliwość przygotowania zwierząt pozbawionych funkcjonalnego genu *CARNS1* pozwala na identyfikację chorób zwierząt i człowieka, w których zaangażowana jest karnozyna i związki pokrewne.

#### Główne osiągnięcia poznawcze

Uzyskane w tej pracy wyniki pozwoliły na:

- wykazanie, że syntezie karnozyny z  $\beta$ -alaniny oraz L-histydyny towarzyszy hydroliza ATP z wytworzeniem ADP i  $P_i$ , a nie AMP oraz  $PP_i$  jak dotychczas sądzono (Kalyankar i Meister, 1959; Boldyrev i wsp., 2013),
- identyfikację genu kodującego syntazę karnozynową kręgowców jako *ATPGD1* (a obecnie *CARNS1*),
- określenie sekwencji otwartej ramki odczytu mRNA kodującego białko ATPGD1 kury domowej,
- uzyskanie preparatów homogennej rekombinowanej syntazy karnozynowej człowieka i myszy oraz wysoce oczyszczonego enzymu kury domowej, a także wykonanie charakterystyki biochemicznej reakcji katalizowanej przez te białka.

---

**Publikacja** Drożak J, Chrobok L, Poleszak O, Jagielski AK, Derlacz R. (2013) **Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-methyltransferase-like protein (hnmt-like)**. *PLoS One.*, 8: e64805.

---

W publikacji przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do identyfikacji *N*-metylotransferazy karnozynowej ptaków i gadów jako białka podobnego do *N*-metylotransferazy histaminowej (ang. *histamine N-methyltransferase-like protein*, HNMT-like, UniProtKB: U3NEE3). Doświadczenia prowadzono w ramach, kierowanego przeze mnie, projektu „Molekularna i biochemiczna charakterystyka *N*-metylotransferazy karnozynowej (EC 2.1.1.22)” (grant MNiSW, Iuventus Plus Nr 0081/P01/2010/70), realizowanego w latach 2010-2011.

Wykorzystując test radioizotopowy do śledzenia zmian aktywności *N*-metylotransferazy karnozynowej podczas jej oczyszczania z mięśni piersiowych kury z użyciem chromatografii jonowymiennej oraz sączenia molekularnego uzyskano preparat enzymu oczyszczony około 640-krotnie. Identyfikacja białek tego preparatu techniką MS/MS umożliwiła mi wytypowanie białka „HNMT-like” jako potencjalnej *N*-metylotransferazy karnozynowej. Analiza porównawcza sekwencji białka HNMT-like oraz sekwencji właściwej *N*-metylotransferazy histaminowej (HNMT)

kury potwierdziła, że choć enzymy te są ze sobą spokrewnione, to najpewniej katalizują metylację odmiennych chemicznie substratów.

Wykorzystując homogenne rekombinowane białko HNMT-like kury oraz preparat oczyszczonego natywnego enzymu, wykonano charakterystykę biochemiczną *N*-metylotransferazy karnozynowej. Wykorzystując metody chromatograficzne oraz analizę MS/MS stwierdziłem, że anseryna ( $\beta$ -alanylo-*N* $\pi$ -metylo-L-histydyna) jest jedynym produktem aktywności białka HNMT-like. Ustaliłem typ kinetyki enzymatycznej badanej reakcji (Michaelisa-Menten), wyznaczyłem podstawowe parametry kinetyczne ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ) oraz określiłem specyficzność substratową badanego enzymu, potwierdzając jego wysoką swoistość względem karnozyny.

Ponadto, analizując informacje dostępne w publicznych bazach danych (GenBank, Uniprot) wykazałem, że: (i) gen *HNMT-like* jest prawdopodobnie paralogiem genu *HNMT*, powstałym w wyniku duplikacji genu źródłowego, która zaszła u wspólnego przodka gadów i ptaków (zauropsydy), (ii) podobne duplikacje źródłowego genu *HNMT(-like)* miały miejsce także we wcześniejszych etapach ewolucji kręgowców (np. u przodka ryb) oraz (iii) gen kodujący aktywność *N*-metylotransferazy karnozynowej (*HNMT-like*) u zauropsydów nie występuje w genomach ssaków.

Mając na uwadze powyższe wyniki oraz fakt, że wielokrotnie potwierdzono obecność w tkankach ssaków reakcji metylacji karnozyny z wytworzeniem anseryny, uzyskane dane wskazały na możliwość istnienia u ssaków odmiennego i niespokrewnionego z *HNMT-like* genu kodującego *N*-metylotransferazę karnozynową. Zatem identyfikacja genu kodującego *N*-metylotransferazę karnozynową gadów i ptaków nie tylko otwiera możliwość dalszych badań, które najpewniej zaowocują dogłębnym poznaniem roli fizjologicznej anseryny u tej grupy zwierząt, lecz także dostarczą zupełnie nowych informacji o ewolucji badanej aktywności enzymatycznej u kręgowców.

#### *Główne osiągnięcia poznawcze*

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy umożliwiły :

- identyfikację genu kodującego *N*-metylotransferazę karnozynową ptaków i gadów jako *HNMT-like*,
- szczegółową charakterystykę biochemiczną reakcji katalizowanej przez homogenną rekombinowaną *N*-metylotransferazę karnozynową kury domowej,
- wysunięcie hipotezy odnośnie istnienia odmiennego genu kodującego *N*-metylotransferazę karnozynową u ssaków.

---

**Publikacja:** Drożak J, Piecuch M, Poleszak O, Kozłowski P, Chrobok L, Baelde HJ, de Heer E. (2015) **UPF0586 Protein C9orf41 Homolog Is Anserine-Producing Methyltransferase.** *J Biol Chem.*, 290: 17190-205.

---

W publikacji przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do identyfikacji *N*-metylotransferazy karnozynowej ssaków jako białka C9orf41 (także UPF0586, UniProtKB: Q5BJZ6). Doświadczenia prowadzono w ramach, kierowanego przeze mnie, projektu „*Molekularna oraz biochemiczna charakterystyka białka C9orf41 eukariontów.*” (grant NCN, Opus-6 Nr 2013/11/B/NZ1/00078), realizowanego w latach 2014-2016.

Wykorzystując metody chromatograficzne (chromatografia jonowymienna, sączenie molekularne oraz chromatografia powinowactwa) oczyszczono około 2600-krotnie białko wykazujące aktywność *N*-metyltransferazy karnozynowej w mięśniach szkieletowych szczura. Stosując metodę MS/MS w celu precyzyjnego ustalenia składu białkowego oczyszczonego preparatu oraz analizę porównawczą sekwencji aminokwasowych zidentyfikowanych białek, wytypowałem białko UPF0586 protein C9orf41 homolog (UPF0586) jako potencjalną *N*-metylotransferazę karnozynową szczura.

Ponieważ występowanie ortologów białka UPF0586 stwierdzono także u organizmów, które dotychczas uważano za pozbawione możliwości biosyntezy anseryny (np. drożdże piekarnicze, człowiek), przygotowano homogenne rekombinowane białka UPF0586 człowieka, szczura, kury domowej oraz drożdży piekarniczych i wykonano ich szczegółową charakterystykę biochemiczną. Wyniki analizy chromatograficznej oraz MS/MS potwierdziły, że produktem aktywności tych białek jest anseryna. Ustalono rodzaj kinetyki enzymatycznej badanej reakcji (Michaelisa-Menten), wyznaczono jej podstawowe parametry kinetyczne ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ) oraz określono optima temperaturowe i pH, a także swoistość substratową badanych enzymów. Wykazano, że wszystkie białka katalizują metylację także innych di- oraz tripeptydów zawierających *L*-histydynę, co może wskazywać na istnienie odmiennego od karnozyny substratu tych enzymów, np. C- terminalnej reszty histydynowej w niezidentyfikowanym białku. Obserwacja ta znalazła wstępne potwierdzenie w wynikach doświadczeń, które ujawniły obecność ssaczych ortologów białka UPF0586 (jako białek fuzyjnych z białkiem EGFP) zarówno w cytozolu jak i jądrach komórek linii HeLa. Ponieważ biosynteza anseryny zachodzi w cytozolu, obecność *N*-metylotransferazy karnozynowej w jądrze komórkowym może świadczyć m.in. o obecności innych jego substratów.

Ze względu na brak anseryny w tkance mięśniowej człowieka uważano dotychczas, że u człowieka, jako jedyne ssaka, nie występuje *N*-metyltransferaza karnozynowa (Boldyrev i wsp., 2013). Przedstawione w omawianej publikacji wyniki przeczą tej hipotezie, a pomiary poziomu mRNA kodującego ludzkie białko UPF0586 wykazały jego obecność w nerkach, lecz nie w mięśniach, sugerując istotne znaczenie anseryny w fizjologii nerek człowieka. Co istotne,

obecność wysokich stężeń anseryny w korze nerek człowieka została ostatnio potwierdzona doświadczalnie (Peters i wsp., 2015), a utracie genu kodującego białko UPF0586 towarzyszą zaburzenia funkcji tego narządu (Baglietto i wsp., 2014).

Poznanie genu kodującego *N*-metylotransferazę karnozynową ssaków stanowi ostateczne rozwiązanie problemu molekularnej podstawy biosyntezy anseryny u kręgowców, lecz jednocześnie rodzi nowe pytania dotyczące roli białka UPF0586 u organizmów niewytwarzających dipeptydów imidazolowych (drożdże piekarnicze) czy jego funkcji u człowieka.

### Główne osiągnięcia poznawcze

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy pozwoliły na:

- identyfikację genu kodującego *N*-metylotransferazę karnozynową ssaków jako *C9orf41* (obecnie *CARNMT1*),
- uzyskanie homogennej rekombinowanej *N*-metylotransferazy karnozynowej człowieka, szczura, kury domowej oraz drożdży piekarniczych i wykonanie szczegółowej charakterystyki biochemicznej reakcji katalizowanej przez te białka,
- wykazanie możliwości istnienia odmiennego substratu dla *N*-metylotransferazy karnozynowej, zwłaszcza u organizmów niewytwarzających dipeptydów imidazolowych,
- ustalenie, że w organizmie człowieka najprawdopodobniej zachodzi reakcja metylacji karnozyny z wytworzeniem anseryny.

---

**Publikacja:** Drożak J, Veiga-da-Cunha M, Kadziolka B, Van Schaftingen E. (2014) **Vertebrate Acyl CoA synthetase family member 4 (ACSF4-U26) is a  $\beta$ -alanine-activating enzyme homologous to bacterial non-ribosomal peptide synthetase.** *FEBS J.*, 281: 1585-97.

---

W pracy przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do identyfikacji nowego, dotychczas nieopisanego enzymu metabolizmu  $\beta$ -alaniny u kręgowców. Doświadczenia były prowadzone we współpracy z zespołem prof. Emila Van Schaftingena (Instytut de Duve, Belgia) w ramach kierowanego przeze mnie projektu „*Molecular and biochemical characterization of Acyl-CoA Synthetase Family Member 4, a mysterious enzyme of mammals*” (grant Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, HOMING PLUS/2010-2/2), realizowanego w Zakładzie Regulacji Metabolizmu Uniwersytetu Warszawskiego w latach 2011-2013.

Ze względu na to, że (i) analiza sekwencji poznanych genomów kręgowców wykazała, że enzym 4 należący do rodziny syntetaz acylo-CoA (ang. *Acyl CoA synthetase family member 4*, ACSF4, UniProtKB: Q4L235) jako jedyny posiada wyraźne pokrewieństwo z owadźm białkiem Ebony (UniProtKB: O76858), enzymem katalizującym kondensację  $\beta$ -alaniny z histaminą z wytworzeniem  $\beta$ -alanylohistaminy (karcyniny) (Richardt i wsp. 2003), (ii) analiza porównawcza

sekwencji aminokwasowej domeny katalizującej aktywację substratu w białku ACSF4 sugerowała, że jego substratem może być glicyna lub  $\beta$ -alanina oraz (iii) przewidywany mechanizm reakcji katalizowanej przez ACSF4 odpowiadał domniemanemu mechanizmowi biosyntezy karnozyny opisanemu przez Kalyankara i Meistera (1959), białko ACSF4 zostało wytypowane jako potencjalnie nowa forma syntazy karnozynowej, odmienna od białka ATPGD1.

Enzym ACSF4 jest dużym białkiem (120 kDa), występującym u wszystkich eukariontów z wyłączeniem grzybów, w strukturze którego można wyróżni 3 domeny: adenylującą, tiolującą oraz podobną do domeny PQQDH (PQQDH-related). Domena adenylująca aktywuje aminokwas, katalizując syntezę jego adenylanu (aminoacylo-AMP), a następnie reszta aminoacylowa jest przenoszona na 4'-fosfopanteteinę, grupę prostetyczną związaną z domeną tiolującą. Funkcja domeny „PQQDH-related” pozostaje nieznana.

Wykorzystując test radioizotopowy wykazałem, że homogeny rekombinowany enzym ACSF4 myszy swoiście aktywuje [ $^3\text{H}$ ] $\beta$ -alaninę, tworząc kowalencyjne wiązanie tioestrowe pomiędzy grupą prostetyczną a radioaktywnym aminokwasem. Reakcja jest ściśle zależna od hydrolizy ATP oraz w mniejszym stopniu innych nukleotydów. Enzym wykazuje zarówno wysokie powinowactwo ( $K_M = 6 \mu\text{M}$ , kinetyka Michaelisa-Menten) jak i dużą swoistość substratową względem  $\beta$ -alaniny. Spośród badanych analogów strukturalnych  $\beta$ -alaniny, jedynie 2-metylo- $\beta$ -alanina wpływała nieznacznie na szybkość aktywacji badanego aminokwasu w testach współzawodniczych.

Badając transfer aktywnej  $\beta$ -alaniny z grupy prostetycznej enzymu na potencjalne drobnocząsteczkowe akceptory stwierdziłem, że enzym katalizuje przeniesienie  $\beta$ -alaniny wyłącznie na związki sulfhydrylowe (DTT, cysteamina, L-cysteina), lecz nie na L-histydynę lub histaminę i inne aminy biogenne. Enzym ACSF4 nie jest zatem syntazą karnozynową ani nie wykazuje aktywności białka Ebony. Ponadto wykazałem, że reakcja  $\beta$ -alanylacji związków sulfhydrylowych ma najpewniej charakter ubocznej reakcji transtioestryfikacji i rearanżacji typu „ $N \rightarrow S$  acyl shift”, która nie ma znaczenia fizjologicznego i zachodzi w środowisku reakcji pozbawionym naturalnego akceptora  $\beta$ -alaniny. Podobne zjawisko zaobserwowano wcześniej dla reakcji aktywacji aminokwasów przez syntetazę aminoacylo-tRNA (Jakubowski, 1995). Ponieważ obserwowane reakcje są także katalizowane przez enzym ACSF4 pozbawiony domeny „PQQDH-related”, wydaje się, że domena ta nie bierze udziału w katalizie badanych reakcji. Natomiast analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej tej domeny sugeruje, że może ona warunkować oddziaływanie enzymu ACSF4 z innym białkiem.

Niestety mimo znacznego wysiłku badawczego nie udało się nam zidentyfikować fizjologicznego akceptora aktywnej  $\beta$ -alaniny lub chociażby białek oddziałujących z enzymem ACSF4. Należy jednak podkreślić, że produkt aktywności enzymu ACSF4 jest z pewnością

związkiem nowym i dotychczas nie opisanym w literaturze. Tym samym może być on np. nową cząsteczką sygnałową, pierwszym metabolitem w nowym szlaku metabolicznym lub nieznaną modyfikacją białek lub RNA o istotnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania komórki.

### *Główne osiągnięcia poznawcze*

Podsumowując, w tej pracy wykonano podstawową charakterystykę biochemiczną enzymu ACSF4, tj. wyznaczono parametry kinetyczne reakcji i określono swoistość substratową enzymu oraz wykazano, że:

- białko ACSF4 jest nowym enzymem metabolizmu  $\beta$ -alaniny u kręgowców, a produkt katalizowanej przez niego reakcji nie został dotychczas zidentyfikowany,
- dotychczasowe zamieszczone w piśmiennictwie informacje o znaczeniu enzymu ACSF4 w metabolizmie lizyny u kręgowców są błędne (Kasahara i Kato, 2003).

### **PODSUMOWANIE**

Wyniki przedstawione w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowią nie tylko istotny wkład w wiedzę o metabolizmie  $\beta$ -alaniny oraz molekularnych i biochemicznych mechanizmach biosyntezy karnozyny i anseryny, lecz otwierają także perspektywy nowych badań z zakresu genetyki, biochemii i fizjologii kręgowców. Uzyskane dane spotkały się z żywym zainteresowaniem społeczności naukowej, czego wyrazem jest ich cytowanie w pracach innych badaczy oraz fakt otrzymania przeze mnie zaproszenia do wygłoszenia 2 referatów na kongresie i sympozjum na temat identyfikacji genu *N*-metylotransferazy karnozynowej kury domowej - podczas „*Annual Carnosine Symposium*”, Leiden, Holandia, 28 sierpnia 2013 roku oraz „*International Congress on Carnosine and Anserine*”, który odbył się w dniach 5-7 sierpnia 2014 roku w Tokio, Japonia.

Realizacja niniejszego osiągnięcia nie byłaby możliwa bez wykorzystania zarówno klasycznych jak i najnowszych metod z zakresu biochemii i biologii molekularnej. Wymagało to ode mnie zorganizowania, zupełnie od podstaw, pracowni biologii molekularnej, gdyż metody i techniki swoiste dla tej nauki nie były dotychczas stosowane w Zakładzie Regulacji Metabolizmu Uniwersytetu Warszawskiego. Należy tutaj podkreślić, że zdecydowana większość przedstawionych wyników została uzyskana w Zakładzie Regulacji Metabolizmu. Było to możliwe także dzięki pozyskaniu przez Zakład w ramach projektu Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii (CePT, 2008-2015), finansowanego z funduszy Unii Europejskiej (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013, priorytet 2, działanie 2.2.) nowoczesnego tandemowego spektrometru mas, umożliwiającego badania proteomiczne oraz fragmentacyjne analizy budowy chemicznej związków drobnocząsteczkowych.

## PLANY NAUKOWE

W nadchodzących latach planuję realizację projektów badawczych dotyczących następujących zagadnień:

- identyfikacja endogennego substratu białka UPF0586 u organizmów niewytwarzających dipeptydów imidazolowych (drożdże piekarnicze, rzodkiewnik pospolity) oraz określenie znaczenia fizjologicznego powstającego produktu,
- identyfikacja molekularna i charakterystyka biochemiczna enzymów katalizujących metylacje reszt histydynowych swoistych białek u kręgowców. Badania te będą miały na celu poznanie tożsamości molekularnej bardzo słabo poznanej grupy enzymów metylujących białka takie jak  $\beta$ -aktyna i kinaza łańcucha lekkiego miozyny, co będzie pomocne w ustaleniu roli fizjologicznej tych modyfikacji potranslacyjnych.

## PIŚMIENNICTWO

- Baglietto MG**, Caridi G, Gimelli G, Mancardi M, Prato G, Ronchetto P, Cuoco C, Tassano E. (2014) RORB gene and 9q21.13 microdeletion: report on a patient with epilepsy and mild intellectual disability. *Eur J Med Genet.* 57: 44-6.
- Bauer K.** (2005) Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. *Neurochem Res.* 30: 1339-45.
- Boldyrev AA**, Aldini G, Derave W. (2013) Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev.* 93: 1803-45.
- Boldyrev AA.** (2007) Carnosine and Oxidative Stress in Cells and Tissues, Nova Scientific Publisher, New York
- Bradbury LM**, Niehaus TD, Hanson AD. (2013) Comparative genomics approaches to understanding and manipulating plant metabolism. *Curr Opin Biotechnol.* 24: 278-84
- Drożak J**, Van Schaftingen E, and Veiga-Da-Cunha M (2015) The Biochemistry of Enzymes Producing Carnosine and Anserine. W: Preedy VR (red.), *Imidazole Dipeptides : Chemistry, Analysis, Function and Effects* (s. 99-114). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Hanson AD**, Pribat A, Waller JC, de Crécy-Lagard V. (2009) 'Unknown' proteins and 'orphan' enzymes: the missing half of the engineering parts list--and how to find it. *Biochem J.* 425: 1-11
- Jakubowski H.** (1995) Synthesis of cysteine-containing dipeptides by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* 23: 4608-15
- Kalyankar GD**, Meister A. (1959) Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. *J Biol Chem.* 234: 3210-8
- Karp PD.** (2004) Call for an enzyme genomics initiative. *Genome Biol.* 5: 401
- Kasahara T**, Kato T. (2003) Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature.* 422: 832
- Lespinet O**, Labeledan B. (2006) ORENZA: a web resource for studying ORphan ENzyme activities. *BMC Bioinformatics.* 7: 436.
- McManus IR**, (1962) Enzymatic synthesis of anserine in skeletal muscle by N-methylation of carnosine. *J Biol Chem* 237: 1207-1211.
- Peters V**, Klessens CQ, Baelde HJ, Singler B, Veraar KA, Zutinic A, Drożak J, Zschocke J, Schmitt CP, de Heer E. (2015) Intrinsic carnosine metabolism in the human kidney. *Amino Acids.* In press, doi:10.1007/s00726-015-2045-7
- Pouliot Y**, Karp PD. (2007) A survey of orphan enzyme activities. *BMC Bioinformatics.* 8: 244.

**Richardt A**, Kemme T, Wagner S, Schwarzer D, Marahiel MA, Hovemann BT. (2003) Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. *J Biol Chem*. 278: 41160-6.

**Sorokina M**, Stam M, Médigue C, Lespinet O, Vallenet D. (2014) Profiling the orphan enzymes. *Biol Direct*. 9:10

**Van Schaftingen E**, Rzem R, Marbaix A, Collard F, Veiga-da-Cunha M, Linster CL. (2013) Metabolite proofreading, a neglected aspect of intermediary metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 36: 427-34.

**Veiga-da-Cunha M**, Chevalier N, Stroobant V, Vertommen D, Van Schaftingen E. (2014) Metabolite proofreading in carnosine and homocarnosine synthesis: molecular identification of PM20D2 as  $\beta$ -alanyl-lysine dipeptidase. *J Biol Chem*. 289: 19726-36.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

### *Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora*

Pracę naukową rozpocząłem od badań nad zależnością między metabolizmem glukozy, a stanem zredukowania środowiska wewnątrzkomórkowego, wykonywanych w ramach pracy magisterskiej pt. „Zmiany zawartości i stanu zredukowania wewnątrzkomórkowego glutationu w kanalikach kory nerki królika” pod opieką prof. dr hab. Jadwigi Bryły w Zakładzie Regulacji Metabolizmu Uniwersytetu Warszawskiego. Uzyskane wyniki dowiodły istnienia związku między szybkością biosyntezy glukozy *de novo* (glukoneogeneza), a stanem zredukowania glutationu w kanalikach nerkowych oraz wyjaśniły mechanizm tego zjawiska [Metabolism, 2003, 52: 739-746].

W trakcie pracy doktorskiej, której promotorem była prof. dr hab. Jadwiga Bryła, prowadziłem badania nad wyjaśnieniem mechanizmu hipoglikemicznego działania L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA, prekursor dopaminy) oraz selegiliny (inhibitor oksydazy monoaminowej B), podstawowych leków wykorzystywanych w terapii choroby Parkinsona u ludzi. Stwierdziłem, że L-DOPA zmniejsza szybkości syntezy glukozy w kanalikach nerkowych królika na skutek stresu oksydacyjnego, towarzyszącego wewnątrzkomórkowej degradacji tego leku [Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37: 1269-80]. Natomiast hamujące działanie selegiliny na syntezę glukozy w kanalikach nerkowych i hepatocytach wynika z zaburzenia wytwarzania energii w mitochondriach tych komórek [Chem Biol Interact, 2007, 170: 162-76].

Badania nad metabolizmem i działaniem L-DOPA i selegiliny wymagały ode mnie wdrożenia i opanowania nowych technik analitycznych (HPLC EC, HPLC IC/MS), co umożliwiło mi udział także w innych projektach badawczych o dość różnorodnej tematyce. Prace te dotyczyły:

- wyjaśnienia działania etanolu na metabolizm glukozy i aminokwasów w kanalikach nerkowych królików [Alcohol Alcohol, 2004, 39: 93-100],
- identyfikacji mechanizmu hipoglikemicznego działania wanadu, wolframu i molibdenu u królików [Mol Cell Biochem, 2004, 261: 9-21],

- określenia zmian stanu oksydoredukcyjnego glutationu oraz wytwarzania wolnych rodników hydroksylowych w kanalikach nerkowych królików z cukrzycą [Mol Cell Biochem, 2004, 261: 91-8],
- wykazania antyoksydacyjnego działania melatoniny u zwierząt z cukrzycą *in vivo* [J Pineal Res, 2006, 40: 168-76].

Większość opisanych powyżej badań była finansowana z grantu KBN „*Nowe potencjalne leki kontrolujące metabolizm glukozy w wątrobie i nerkach królika w warunkach normy i cukrzycy doświadczalnej*” (Nr 3P05A 049 25, 2003-2006, kierownik: prof. dr hab. Jadwiga Bryła), którego byłem głównym wykonawcą. Opublikowane prace zostały wyróżnione w latach 2004, 2005 oraz 2006 nagrodami zespołowymi J.M. Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za badania naukowe.

#### *Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora*

Po uzyskaniu stopnia doktora otrzymałem i przyjąłem propozycję odbycia stażu podoktorskiego w laboratorium prof. Emila Van Schaftingena w Instytucie de Duve na Katolickim Uniwersytecie w Louvain (Belgia). W rocznym okresie poprzedzającym wyjazd byłem zaangażowany w badania mające na celu ustalenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych wytypowanych nowych, potencjalnych leków przeciwcukrzycowych w ramach projektu „*Polski lek innowacyjny w terapii cukrzycy typu 2 oparty na mechanizmie oddziaływania poprzez receptory PPAR $\gamma$  - badania przedkliniczne*” (nr WKP\_1/1.4.1/1/2006/54/54/580) realizowanego przez konsorcjum naukowe zawiązane między Adamed Sp. z o.o., Uniwersytetem Warszawskim, Uniwersytetem Jagiellońskim oraz Akademią Medyczną w Gdańsku (2005-2008).

Ponadto kontynuując moje zainteresowanie wpływem leków na homeostazę glukozy u ssaków, badałem mechanizm hipoglikemcznego działania gatifloksacyny – antybiotyku z grupy fluorochinolonów. Dowiodłem, że gatifloksacyna zmniejsza szybkość procesu glukoenogenezy w nerkach i wątrobie królików, gdyż jest inhibitorem mitochondrialnego transportera pirogronianu w komórkach tych narządów [Eur J Pharmacol, 2008, 594: 39-43]. Równocześnie brałem aktywny udział w badaniach Zespołu Zakładu Regulacji Metabolizmu, które pozwoliły na:

- wykazanie antyoksydacyjnego działania melatoniny oraz tauryny w hodowlach pierwotnych kanalików nerkowych królika w warunkach wysokiego stężenia glukozy [J Pineal Res, 2007, 42: 203-9] oraz
- identyfikację mechanizmu hamowania syntezy glukozy w kanalikach nerkowych królika przez rosiglitazon z pominięciem aktywacji receptorów PPAR $\gamma$  [Biochem Cell Biol, 2008, 86: 396-404].

Po powrocie ze stażu podoktorskiego, utrzymując współpracę z zespołem prof. Van Schaftingena (Instytut de Duve, Belgia), kontynuowałem badania nad charakterystyką białka ACSF4 oraz identyfikacją molekularną *N*-metylotransferazy karnozynowej, wchodzące w skład przedstawionego powyżej w pkt 4 osiągnięcia naukowego. Jednocześnie, aktywnie uczestniczyłem w badaniach prowadzonych w Zakładzie Regulacji Metabolizmu oraz w pracach wykonywanych we współpracy z różnymi zespołami badawczymi z kraju i z zagranicy, które dotyczyły:

- wykorzystania techniki nanoUPLC-MS/MS do identyfikacji w surowicy krwi człowieka białek, potencjalnych markerów wskazujących na predyspozycję do rozwoju cukrzycy typu 2; Projekt „Opracowanie metody wykrywania markerów wskazujących na predyspozycję do rozwoju insulinooporności”; Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 2007-2013; kierownik: prof. dr hab. Marek Strączkowski, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
- określenia roli proinsulinowego peptydu C w regulacji glukoneogenezy w kanalikach nerkowych królika [Chem Biol Interact, 2014, 218: 12-9],
- wyjaśnienia mechanizmu hamowania wzrostu i inwazyjności glejaka wielopostaciowego w stanie niedoboru L-argininy [Amino Acids, 2015, 47: 199-212],
- identyfikacji oraz lokalizacji tkankowej procesów syntezy i degradacji dipeptydów imidazolowych w nerkach człowieka [Amino Acids, 2015 47: 2541-50].

Należy nadmienić, że nadal jest kontynuowana i rozwijana współpraca naukowa z zespołami prof. Emila Van Schaftingena z Instytutu de Duve (w zakresie charakterystyki enzymów sierocych), prof. Emila de Heer z Uniwersytetu w Lejdzie (w badaniach dotyczących znaczenia karnozyny i anseryny w nerkach człowieka) oraz dr Vereny Peters z Uniwersytetu w Heidelbergu (w zakresie fizjologicznych mechanizmów regulacji aktywności syntazy karnozynowej oraz *N*-metylotransferazy karnozynowej).

Podsumowując, w mojej pracy naukowej prowadziłem badania z zakresu biochemii i biologii molekularnej, które dotyczyły: 1) wpływu leków i hormonów na metabolizm glukozy w wątrobie oraz nerkach w warunkach normy i cukrzycy alloxanowej, 2) identyfikacji molekularnej, charakterystyki biochemicznej i określenia roli fizjologicznej enzymów szlaku biosyntezy dipeptydów imidazolowych oraz 3) badań proteomicznych surowicy krwi oraz komórek nowotworowych człowieka.

Na mój dorobek naukowy, poza 4 pracami stanowiącymi opisane powyżej osiągnięcie naukowe, składa się również 13 prac oryginalnych, 3 prace przeglądowe, 1 rozdział w książce oraz 10 doniesień zjazdowych.

Brałem udział w realizacji 6 grantów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Unię Europejską – Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Fundację na Rzecz Nauki Polskiej oraz Narodowe Centrum Nauki, w tym kierowałem trzema z nich.

Badania z moim udziałem zostały czterokrotnie wyróżnione Nagrodami J.M. Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za wybitne osiągnięcia naukowe.

## 6. Dane bibliometryczne

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania: **53,976**,  
(przed doktoratem: **18,444**; po doktoracie: **35,532**).

*Dla prac opublikowanych w roku 2015 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF<sub>2014</sub>.*

- Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitanta: **520**,  
(przed doktoratem: **215**; po doktoracie: **305**).
- Liczba cytowań wszystkich prac habilitanta (wg bazy Web of Science): **256**,  
(prace opublikowane przed doktoratem: **172**; prace opublikowane po doktoracie: **84**)
- Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy Web of Science): **8**.

Warszawa, dnia 14 grudnia 2015

.....*Jakub Drożak*.....