

## Autoreferat

### 1. Imię i nazwisko

**Piotr Marcin Kozłowski**

### 2. Posiadane stopnie naukowe

doktor nauk biologicznych w zakresie biologii molekularnej, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, 1997, "Identyfikacja i charakterystyka genów z rodziny *RAS* śluzowca *Physarum polycephalum*"

### 3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach akademickich lub naukowych

01.10.1987-28.02.1997	asystent, Zakład Biochemii Ogólnej (później Zakład Biologii Molekularnej), Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
01.03.1997-30.09.2012	adiunkt, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
w tym 01.06.1997-30.09.2000	staż podoktorancki w Department of Pharmacology, University of North Carolina at Chapel Hill, USA
od 01.10.2012	starszy wykładowca, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

### 4. Osiągnięcie naukowe

#### Charakterystyka eukariotycznego białka ERH

##### Wstęp

Gen *ERH* odkryto blisko 20 lat temu jako mutację u muszki *Drosophila melanogaster*, która pogłębiała fenotyp hipomorficznych mutacji w genie *rudimentary* (niedorozwój skrzydełek wywołany niedoborem pirymidyn i związany ze zmniejszeniem liczby i wielkości ich komórek; gen *rudimentary* koduje trzy pierwsze aktywności enzymatyczne szlaku *de novo* biosyntezy nukleotydów pirymidynowych) [1-3]. Z tego powodu, gen ten nazwano *enhancer of rudimentary* (a dla tych odkrytych u innych organizmów dodawano termin *homolog*) i zaproponowano bliżej nieokreślony udział białka ERH w regulacji metabolizmu pirymidyn [1].

Gen *ERH* występuje powszechnie u przedstawicieli wszystkich królestw *Eukaryota*, z wyjątkiem grzybów [4, 5]. Kodowane przez niego białko jest niewielkim polipeptydem (ok. 100 aa, ok. 12 kDa), którego sekwencja jest wysoce konserwowana ewolucyjnie (np. białka ERH człowieka i żaby *Xenopus laevis* są identyczne) [4-6]. Jednak, jego sekwencja nie jest podobna do żadnego innego białka i nie dostarcza żadnej informacji o jego aktywności biologicznej, roli w komórce czy wewnątrzkomórkowej lokalizacji, z wyjątkiem możliwości jego fosforylacji przez kinazę CK2 [4, 7]. Konsekwentnie, ERH wykazuje unikatową strukturę

III-rzędową (nowego typu pofałdowanie  $\alpha+\beta$ ) i jest to jedyny należycie poznany element z jego charakterystyki [5, 8].

Tym niemniej, pewne informacje o ERH pojawiały się przy okazji badań poświęconym innym białkom. Są to przede wszystkim wyniki wskazujące, iż ERH może być partnerem molekularnym pewnych białek, m.in. tych związanych z transkrypcją: DCoH [6], SPT5 [9], FCP1 [10] oraz MED31 [11]. Te obserwacje pojawiły się już po rozpoczęciu badań przede mną i poza interakcją z DCoH, nie były dotąd przedmiotem bardziej szczegółowych badań. Co do DCoH, zaproponowano, że ERH działa jako represor transkrypcji, hamując jego dimeryzację, przy czym, ponieważ DCoH jest białkiem występującym głównie w wątrobie i nerce, jego interakcja z ERH mogłaby zachodzić tylko w tych narządach [6]. Co dziwne, zważywszy na postulowaną rolę w transkrypcji, wskazano na cytoplazmatyczną lokalizację ERH w komórce ssaków [6]. Ostatnio opublikowano pracę pokazującą, że brak ERH powoduje zahamowanie mitozy w komórkach człowieka (nieprawidłowe ustawienie chromosomów w metafazie), wynikające z zaburzenia składania RNA (ang. *splicing*) dla pewnych białek, w tym istotnej dla migracji chromosomów kinezyiny CENP-E, co jest skutkiem braku oddziaływania ERH z czynnikiem składania RNA – białkiem SNRPD3 [12].

Moim celem była podstawowa charakterystyka białka ERH z próbą przybliżenia jego roli w komórce. Podstawowym modelem doświadczalnym były komórki ssaków (głównie człowieka, z linii HeLa), które zostały uzupełnione o drożdże rozszczepkowe *Schizosaccharomyces pombe*. Główne podejście polegało na identyfikacji partnerów białkowych ERH człowieka, z założeniem, że ich funkcje wskażą rolę tego białka w komórce.

Zakład Biologii Molekularnej UW jest obecnie jedynym laboratorium na świecie, w którym prowadzi się systematyczne, szeroko zakrojone badania nad białkiem ERH. Badania te były finansowane przez dwa indywidualne granty KBN/MNiSW. W eksperymentach w zasadzie uczestniczyli tylko magistranci wykonujący prace dyplomowe pod moim kierunkiem (współautorzy wskazani \*). Prowadzone przeze mnie badania nad ERH zostały wyróżnione Nagrodą Rektora UW za wybitne osiągnięcia naukowe. Większość uzyskanych wyników została opublikowana w postaci monotematycznego cyklu składającego się z czterech artykułów eksperymentalnych w anglojęzycznych, w pełni recenzowanych czasopismach naukowych. Najważniejsze z tych wyników omówione są poniżej, w kolejności logicznej prac.

## Wyniki

**Publikacja 1.** Smyk A\*, Szuminska M\*, Uniewicz KA\*, Graves LM, Kozłowski P (2006) **Human enhancer of rudimentary is a molecular partner of PDIP46/SKAR, a protein interacting with DNA polymerase  $\delta$  and S6K1 and regulating cell growth.** *FEBS J* 273: 4728-4741.

W tej pracy pokazano, przy pomocy mikroskopii konfokalnej, że ERH występuje w jądrze komórek ssaków, z pominięciem jąderek, w postaci rozdyfundowanej (Rys. 4) oraz, że gen *ERH* ulega ekspresji, na zbliżonym poziomie, we wszystkich podstawowych tkankach dorosłego człowieka i płodu, jest więc genem metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gene*) (Rys. 5). Przy pomocy drożdżowego systemu dwuhybrydowego

wskazano białko człowieka PDIP46/SKAR jako molekularnego partnera ERH (Rys. 1), co potwierdzono także za pomocą techniki *GST pull-down* i tandemowej spektrometrii mas (Rys. 3). Pokazano, że białko PDIP46/SKAR również występuje w jądrze komórki ssaków, z pominięciem jąderek (Rys. 4), zaś jego gen jest wyrażany, na dość wyrównanym poziomie, w tych samych tkankach człowieka, co gen *ERH* (Rys. 5). Dowodzi to, że białko PDIP46/SKAR jest prawdziwym powszechnym partnerem ERH w komórkach ssaków.

Białko PDIP46/SKAR jest również bardzo słabo poznane. Zostało odkryte jako partner białkowy polimerazy DNA  $\delta$ , enzymu odpowiedzialnego za elongację DNA przy jego replikacji, co nie zostało dalej zbadane [13]. Ponadto, PDIP46/SKAR jest partnerem kinazy S6K1, enzymu fosforylującego białko rybosomalne S6, a także inne białka, w tym PDIP46/SKAR i niezbędnego do wzrostu komórki [14]. PDIP46/SKAR jest gromadzone w skupiskach ziarnistości międzychromatynowych (ang. *nuclear speckles*), będących magazynami czynników składania RNA [15]. Po wycięciu intronów, wchodzi w skład kompleksów powstałych na styku eksonów w dojrzałym mRNA, rekrutując do nich kinazę S6K1, która fosforylując jeszcze inne swoje substraty, zwiększałaby ogólną syntezę białka przez komórkę (warunek konieczny dla wzrostu komórki) [15].

Dodatkowo zidentyfikowano dwa rejony w białku PDIP46/SKAR, które odpowiedzialne są za wiązanie białka ERH (Rys. 2 i 6) i wskazano, że pokrywają się one z rejonami określonymi przez innych [14], jako wiążący S6K1 oraz fosforylowany przez tę kinazę, przez co wiązanie ERH przez PDIP46/SKAR, blokowałoby oba te procesy.

**Publikacja 2.** Łukasik A\*, Uniewicz KA\*, Kulis M\*, Kozłowski P (2008) **Ciz1, a p21<sup>Cip1/Waf1</sup>-interacting zinc finger protein and DNA replication factor, is a novel molecular partner for human enhancer of rudimentary homolog.** *FEBS J* 275: 332-340.

W tej pracy, przy pomocy drożdżowego systemu dwuhybrydowego, wskazano białko człowieka Ciz1 jako następnego molekularnego partnera ERH (Rys. 1), co potwierdzono także za pomocą techniki *GST pull-down* i tandemowej spektrometrii mas (Rys. 2). Pokazano, że białko Ciz1 również występuje w jądrze komórki ssaków, z pominięciem jąderek, jednak w postaci dość licznych skupisk (Rys. 3), zaś jego gen jest wyrażany, na wyrównanym poziomie, w tych samych tkankach człowieka, co gen *ERH* (Rys. 4). Co więcej, kiedy ERH i Ciz1 są współwyrażane w jednej komórce, ERH jest rekrutowane do skupisk, w których występuje Ciz1, co potwierdza występowanie interakcji między nimi w żywej komórce (Rys. 3). Dowodzi to, że białko Ciz1 jest drugim powszechnym partnerem ERH w komórkach ssaków.

Białko Ciz1 jest także dość słabo poznane. Zostało odkryte jako partner białkowy p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, inhibitora kinaz zależnych od cyklin [16]. Ponadto, Ciz1 jest niezbędne do inicjacji replikacji DNA i wejścia komórek w fazę S cyklu komórkowego [17]. Większość Ciz1 występuje w skupiskach będących ogniskami replikacyjnymi (ang. *replication foci*), do których przypuszczalnie rekrutuje kompleks cykliny A z kinazą CDK2 [17, 18].

Dodatkowo zidentyfikowano rejon w białku Ciz1, który odpowiedzialny jest za wiązanie białka ERH (Rys. 5) i wskazano, że pokrywa się on z rejonem określonym przez innych [16],

jako wiążącym p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, przez co wiązanie ERH przez Ciz1, blokowałoby interakcję pomiędzy Ciz1 i p21<sup>Cip1/Waf1</sup>.

**Publikacja 3.** Banko MI\*, Krzyzanowski MK\*, Turcza P\*, Maniecka Z\*, Kulis M\*, Kozłowski P (2013) **Identification of amino acid residues of ERH required for its recruitment to nuclear speckles and replication foci in HeLa cells.** *PLoS ONE* 8: e74885.

W tej pracy pokazano, że w niektórych jądrach komórek ssaków, ERH także tworzy dość słabe skupiska, które są skupiskami ziarnistości międzychromatynowych (Rys. 1). Wskazano, że kiedy ERH i PDIP46/SKAR są współwyrażane w jednej komórce, ERH jest rekrutowane do skupisk ziarnistości międzychromatynowych, w których występuje PDIP46/SKAR, co potwierdza występowanie interakcji między nimi w żywej komórce (Rys. 2). Ponadto pokazano, że w trakcie mitozy, kiedy zanika błona jądrowa, ERH występuje w cytoplazmie, w szczególności zaś, nie wchodzi w skład skondensowanej chromatyny (chromosomów) (Rys. 1). Używając metody skanowania alaninowego, zidentyfikowano reszty aminokwasowe w ERH niezbędne do jego rekrutacji do skupisk ziarnistości międzychromatynowych lub ognisk replikacji (Rys. 3). Stanowi to także dodatkowy dowód na zachodzenie obu badanych interakcji (z PDIP46/SKAR i Ciz1) w żywych komórkach. Brak tych interakcji u zmutowanych form ERH potwierdzony został także techniką *GST pull-down* (Rys. 4). Dodatkowo wykluczono wpływ potencjalnej fosforylacji ERH przez kinazę CK2 na jego rekrutację do obu analizowanych substruktur jądrowych (Rys. 3 i Tab. 1). Wskazano także na możliwość, iż ERH jest transportowany do jądra komórkowego, poprzez "jazdę na plecach" z udziałem swoich jądrowych partnerów (Rys. 3).

Struktura przestrzenna ERH jest pofaldowaniem typu  $\alpha+\beta$ , gdzie 4 nici  $\beta$  tworzą płaszczyznę, z 3 helisami  $\alpha$  po jednej z jej stron [5, 8]. ERH może tworzyć homodimer, za pośrednictwem tej płaszczyzny [5, 8].

Dodatkowo pokazano, że ERH oddziałuje z PDIP46/SKAR za pomocą płaszczyzny będącej interfejsem do tworzenia homodimeru ERH, zatem PDIP46/SKAR mógłby oddziaływać tylko z monomerem (Rys. 6). Z kolei, Ciz1 oddziałując z przeciwną stroną ERH, mógłby wiązać się zarówno z monomerem jak i homodimerem ERH (Rys. 6).

**Publikacja 4.** Krzyzanowski MK\*, Kozłowska E, Kozłowski P (2012) **Identification and functional analysis of the *erh1*<sup>+</sup> gene encoding enhancer of rudimentary homolog from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** *PLoS ONE* 7: e49059.

W tej pracy pokazano, że wbrew pierwotnemu raportowi o sekwencjonowaniu genomu drożdży rozszczepkowych *S. pombe* [19], ich genom, a także genomy trzech pozostałych gatunków z rodzaju *Schizosaccharomyces*, posiadają gen *ERH* (Rys. 1), tak jak zresztą liczne grzyby niższe, choć inne grzyby wyższe (workowce i podstawczaki), w tym drożdże *Saccharomyces cerevisiae* i inne prominentne organizmy modelowe należące do tej grupy grzybów, rzeczywiście nie posiadają tego genu. Białka ERH gatunków z rodzaju *Schizosaccharomyces* wykazują 52-85% podobieństwa między sobą (Rys. 1), przy czym takie

stosunkowo niskie wartości są typowe dla innych genów w genomach z tego rodzaju [20]. Mimo, że białko ERH z *S. pombe* wykazuje tylko 28% podobieństwa do sekwencji aminokwasowej ERH człowieka, modelowanie przez homologię pokazało, że jego struktura przestrzenna jest identyczna ze strukturą białka człowieka (Rys. 1). Gen *ERH* ulega ekspresji, na dość wyrównanym poziomie, przez cały cykl życiowy *S. pombe* (Rys. 2). W komórkach drożdży, białko ERH jest obecne głównie w jądrze, z pominięciem jąderek (Rys. 2). Komórki drożdży, u których usunięto gen *ERH*, wykazywały lekką deformację kształtu, słabszy wzrost na pożywce minimalnej (Rys. 3), zwiększoną wrażliwość na stres genotoksyczny, hiperosmotyczny czy działający na błonę komórkową oraz podwyższony arest w fazie G1, po przeniesieniu do pożywki bez azotu, indukującej koniugację (Rys. 4), przy czym większość tych efektów była nasiloną na tle auktotroficznym. Ekspresja genu *ERH* człowieka mogła częściowo znosić niektóre z tych defektów, jednak białko ERH drożdży nie wchodziło w interakcję z białkami PDIP46/SKAR i Ciz1 człowieka (Rys. 5), przy czym drożdże nie posiadają oczywistych homologów tych białek.

### Podsumowanie

Poza pracami nad genem *ERH* u *D. melanogaster* prowadzonymi przez jego odkrywcę oraz ustaleniem struktury przestrzennej ERH przez zespoły zajmujące się rutynowo rozwiązywaniem struktur kolejnych białek, ERH nie było dotąd obiektem systematycznych badań naukowych. W trakcie swoich badań dokonałem szeregu nowych ustaleń, a także byłem zmuszony korygować niektóre dane uzyskane wcześniej przez inne zespoły badawcze.

Ustalono wzór ekspresji tkankowej genu *ERH* i wewnątrzkomórkową lokalizację białka ERH u człowieka. Zidentyfikowano dwóch partnerów białka ERH człowieka i pokazano, że do interakcji z ERH może dochodzić w jądrach komórkowych wszystkich tkanek człowieka. Scharakteryzowano jego interakcje z nimi poprzez: (1) pokazanie, że w żywych komórkach człowieka, ERH jest rekrutowane do substruktur jądrowych, w których występują jego partnerzy, (2) ustalenie rejonów u partnerów odpowiedzialnych za wiązanie ERH oraz (3) ustalenie reszt aminokwasowych w ERH odpowiedzialnych za wiązanie się z partnerami i jego rekrutację do analizowanych substruktur jądrowych. Jak dotąd, obie te interakcje są jedynymi interakcjami z udziałem białka ERH tak dogłębnie scharakteryzowanymi. Uzyskane mutanty *ERH* są bardzo dogodnymi narzędziami molekularnymi do prowadzenia badań nad mechanizmem działania ERH w obu substrukturach jądrowych. Ponadto, zidentyfikowano gen *ERH* u drożdży *S. pombe* (oraz trzech pozostałych gatunków z tego rodzaju), ustalono jego wzór ekspresji w cyklu życiowym i wewnątrzkomórkową lokalizację białka ERH oraz dokonano analizy funkcjonalnej *ERH*. Jest to dotąd jedyny scharakteryzowany homolog *ERH* u niższych *Eukaryota*.

Generalnie, prowadzone przeze mnie studia nad ERH doprowadziły do słabo scharakteryzowanej części proteomu człowieka, która jednak wydaje się brać udział w kluczowych procesach dla funkcjonowania komórki – replikacji DNA czy regulacji jej wzrostu.

P. K.

Uzyskane wyniki pozwalają na przedstawienie następującej charakterystyki białka ERH.

- Gen kodujący ERH był obecny w genomie ostatniego wspólnego przodka organizmów eukariotycznych. W przypadku grzybów wyższych, z wyjątkiem rodzaju *Schizosaccharomyces*, został on utracony w trakcie ewolucji.
- Gen kodujący ERH jest genem metabolizmu podstawowego. Jest wyrażany na dość wyrównanym poziomie we wszystkich podstawowych tkankach człowieka dorosłego i płodu oraz stadiach cyklu życiowego drożdży rozszczepkowych *S. pombe*.
- ERH jest wysoce konserwowane ewolucyjnie, nie tylko pod względem swojej sekwencji, co ma miejsce zwłaszcza u kręgowców, ale także, pod względem struktury III-rzędowej.
- ERH występuje w nukleoplazmie, w trakcie interfazy. Przynajmniej w jądrach komórek ssaków, może tworzyć skupiska, których część jest skupiskami ziarnistości międzychromatynowych. W trakcie mitozy wypełnia całą cytoplazmę, z wyłączeniem przestrzeni zajętej przez skondensowaną chromatynę. ERH jest prawdopodobnie transportowane do jądra przy udziale swoich jądrowych partnerów.
- ERH posiada co najmniej dwóch powszechnych, jądrowych partnerów w organizmach ssaków: PDIP46/SKAR oraz Ciz1. Partnerzy ci mogą rekrutować ERH do substruktur jądrowych, w których występują, odpowiednio, do skupisk ziarnistości międzychromatynowych i ognisk replikacji. Rekrutacja ta wynika z ich bezpośredniego oddziaływania z ERH i nie jest zależna od postulowanej fosforylacji ERH przez kinazę CK2.
- ERH tworzy kompleksy z szeregiem białek zaangażowanych w kluczowy dla funkcjonowania komórki metabolizm kw. nukleinowych: syntezę DNA (replikację; wiązanie się z Ciz1, a możliwe, że także z PDIP46/SKAR), syntezę RNA (transkrypcję; wiązanie się z kilkoma białkami postulowanych przez inne zespoły badawcze, w tym z DCoH) czy obróbkę pre-mRNA (wycinanie intronów; wiązanie się z PDIP46/SKAR, a także ze wskazanym przez innych SNRPD3). ERH mogłoby pełnić rolę regulatora aktywności tych białek, poprzez blokowanie ich oddziaływania z pozostałymi składnikami kompleksów, czyli działając jako "molekularna zaślepka", co na poziomie komórkowym przekładałoby się na jego udział w regulacji / koordynacji podziału komórki (interakcja z Ciz1) i jej wzrostu (interakcja z PDIP46/SKAR) (oczywiście, to jest jeszcze do udowodnienia).
- Metabolizm kw. nukleinowych stanowi część metabolizmu pirymidyn, które są w postaci nukleotydów prekursorami do ich biosyntezy. Zatem, zaburzenia metabolizmu kw. nukleinowych rzeczywiście mogłyby pogłębiać deformację skrzydełek u *D. melanogaster*, wywołany niedoborem pirymidyn. Tym bardziej, iż ten defekt związany jest ze zmianą liczby i wielkości komórek w skrzydełkach.
- U niższych *Eukaryota*, w tym *S. pombe*, nie występują oczywiste homologii PDIP46/SKAR i Ciz1, a więc ERH musi oddziaływać u tych drożdży z innymi białkami, biorąc udział w reakcji na nieprzychylnne warunki otoczenia i wpływając na przebieg cyklu komórkowego.

P.K.

## Literatura

1. Wojcik E, Murphy AM, Fares H, Dang-Vu K, Tsubota SI (1994) *Enhancer of rudimentary*<sup>p1</sup>, *e(r)*<sup>p1</sup>, a highly conserved enhancer of the *rudimentary* gene. *Genetics* 138: 1163-1170.
2. Jones ME (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 49: 253-279.
3. Fausto-Sterling A, Hsieh L (1976) Studies on the female-sterile mutant *rudimentary* of *Drosophila melanogaster*. *Develop Biol* 51: 269-281.
4. Gelsthorpe M, Pulumati M, McCallum C, Dang-Vu K, Tsubota SI (1997) The putative cell cycle gene, *enhancer of rudimentary*, encodes a highly conserved protein found in plants and animals. *Gene* 186: 189-195.
5. Wan C, Tempel W, Liu ZJ, Wang BC, Rose RB (2005) Structure of the conserved transcriptional repressor enhancer of rudimentary homolog. *Biochemistry* 44: 5017-5023.
6. Pogge von Strandmann E, Senkel S, Ryffel GU (2001) ERH (enhancer of rudimentary homologue), a conserved factor identical between frog and human, is a transcriptional repressor. *Biol Chem* 382: 1379-1385.
7. Gelsthorpe ME, Tan Z, Phillips A, Eissenberg JC, Miller A, et al. (2006) Regulation of the *Drosophila melanogaster* protein, enhancer of rudimentary, by casein kinase II. *Genetics* 174: 265-270.
8. Jin T, Guo F, Serebriiskii IG, Howard A, Zhang YZ (2007) A 1.55 Å resolution X-ray crystal structure of HEF2/ERH and insights into its transcriptional and cell-cycle interaction networks. *Proteins* 68: 427-437.
9. Kwak YT, Guo J, Prajapati S, Park KJ, Surabhi RM, et al. (2003) Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell* 11: 1055-1066.
10. Amente S, Napolitano G, Licciardo P, Monti M, Pucci P, et al. (2005) Identification of proteins interacting with the RNAPII FCP1 phosphatase: FCP1 forms a complex with arginine methyltransferase PRMT5 and it is a substrate for PRMT5-mediated methylation. *FEBS Lett* 579: 683-689.
11. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, et al. (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 122: 957-968.
12. Weng MT, Lee JH, Wei SC, Li Q, Shahamatdar S, et al. (2012) Evolutionarily conserved protein ERH controls CENP-E mRNA splicing and is required for the survival of KRAS mutant cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E3659-E3667.
13. Liu L, Rodriguez-Belmonte EM, Mazloun N, Xie B, Lee MYWT (2003) Identification of a novel protein, PDIP38, that interacts with the p50 subunit of DNA polymerase  $\delta$  and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 278: 10041-10047.
14. Richardson CJ, Bröenstrup M, Fingar DC, Jülich K, Ballif BA, et al. (2004) SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol* 14: 1540-1549.
15. Ma XM, Yoon SO, Richardson CJ, Jülich K, Blenis J (2008) SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* 133: 303-313.
16. Mitsui K, Matsumoto A, Ohtsuka S, Ohtsubo M, Yoshimura A (1999) Cloning and characterization of a novel p21<sup>Cip1/Waf1</sup>-interacting zinc finger protein, Ciz1. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 457-464.
17. Coverley D, Marr J, Ainscough J (2005) Ciz1 promotes mammalian DNA replication. *J Cell Sci* 118: 101-112.
18. Copeland NA, Sercombe HE, Ainscough JF, Coverley D (2010) Ciz1 cooperates with cyclin-A-CDK2 to activate mammalian DNA replication in vitro. *J Cell Sci* 123: 1108-1115.
19. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871-880.
20. Rhind N, Chen Z, Yassour M, Thompson DA, Haas BJ, et al. (2011) Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science* 332: 930-936.

### 5. Inne prace naukowo-badawcze

Pracę naukową rozpocząłem od badań nad genem *ota* (gen szlaku katabolizmu argininy) u grzyba nitkowatego *Aspergillus nidulans* wykonywanych w ramach pracy magisterskiej "Charakterystyka transformantów *Aspergillus nidulans ota*<sup>+</sup> oraz próba izolacji plazmidu niosącego gen *ota*" pod kierunkiem prof. dra hab. P. Węgleńskiego z Zakładu Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego.

W trakcie pracy doktorskiej, wykonywanej pod kierunkiem prof. dra hab. K. Toczko z Zakładu Biochemii Ogólnej (po zmianie nazwy Zakładu Biologii Molekularnej) Uniwersytetu Warszawskiego, prowadziłem badania nad homologami protoonkogenu *RAS* u śluzowca *Physarum polycephalum*. Białko *RAS* jest molekularnym przełącznikiem kluczowego szlaku przekazywania sygnałów  $RTK \rightarrow RAS \rightarrow MAPK$  (*RTK* – receptory o aktywności kinazy tyrozynowej dla czynników wzrostowych, np. *EGF* lub *PDGF*; *MAPK* – kinaza *MAP*) u zwierząt, ale było już wtedy wiadomo, że niektóre elementy tego szlaku mogą występować także u niższych *Eukaryota*. Stwierdziłem obecność trzech genów z rodziny *RAS* w genomie tego śluzowca, których cDNA zostały sklonowane i poddane pełnej charakterystyce. Brałem też udział w badaniach nad genomowymi kopiami tych genów prowadzonymi później przez mgr J. Trzcinską-Danielewicz pod kierunkiem prof. dra hab. K. Toczko oraz współpracowałem z dr Ewą Świeżewską z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, w zakresie post-translacyjnej modyfikacji (prenylacji) jednego z białek *RAS* ze śluzowca. Nasze badania nad genami *RAS* u *P. polycephalum* były finansowane przez dwa granty KBN i zostały wyróżnione Nagrodą Rektora UW za wybitne osiągnięcia naukowe.

W ramach stażu podoktoranckiego w laboratorium dra L. M. Graves w Department of Pharmacology, University of North Carolina at Chapel Hill, USA, który zainteresowany jest różnorodnymi aspektami funkcjonowania kinaz białkowych, kontynuowałem badania nad przekazywaniem sygnałów przez szlak  $RTK \rightarrow RAS \rightarrow MAPK$ . W szczególności, brałem udział w badaniach nad regulacją biosyntezy *de novo* nukleotydów pirymidynowych w odpowiedzi na czynniki wzrostowe (podanie *EGF* lub *PDGF* powoduje wzrost syntezy nukleotydów pirymidynowych) w komórkach ssaków. Przy okazji tych badań zwróciłem uwagę na białko *ERH*, które było podejrzewane właśnie o udział w regulacji metabolizmu nukleotydów pirymidynowych. Ostatecznie pokazaliśmy, że regulacja szlaku polega na fosforylacji przez kinazę *MAP* białka *CAD*, posiadającego trzy pierwsze aktywności enzymatyczne tego szlaku biochemicznego i będącego homologiem białka kodowanego przez gen *rudimentary* u *D. melanogaster*, zaś badań nad udziałem *ERH* w tej regulacji w ogóle nie rozpoczęto. Ze względu na znaczenie uzyskanych wyników, zostały one opublikowane w czasopiśmie *Nature*. W trakcie stażu, uczestniczyłem także w badaniach nad regulacją aktywności innych kinaz: *c-Raf*, będącej najwyższym elementem kaskady kinazy *MAP*, oraz *Pyk2*, wówczas nowo odkrytej cytoplazmatycznej kinazy tyrozynowej zależnej od wapnia.

Po powrocie ze stażu podoktoranckiego, w Zakładzie Biologii Molekularnej Uniwersytetu Warszawskiego, rozpocząłem całkowicie samodzielne badania nad białkiem

P.K.



ERH, będące opisanymi tutaj jako osiągnięcie naukowe. Równolegle, brałem udział jako wykonawca w czterech projektach finansowanych przez KBN/MNiSW:

- dra n. med. M. Milewskiego z Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie dotyczącym dystonii torsyjnej typu 1 (dziedziczna choroba neurologiczna),
- dra R. Jarzyny z Zakładu Regulacji Metabolizmu Uniwersytetu Warszawskiego dotyczącym szlaków sygnałowych kontrolowanych przez kinazę białkową aktywowaną AMP (AMPK),
- dra hab. M. Garstki z Zakładu Regulacji Metabolizmu Uniwersytetu Warszawskiego dotyczącym struktury i funkcji chloroplastów,
- prof. dr hab. A. Mostowskiej z Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego dotyczącym biogenezy chloroplastów.

Ponadto, uczestniczyłem w pracach prof. dr hab. M. Maj-Żurawskiej z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego nad zastosowaniem kw. nukleinowych jako bioczuJNIKÓW.

Podsumowując, moje główne doświadczenie zawodowe dotyczy biologii molekularnej, biochemii i genetyki w następującym zakresie: (1) sieci przekazywania sygnałów, w szczególności białek RAS i kinaz kaskady MAPK, (2) regulacji biosyntezy *de novo* nukleotydów pirymidynowych oraz (3) wszechstronnej charakterystyki białka ERH, przy wykorzystaniu różnorodnych organizmów modelowych, od grzybów i śluzowca do komórek człowieka.

Jestem współautorem 15 artykułów eksperymentalnych opublikowanych w pełni recenzowanych, anglojęzycznych czasopismach (nie posiadam publikacji polskojęzycznych).

Brałem udział w realizacji 8 grantów finansowanych przez KBN/MNiSW, w tym kierowałem dwoma z nich.

Badania z moim udziałem zostały dwukrotnie wyróżnione Nagrodami Rektora UW za wybitne osiągnięcia naukowe.

#### 6. Dodatkowy dorobek

Kierowałem pracami dyplomowymi 11 licencjatów i 11 magistrów, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Z tych ostatnich, 9 jest współautorami artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, a 10 z nich otrzymało już stopień doktora lub jest w trakcie wykonywania doktoratu, w instytucjach krajowych (Uniwersytet Warszawski, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie) lub zagranicznych (University of Liverpool, University of Barcelona, Heidelberg University, University of Zurich, ETH Zurich).

Jestem współautorem skryptu do Biochemii dla studentów Uniwersytetu Warszawskiego z Wydziału Biologii, Międzywydziałowych Studiów Ochrony Środowiska oraz Bioinformatyki i Biologii Systemów.

Działalność dydaktyczna z moim udziałem została wyróżniona Nagrodą Rektora UW za wybitne osiągnięcia dydaktyczne.

*Kozłowski Piotr*