

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Paweł Niewiadomski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2004 – Doktor nauk farmaceutycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny.
Tytuł rozprawy „Receptory dla PACAP i VIP w mózgu kręgowców: charakterystyka farmakologiczna i regulacja sygnału receptorowego.”

2003 – Magister matematyki, Uniwersytet Łódzki, Wydział Matematyki.

2001 – Magister farmacji, Akademia Medyczna w Łodzi, Wydział Farmaceutyczny.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

06/2015 – obecnie – kierownik Laboratorium Sygnalizacji Molekularnej i Komórkowej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego

2013-2015 – specjalista, Pracownia Synaptogenezy, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

2013 – adiunkt, Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2010-2012 – *postdoctoral scholar/research associate*, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine

2005-2009 – *postdoctoral scholar*, Semel Institute for Neuroscience and Human Behavior, University of California, Los Angeles

2005 – asystent, Katedra Farmakologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2003-2005 – asystent, Katedra Informatyki Stosowanej, Wydział Matematyki, Uniwersytet Łódzki

2001-2004 – doktorant, Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmacji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi we współpracy z Zakładem Amin Biogennych (obecnie Instytut Biologii Medycznej) Polskiej Akademii Nauk

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.):

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Mechanizmy molekularne sygnalizacji Hedgehog – wpływ rzeski pierwotnej i szlaku cykliczne AMP/kinaza białkowa A

4.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

1. "Pituitary adenyl cyclase-activating peptide counteracts hedgehog-dependent motor neuron production in mouse embryonic stem cell cultures." Hirose M*, **Niewiadomski P***, Tse G, Chi GC, Dong H, Lee A, Carpenter EM, Waschek JA., **J Neurosci Res.** 2011 Sep;89(9):1363-74. doi: 10.1002/jnr.22675. (IF 2011: 2,738, punkty KBN: 20, cytowania: 2)
* równy wkład w powstanie pracy
2. "Interaction of PACAP with Sonic hedgehog reveals complex regulation of the hedgehog pathway by PKA." **Niewiadomski P**, Zhujiang A, Youssef M, Waschek JA., **Cell Signal.** 2013 Nov;25(11):2222-30. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.07.012. (IF 2013: 4,471, punkty KBN: 30, cytowania: 24)
3. "Chemically inducible diffusion trap at cilia reveals molecular sieve-like barrier." Lin YC, **Niewiadomski P***, Lin B*, Nakamura H*, Phua SC, Jiao J, Levchenko A, Inoue T, Rohatgi R, Inoue T., **Nat Chem Biol.** 2013 Jul;9(7):437-43. doi: 10.1038/nchembio.1252. (IF 2013: 13,217, punkty KBN: 50, cytowania: 24)
* równy wkład w powstanie pracy
4. "Rapid Screening of Gli2/3 Mutants Using the Flp-In System." **Niewiadomski P**, Rohatgi R., **Methods Mol Biol.** 2015;1322:125-30. doi: 10.1007/978-1-4939-2772-2_11. (rozdział w książce "Hedgehog Signaling Protocols" pod redakcją Natalii Riobo z serii Methods in Molecular Biology, brak IF, punktów KBN, cytowania: 0)
5. "Measuring Gli2 Phosphorylation by Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry." Ahrends R*, **Niewiadomski P***, Teruel MN, Rohatgi R., **Methods Mol Biol.** 2015;1322:105-23. doi: 10.1007/978-1-4939-2772-2_10. (rozdział w książce "Hedgehog Signaling Protocols" pod redakcją Natalii Riobo z serii Methods in Molecular Biology, brak IF, punktów KBN, cytowania: 0)
* równy wkład w powstanie pracy
6. "Measuring Expression Levels of Endogenous Gli Genes by Immunoblotting and Real-Time PCR." **Niewiadomski P**, Rohatgi R., **Methods Mol Biol.** 2015;1322:81-92. doi: 10.1007/978-1-4939-2772-2_8. (rozdział w książce "Hedgehog Signaling Protocols" pod redakcją Natalii Riobo z serii Methods in Molecular Biology, brak IF, punktów KBN, cytowania: 0)
7. "Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling." **Niewiadomski P****, Kong JH, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, Teruel MN, Novitch BG, Rohatgi R.** **Cell Rep.** 2014 Jan 16;6(1):168-81. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.003. (IF 2014: 8,358, punkty KBN: 35, cytowania: 25)
** autorzy korespondencyjni

Sumaryczny IF dla prac wchodzących w skład osiągnięcia: 28.784

Sumaryczna liczba punktów KBN dla prac wchodzących w skład osiągnięcia: 135

Sumaryczna liczba cytowań prac wchodzących w skład osiągnięcia: 75

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5 (Oświadczenia współautorów).

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

A. Wstęp

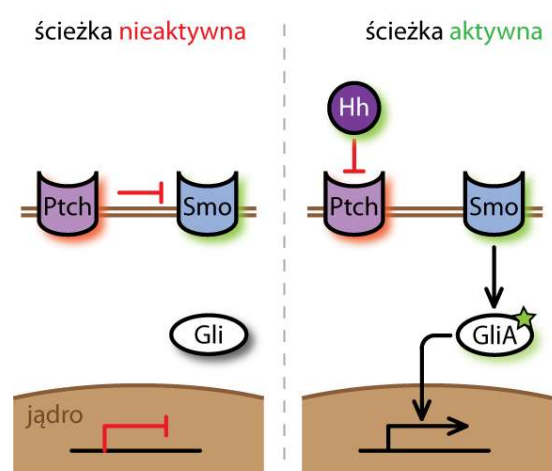
Sygnalizacja Hedgehog (Hh) bierze udział w morfogenezie u zwierząt oraz w regeneracji tkanek u osobników dorosłych [1]. Jej deregulacja może prowadzić do rozwoju nowotworów, w tym najczęstszego nowotworu mózgu u dzieci – rdzeniaka zarodkowego [2]. Zahamowanie sygnalizacji Hh w rozwoju embrionalnym skutkuje wadami rozwoju w obrębie szkieletu, serca, oraz ośrodkowego układu nerwowego [3].

Kaskada Hh rozpoczyna się poprzez przyłączenie peptydu Hh do receptora Patched (Ptch). Ptch w stanie niezwiązanym z Hh hamuje białko Smoothened (Smo). Przyłączenie Hh uwalnia Smo spod hamującego wpływu Ptch, a następnie aktywny Smo stymuluje transport białek Gli do jądra komórkowego, gdzie łączą się one z DNA i uruchamiają transkrypcję genów docelowych (Ryc. 1).

Istotnym czynnikiem regulującym aktywność ścieżki Hh w komórkach zwierząt jest sygnalizacja zależna od cyklicznego AMP (cAMP) oraz kinazy białkowej A. Ten szlak sygnalizacyjny jest stymulowany przez receptory związane z małymi GTPazami z rodziny białek G (ang. G protein-coupled receptors – GPCR). Kiedy do receptora związanego z białkiem G zawierającym podjednostkę $G_{\alpha s}$ przyłączy się ligand, podjednostka ta aktywuje enzym cyklazę adenylanową, która odpowiada w komórce za produkcję przekaźnika drugorzędowego cyklicznego AMP (cAMP). Jedną z głównych ról cAMP w komórce jest z kolei stymulacja kinazy białkowej A (ang. protein kinase A – PKA), która fosforyluje liczne substraty białkowe na resztach seryny i treoniny. Szlak GPCR/cAMP/PKA działa hamująco na sygnalizację Hh [4,5], ale do niedawna mechanizm tej interakcji pozostawał niejasny.

Jednym z najbardziej doniosłych odkryć w dziedzinie sygnalizacji Hh w ciągu ostatnich lat było ustalenie, że transdukcja sygnału Hh wymaga obecności rzęski pierwotnej – wypustki obecnej na powierzchni większości komórek u ssaków uważanej za swoistą molekularną „antenę” [6]. Jednakże, pomimo wzmożonych badań funkcja rzęsek w przekazywaniu sygnału Hh pozostaje niewyjaśniona. Wiadomo, że wiele białek składowych ścieżki Hh jest transportowanych do rzęski lub z niej usuwanych pod wpływem aktywacji. W szczególności białka Gli – czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za ekspresję genów docelowych Hh – koncentrują się na koniuszku rzęski gdy sygnał Hh jest włączony [7]. Jednakże mechanizm transportu rzęskowego białek, w szczególności białek rozpuszczalnych w cytozolu takich jak czynniki transkrypcyjne Gli, pozostaje słabo zbadany.

Wyjaśnienie wpływu sygnalizacji cAMP/PKA oraz transportu rzęskowego na sygnalizację Hh jest istotne ze względu na kluczową rolę, jaką ta ścieżka odgrywa w rozwoju nowotworów [1]. Leki blokujące ścieżkę Hh są jednymi z najnowocześniejszych terapeutyków w onkologii. Pierwszy taki lek, Vismodegib, został w 2012 roku zaakceptowany do klinicznego użycia w Stanach Zjednoczonych. Poważną wadą obecnie badanej generacji leków przeciwko Hh jest jednak to, że wiążą się one z białkiem Smo, co powoduje, że są one nieskuteczne gdy Smo ulegnie mutacji blokującej wiązanie leku [8], lub gdy nowotwór jest wywołany mutacjami w białkach leżących poniżej Smo w kaskadzie Hh [9]. Aby stworzyć leki, które efektywnie zwalczają wszystkie nowotwory zależne od sygnalizacji Hh, należy zatem skupić się na etapach tej ścieżki które następują po aktywacji Smo – modyfikacjach potranslacyjnych związanych z kinazą białkową A oraz transporcie wewnątrzkomórkowym białek Gli.



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie kaskady Hh. W obecności peptydu Hh Ptch przestaje hamować Smo. Smo powoduje konwersję nieaktywnych, cytoplazmatycznych białek Gli do aktywnych form (GliA★).

Zrozumienie biochemicznych podstaw aktywacji tych białek, czego podjąłem się w ramach przedstawionego osiągnięcia, jest niezbędnym krokiem na drodze do stworzenia takich leków.

B. Funkcjonalna interakcja pomiędzy ścieżką hedgehog a sygnalizacją GPCR/cAMP/PKA na przykładzie produkcji motoneuronów z embrionalnych komórek macierzystych

Ścieżka Hh odgrywa kluczową rolę w rozwoju rdzenia kręgowego [10]. Peptyd Sonic hedgehog (Shh) jest wydzielany przez strunę grzbietową i tworzy gradient wzdłuż osi brzuszno-grzbietowej. W brzusznej części rdzenia, gdzie stężenia Shh są najwyższe, powstają neurony ruchowe oraz interneurony o brzusznej fenotypie. Wykazano, że zablokowanie PKA przy pomocy białka dominująco negatywnego (dnPKA) w grzbietowej części cewy nerwowej powoduje uaktywnienie programu transkrypcyjnego podobnego do tego, który jest stymulowany przez sygnalizację Hh w brzusznej części cewy [5]. Sugeruje to, że w grzbietowej części dojrzewającego rdzenia utrzymywany jest wysoki poziom sygnalizacji zależnej od cAMP/PKA, który podczas normalnego rozwoju blokuje sygnalizację Hh i hamuje różnicowanie brzusznych interneuronów i neuronów ruchowych. Nie było natomiast jasne, w jaki sposób aktywność PKA jest podtrzymywana w grzbietowych częściach cewy. Jednym z potencjalnych czynników, który mógł być odpowiedzialny za stymulację PKA w rdzeniu kręgowym, jest polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylną (ant. pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP). Peptyd ten, a także jego receptor PAC1 podlega ekspresji w dojrzewającym rdzeniu kręgowym [11], a wiązanie PACAP do PAC1 jest najczęściej związane z uaktywnieniem szlaku cAMP/PKA [12]. W celu sprawdzenia, czy PACAP odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu niskiego poziomu sygnalizacji Hh w rdzeniu kręgowym zastosowaliśmy dwie metody: moja współpracowniczka dr Megumi Hirose zbadała myszy genetycznie pozbawione genu *Adcyap1* kodującego peptyd PACAP (tzw. myszy PACAP KO), natomiast ja zbadałem jaki wpływ PACAP ma na rozwój komórek progenitorowych wygenerowanych z mysich zarodkowych komórek macierzystych (ang. mouse embryonic stem cells; mESC).

W cyklu przeprowadzonych przeze mnie badań pokazałem, że w hodowlach tzw. ciałek embrionalnych powstających z mESC, agonista białka Smo purmorfamina stymuluje powstawanie neuronów ruchowych, a więc rodzaju neuronów produkowanych w brzusznej części rdzenia kręgowego (Ryc. 2 w [13]). Było to zgodne z poprzednimi wynikami, które wskazywały, że aktywacja ścieżki Hh jest niezbędna do różnicowania mESC w kierunku motoneuronów [14]. Pokazałem następnie, że PACAP silnie hamuje produkcję neuronów ruchowych w hodowlach mESC (Ryc. 3 w [13]). Co więcej, moje wyniki wskazywały, że PACAP ujemnie wpływa na stymulowaną przez purmorfaminę ekspresję genów charakterystycznych dla prekursorów interneuronów znajdujących się w brzusznej części rdzenia kręgowego: *Nkx2.2* oraz *Nkx6.1* (Ryc. 4 w [13]). Okazało się również, że purmorfamina stymuluje, a PACAP hamuje, ekspresję bezpośredniego genu docelowego sygnalizacji Hh: *Gli1*, i że zmiany w ekspresji *Gli1* poprzedzają zmiany w ekspresji genów charakterystycznych dla prekursorów neuronów brzusznych (Ryc. 5 w [13]). Wyniki te sugerowały, że istnieje silna ujemna zależność pomiędzy zależną od PACAP sygnalizacją cAMP/PKA a stymulowaną przez ścieżkę Hh produkcją motoneuronów i innych populacji neuronów brzusznych w rozwijającej się cewie nerwowej. Zaskakujący był więc wynik uzyskany przez dr Hirose sugerujący, że delekcja genu kodującego peptyd PACAP ma niewielki wpływ na różnicowanie się komórek w rdzeniu kręgowym *in vivo*. W szczególności populacje prekursorów motoneuronów oraz interneuronów ekspresyjujących gen *Nkx2.2*, a także populacja płytki podłogowej z ekspresją genu *Shh* pozostawały niezmiennymi w embrionach myszy PACAP KO (Ryc. 6 z [13]). Jedyną zaobserwowaną zmianą w morfologii rdzenia kręgowego u zarodków PACAP KO było niewielkie zwiększenie obszaru ekspresji genu *Pax6*, który ulega ekspresji w środkowej części rdzenia pomiędzy obszarami brzuszными a grzbietowymi (Ryc. 7 w [13]). Brak zmian w różnicowaniu komórek prekursorowych pod wpływem delekcji genu *Adcyap1 in vivo* można interpretować na kilka sposobów. Po pierwsze, PACAP może być jednym z wielu ligandów receptorów stymulujących szlak cAMP/PKA w rozwijającym się rdzeniu kręgowym i inne systemy ligand/receptor mogą kompensować brak PACAP. Po drugie, sama ścieżka Shh zawiera różne pętle sprzężenia zwrotnego, które przy braku PACAP mogą włączać się w regulację różnicowania komórek

w cewie nerwowej. Po trzecie, wpływ PACAP na rozwój ośrodkowego układu nerwowego może być przejściowy, a w naszych badaniach, które polegały na obserwacji przekrojów rdzenia kręgowego na jednym tylko etapie jego rozwoju, mogliśmy przeoczyć zmiany które następowały na wcześniejszych lub późniejszych etapach. Nasze badania w hodowlach komórkowych wskazały jednak, że komórki prekursorowe rdzenia kręgowego są wrażliwe na stymulację ścieżki PACAP-PAC1-cAMP-PKA i że ścieżka ta działa antagonistycznie w stosunku do sygnalizacji Hh.

C. Złożone mechanizmy regulacji ścieżki Hh przez sygnalizację GPCR/cAMP/PKA – rola rzęski pierwotnej

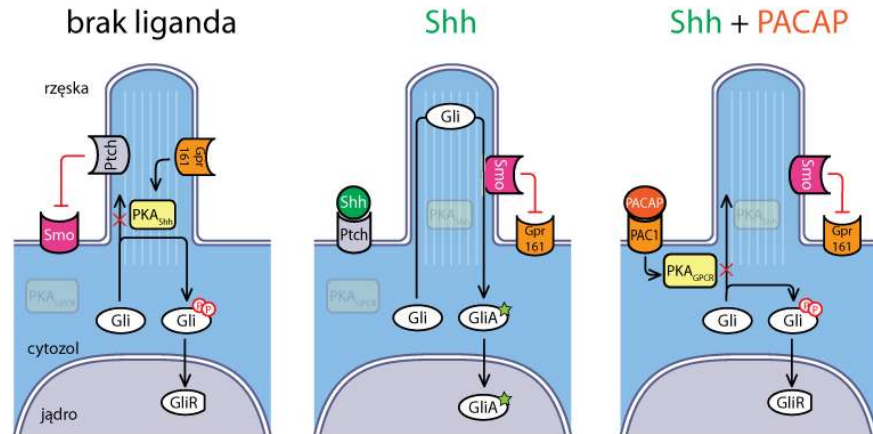
Precyzyjna hamująca regulacja sygnału Hh przez ścieżkę cAMP/PKA jest kluczowa dla funkcji ścieżki Hh zarówno podczas rozwoju zarodkowego [5,13] jak i w przebiegu nowotworzenia [15]. Można by zatem oczekiwać, że komórki zdolne do odpowiedzi na sygnał Hh mają pod nieobecność liganda Shh wysoki poziom cAMP i wysoką aktywność PKA. W celu sprawdzenia tej hipotezy posłużyłem się modelem doświadczalnym opartym na mózdkowych prekursorach komórek ziarnistych (ang. cerebellar granule neuron progenitors – cGNP). Komórki te, które izoluje się z osesków mysich, są komórkami prekursorowymi dla komórek ziarnistych mózdku. Po urodzeniu myszy, komórki te podlegają intensywnym podziałom, które są regulowane przez sygnalizację Hh [16]. Jeśli proliferacja cGNP nie zostanie w porę zahamowana, komórki te mogą stać się ogniskami nowotworzenia w mózdku, doprowadzając do powstania rdzeniaka zarodkowego [17], a zatem model ten ma również znaczenie kliniczne. Co więcej, komórki cGNP posiadają receptory PAC1 i są wrażliwe na aktywację przez PACAP szlaku cAMP/PKA, a więc są idealnym modelem do badania interakcji pomiędzy sygnalizacją cAMP a sygnalizacją Hh.

We wstępnych badaniach ustaliłem, zgodnie z przewidywaniami, że PACAP hamuje zależną od Hh proliferację komórek cGNP oraz że ujemnie wpływa na ekspresję genów docelowych sygnalizacji Hh (Ryc. 1 w [18]). Co więcej, pokazałem, że zahamowanie aktywności PKA przy użyciu farmakologicznych inhibitorów H89 in Rp-cAMPS samo w sobie zwiększa ekspresję tych genów. Co więcej, PACAP nie wpływa na ekspresję genów docelowych Hh w komórkach hodowanych w obecności inhibitora PKA (Ryc. 3 w [18]). Wyniki te dowodzą, że PACAP antagonizuje działanie sygnału Hh przez ścieżkę cAMP/PKA oraz że zablokowanie aktywności PKA powoduje niezależne od liganda uaktywnienie ekspresji genów docelowych ścieżki Hh. Gdy zbadałem jednak poziom globalnej aktywności PKA w komórkach cGNP, okazało się że nie ulega on znaczącym zmianom pod wpływem działania liganda Hh i że w komórkach hodowanych pod nieobecność Shh i PACAP jest on stosunkowo niski (Ryc. 4 w [18]). Było to sprzeczne z postawioną przeze mnie hipotezą, że aktywność PKA jest wysoka przy braku liganda Hh i że ulega ona zmniejszeniu pod wpływem tego liganda. Jak zatem można wytłumaczyć fakt, że obniżenie aktywności PKA indukuje ścieżkę Hh jeśli poziom aktywności tej kinazy jest niski nawet przy braku inhibitorów?

Aby pogodzić wyniki wskazujące na niski podstawowy poziom aktywności PKA z wynikami sugerującymi, że blokada PKA „naśladuje” działanie liganda Hh, zaproponowałem model „dwóch hamulców” (Ryc. 2). Założyłem, że w komórce istnieją dwie pule PKA różniące się aktywnością w niestymulowanych komórkach. Każda z tych pul może działać przeciwstawnie w stosunku do sygnału Hh. Pierwsza pula, którą nazwałem PKA_{Shh} , jest niewielka, ale aktywna w komórkach niestymulowanych. Pełni ona rolę zblizoną do hamulca ręcznego w samochodzie – jeśli ona jest aktywna, ścieżka Hh pozostaje zablokowana. Ligand Hh bezpośrednio wpływa na tą pulę, czyli „zwalnia hamulec ręczny”, przez co umożliwia zwiększenie ekspresji genów docelowych. Druga pula PKA, PKA_{GPCR} , pełni rolę „pedału hamulca” – dostosowuje poziom aktywności ścieżki Hh w obecności liganda, ale pod nieobecność liganda Hh, tzn. „przy zaciągniętym hamulcu ręcznym” odgrywa mniejszą rolę. Model „dwóch hamulców” jest spójny z moimi obserwacjami dotyczącymi poziomu aktywności PKA i aktywacji sygnalizacji Hh. Zakładając, że pula PKA_{Shh} jest znacznie mniejsza niż pula PKA_{GPCR} , zarówno jej wysoka aktywność pod nieobecność liganda Hh, jak zmiany jej aktywności pod jego wpływem nie zostaną zarejestrowane gdy będziemy badać całościowy poziom aktywności PKA w komórce, jak miało to miejsce w moich badaniach. Z kolei zmiany aktywności stosunkowo dużej puli

PKA_{GPCR} będą łatwe do zaobserwowania nawet, gdy pula ta jest uaktywniona w niewielkim stopniu, a zatem tylko częściowo hamuje aktywność ścieżki Hh. Zgodnie z tym modelem, zaobserwowałem, że przy silnej stymulacji komórek cGNP ligandem Hh w obecności niskiej dawki PACAP wysoki poziom ekspresji genów docelowych Hh paradoksalnie współistnieje z wyższym niż w próbie kontrolnej poziomem aktywności PKA (Ryc. 4 w [18]). W takich warunkach pula PKA_{Shh} jest wyłączona przez ligand Shh, natomiast PKA_{GPCR} jest aktywowana przez PACAP. Mniejsza pula PKA_{Shh} ma dominujący wpływ na aktywność ścieżki Hh, natomiast bardziej liczna pula PKA_{GPCR} wpływa w sposób decydujący na całkowity poziom aktywności PKA w komórce.

Mimo, że model „dwóch hamulców” objaśnia w jaki sposób ścieżka Hh współgra z sygnalizacją GPCR/AC/PKA w regulacji transkrypcji genów docelowych, nie było jasne, jaki jest mechanizm molekularny tej interakcji. W ostatnich latach powstało wiele prac sugerujących, że w organizmach ssaków krytyczną rolę w



Ryc. 2. Model „dwóch hamulców” oddziaływania PKA na ścieżkę Hh oraz na lokalizację rzęskową białek Gli.

sygnalizacji Hh odgrywa tzw. rzęska pierwotna [6,19–21], mikroskopijne organellum występujące na powierzchni większości komórek u ssaków pełniące rolę „anteny” odbierającej liczne sygnały z otoczenia. Również czynniki transkrypcyjne Gli przedostają się do rzęski pierwotnej w sposób zależny od sygnalizacji Hh [7,22,23]. Ponieważ wiadomo, że PKA może fosforylować białka Gli, postawiłem hipotezę, że lokalizacja rzęskowa tych białek jest zależna od stopnia fosforylacji przez PKA. Istotnie, o ile aktywator Smo SAG powodował zwiększenie stężenia Gli2 na koniuszku rzęski pierwotnej, dodanie PACAP do hodowli równoległe z SAG powodowało zahamowanie akumulacji Gli2 w rzęsce z równoległym zwiększeniem aktywności PKA w komórce (Ryc. 5 w [18]). Wyniki te sugerują, że dwa „hamulce” PKA regulują aktywność transkrypcyjną białek Gli poprzez modulację ich lokalizacji w rzęsce pierwotnej (Ryc. 2.).

D. Transport białek poprzez barierę u podstawy rzęski

Z przedstawionych powyżej badań wynika, że lokalizacja białek Gli w rzęsce pierwotnej ma kluczowe znaczenie dla ich aktywności, i że PKA reguluje ścieżkę Hh poprzez zmianę tej lokalizacji. Niewyjaśniony pozostawał jednak mechanizm transportu białek Gli do rzęski pierwotnej. Uogólniając, pomimo, że mechanizmy transportu białek błonowych do wnętrza rzęski pierwotnej zostały dość dobrze zbadane [24–26], rzęskowy transport białek rozpuszczalnych w cytozolu, takich jak Gli, pozostaje słabo poznany. Jednym z możliwych mechanizmów transportu białek Gli jest ich dyfuzja przez barierę znajdującą się u podstawy rzęski pierwotnej. Aby zbadać właściwości tej bariery, nawiązałem współpracę z laboratorium dr Takanari Inoue z Uniwersytetu Johns Hopkins w Baltimore. Post-dok w laboratorium dr Inoue, dr Yu-Chun Lin, opracował metodę badania dyfuzji przez barierę rzęskową opartą na dimeryzacji badanego białka z białkiem błonowym występującym konstytutywnie w rzęsce – 5-HTR6. Dimeryzacja ta jest indukowalna poprzez dodanie do hodowli komórkowej rapamycyny, która wiąże odpowiednie domeny na białku badanym oraz na genetycznie zmodyfikowanym białku 5-HTR6. Poprzez badanie dynamiki akumulacji badanego białka w rzęsce pierwotnej po dodaniu rapamycyny można wyliczyć parametry dyfuzji tego białka przez barierę rzęskową (Ryc. 1 w [27]).

Moja rola w projekcie była dwojaka. Po pierwsze, używając metody szybkiej chromatografii cieczowej białek (fast protein liquid chromatography; FPLC) oraz kolumny ze złożem w postaci sita molekularnego, ustaliłem wielkość cząsteczek, tzw. promień Stokesa, badanych białek (Ryc. S9 i Tabela 1 w [27]). Było to niezbędne dla precyzyjnego wyznaczenia wartości teoretycznego współczynnika dyfuzji na podstawie równania Stokesa-Einsteina.

Po drugie, stworzyłem matematyczny model, który umożliwił wyliczenie rzeczywistych współczynników dyfuzji na podstawie danych dotyczących dynamiki zmian w lokalizacji białek po dodaniu rapamycyny. Model ten był oparty na prostym równaniu dyfuzji:

$$J = -D \frac{[F_{cy}] - [F_{ci}]}{x}$$

gdzie J to przepływ cząsteczek z cytoplazmy do rzęski, F_{cy} to stężenie badanego białka w cytoplazmie, F_{ci} to jego stężenie w rzęsce, D to współczynnik dyfuzji, a x to szerokość bariery dyfuzyjnej u podstawy rzęski.

Dane eksperymentalne były przedstawione jako jednostki fluorescencji metki GFP (intensywność naświetlenia piksela obrazu), którą oznakowano wszystkie badane białka. Założyliśmy, że te jednostki fluorescencji są proporcjonalne do liczby cząsteczek białka przypadającej na jednostkę powierzchni obrazu komórki. Dalej, założyliśmy że w krótkim czasie po dodaniu rapamycyny, wszystkie cząsteczki badanego białka będą wychwytywane przez zakotwiczone w błonie białko 5-HTR6, a zatem efektywne stężenie badanego białka w rzęsce (F_{ci}) będzie wynosić 0. Można było zatem uprościć powyższe równanie:

$$J = -D \frac{[F_{cy}]}{x}$$

Z definicji, przepływ można było opisać następująco:

$$J = -\frac{1}{A} \frac{dNF_{ci}}{dt}$$

gdzie A jest polem powierzchni bariery u podstawy rzęski pierwotnej, a NF_{ci} jest sumaryczną liczbą cząsteczek badanego białka znajdującego się w rzęsce pierwotnej. Biorąc dwa powyższe równania możemy napisać:

$$D = \frac{dNF_{ci}}{dt} \frac{x}{[F_{cy}] A}$$

i wyliczyć współczynnik D dyfuzji przez barierę rzęskową na podstawie dostępnych danych fluorescencyjnych i dodatkowych założeń: liczba $\frac{dNF_{ci}}{dt}$ była wyliczona na podstawie nachylenia krzywej wzrostu fluorescencji w rzęsce w pierwszych 90 sekundach od dodania rapamycyny, liczba $[F_{cy}]$ była wyliczona na podstawie natężenia fluorescencji w kilku obszarach komórki nieobejmujących rzęski, pole powierzchni A było oszacowane na podstawie literaturowych danych odnośnie geometrii rzęski pierwotnej, a liczba x była niewiadomą i jej wpływ na wartość współczynnika D był oszacowany w obliczeniach.

Stosując powyższy wzór oszacowaliśmy współczynniki dyfuzji D dla białek o różnych wielkościach cząsteczki na podstawie danych eksperymentalnych otrzymanych w laboratorium dr Inoue (Tabela 1 w [27]). Okazało się, że zależność odwrotności współczynnika dyfuzji od promienia hydrodynamicznego (Stokesa) cząsteczki jest nieliniowa (Ryc. 4c w [27]), co sugeruje, że bariera rzęskowa selektywnie hamuje dyfuzję większych cząsteczek. Sprawdziwszy dwa modele spowolnionej dyfuzji: model stłoczenia molekularnego oraz model sita molekularnego stwierdziliśmy, że otrzymane dane doświadczalne najlepiej pasowały do modelu sita molekularnego o promieniu porów ok. 8 nm (Ryc. 4d w [27]). Podsumowując – stworzony przeze mnie model matematyczny pozwolił na wgląd w molekularny charakter bariery u podstawy rzęski pierwotnej przy użyciu metod pośrednich – badania szybkości indukowalnej akumulacji cząsteczek różnych białek w rzęskach przy pomocy obrazowania fluorescencji.

E. Opracowanie metod badania aktywności i modyfikacji potranslacyjnych białek Gli

Białka Gli funkcjonują w komórkach w dwóch postaciach: białka pełnej długości są aktywowane i mogą stymulować transkrypcję genów docelowych, natomiast formy, które uległy skróceniu poprzez częściowe trawienie przy udziale proteasomów, pełnią funkcję represorów transkrypcji. Z opublikowanych danych wynika, że tworzenie skróconych represorowych form Gli jest zależne od czterech seryn, które stanowią miejsca fosforylacji PKA. Nie było jednak jasne, czy rola PKA ogranicza się do tworzenia represorowych form Gli, czy kinaza ta ma też wpływ na aktywność form białek Gli pełnej długości. Na podstawie moich badań wpływu aktywności PKA na lokalizację rzęskową białek Gli (część 2 Osiągnięcia) postawiłem hipotezę, że PKA reguluje lokalizację i aktywność białek Gli pełnej długości bezpośrednio poprzez fosforylację miejsc docelowych w ich sekwencji. Sprawdzenie tej hipotezy wymagało jednak opracowania nowych metod doświadczalnych przystosowanych do typów badań, jakie chciałem przeprowadzić.

Po pierwsze, chciałem sprawdzić wpływ mutacji miejsc fosforylacji białek Gli na aktywność tych białek w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Większość badań białek Gli opierała się dotychczas na nadekspresji zmutowanych form tych białek w komórkach. Białka Gli w warunkach nadekspresji nie podlegają jednak regulacji przez oś Ptch-Smo i są w stanie aktywować transkrypcję genów docelowych nawet pod nieobecność liganda [28]. Aby uniknąć znacznej nadekspresji białek Gli w komórkach postanowiłem opracować metodę tworzenia stabilnych linii ekspresyjnych białko Gli2 (dzikiego typu lub zmutowane) na poziomie zbliżonym do fizjologicznego. W tym celu skorzystałem z systemu Flp-In opracowanego przez firmę Invitrogen. System ten składa się z trzech elementów: (1) linii komórkowej posiadającej pojedyncze miejsce rekombinacji FRT w ściśle określonym miejscu w genomowym DNA, (2) plazmidu kodującego rekombinazę Flp, oraz (3) wektora plazmidowego, w którym wstawione DNA kodujące badane białko (w naszym przypadku Gli2) sąsiaduje z miejscem rekombinacji FRT i genem oporności na hygromycynę. Po kotransfekcji wektora kodującego Gli2 oraz plazmidu kodującego rekombinazę Flp w komórkach Flp-In, sekwencja badanego białka „wklejana” jest do genomu w pojedynczym miejscu rekombinacji FRT (Ryc. 1 w [29]). Dzięki temu, po selekcji hygromycyną uzyskujemy identyczne klony komórek ze stabilnie zintegrowanym egzogennym białkiem Gli2 typu dzikiego lub z modyfikacjami (metki, mutacje). Ponieważ stworzone w ten sposób linie mają pojedynczą kopię egzogenego Gli2 zawsze w tym samym regionie genomu, ekspresja tego białka jest stosunkowo niska (mniej więcej na poziomie ekspresji endogenego Gli2) i porównywalna pomiędzy liniami ekspresyjnymi białko Gli2 zawierające różne modyfikacje. To powoduje, że efekty modyfikacji mogą być bezpośrednio ze sobą porównywane bez konieczności dopasowywania poziomu ekspresji.

Drugim problemem metodologicznym, przed którym stanąłem, był brak opracowanych metod bezpośredniego pomiaru poziomu fosforylacji białek Gli przez PKA. Tu do wyboru miałem albo wygenerowanie fosfo-specyficznych przeciwciał przeciwko miejscom fosforylacji przez PKA [30], albo pomiar poziomu fosforylacji przy użyciu ilościowej spektrometrii mas (MS) [31]. Wygenerowałem przeciwciało przeciwko jednemu z miejsc fosforylacji przez PKA (tzw. miejsce P6, czyli S956 w mysim Gli2), ale nie wykazało ono wystarczająco specyficznego wiązania do ufosforylowanego białka, przez co trudno było ocenić poziom fosforylacji P6 przy pomocy tego przeciwciała. W związku z tym postanowiłem opracować, we współpracy z dr Robertem Ahrendsem z laboratorium dr Mary Teruel na Uniwersytecie Stanforda, metodę pomiaru fosforylacji Gli2 opartą na spektrometrii mas. W metodzie tej, znanej pod nazwą *Selected Reaction Monitoring* (SRM), badane białko trawi się trypsyną, a następnie używa się spektrometru mas typu potrójny kwadrupol do pomiaru zawartości specyficznych peptydów tryptycznych zawierających dane miejsce fosforylacji w formie ufosforylowanej lub nieufosforylowanej. Jeśli w próbce badanej więcej jest peptydu ufosforylowanego a mniej nieufosforylowanego niż w próbce kontrolnej, stwierdzamy, że badane białko podlegało fosforylacji w większym stopniu w komórkach badanych niż w kontrolnych. Spektrometry typu potrójny kwadrupol nadają się szczególnie dobrze do pomiarów ilościowych zawartości danego peptydu w mieszaninie ponieważ mają bardzo szeroki zakres dynamiki (ponad 4 rzędy wielkości) i wysoką czułość.

Optymalizację parametrów doświadczenia rozpocząłem od całościowej analizy immunoprecypitowanego białka Gli2 na spektrometrze mas typu pułapka jonów/Orbitrap we współpracy z firmą MS Bioworks. Wyniki tej analizy wskazały, które z możliwych peptydów tryptycznych zawierających miejsca fosforylacji przez PKA są wykrywane metodą spektrometrii mas. Jest to o tyle istotne, że fosforylacja niekiedy zaburza proces trawienia trypsyną i w próbce mogą występować peptydy „niedotrawione”, a więc zawierające nienaruszone miejsca cięcia trypsyną. Co więcej, niektóre peptydy źle rozdzielają się na kolumnie chromatografii cieczowej lub są słabo wykrywalne w spektrometrze mas, co powoduje, że są w ogóle nie mogą być badane tą metodą. Na podstawie spektrów chromatografii cieczowej/tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS) wygenerowanych w tym wstępnym doświadczeniu, wybrałem sekwencje fosfopeptydów odpowiadających miejscom docelowym PKA oraz ich nieufosforylowanych odpowiedników, które dawały najbardziej intensywne sygnały. Następnie zakupiłem syntetyczne peptydy identyczne z tymi, które wykryłem w doświadczeniu LC-MS/MS zawierające ufosforylowane lub nieufosforylowane reszty seryny. Mieszaninę tych peptydów poddałem separacji przy użyciu HPLC oraz detekcji na spektrometrze mas typu potrójny kwadrupol. Wstępne badania przy użyciu syntetycznych peptydów pozwoliły dr Ahrendsowi na dobranie odpowiednich parametrów rozdziału chromatograficznego i detekcji na spektrometrze. Przy użyciu tak zoptymalizowanej metody badaniu poddaliśmy peptydy pochodzące z endogenego białka Gli2 wyizolowanego z fibroblastów mysich NIH/3T3. Do izolacji Gli2 metodą immunoprecypitacji użyłem wygenerowanego w naszym laboratorium we współpracy z firmą Cocalico Biologicals króliczego przeciwciała przeciwko Gli2. Przeciwciało to zachowuje swoje powinowactwo do epitopu w obecności 2M mocznika, co pozwoliło mi na lizę komórek w denaturującym buforze zawierającym mocznik i zapewniło, że w trakcie procedury izolacji białko Gli2 nie ulegało defosforylacji przez aktywne fosfatazy. Co więcej, izolacja w obecności mocznika zminimalizowała ilość zanieczyszczeń, które w bardziej łagodnym buforze mogłyby koimmunoprecypitować z Gli2. Wyizolowane w ten sposób białko Gli2 poddawałem rozdzielaniu elektroforetycznemu (Ryc. 2 w [32]), a następnie trawieniu trypsyną w celu uzyskania mieszaniny peptydów. Peptydy te poddawałem procedurze ilościowej detekcji na spektrometrze typu potrójny kwadrupol przy użyciu metod opracowanych przez dr Ahrendsa (Ryc. 1 w [32]). Opracowałem następnie metodę obliczania względnych zmian poziomu fosforylacji białka Gli2 na różnych resztach seryny i treoniny na podstawie wyliczonych pól powierzchni pików peptydów pochodzących z endogenego Gli2 oraz peptydów syntetycznych rozdzielanych w tym samym czasie i oznakowanych ciężkimi izotopami (Tabela 1 w [32]).

Trzecią grupą metod którą zoptymalizowałem w celu badania wpływu fosforylacji na aktywność białek Gli były metody polegające na badaniu ekspresji endogennych białek Gli w komórkach. W tym celu użyłem metod odwrotnej transkrypcji i ilościowego PCR czasu rzeczywistego (RT-qPCR) oraz western blot. Mimo, że metody te były już częściowo opracowane[33], wymagały one dodatkowej optymalizacji dla poszczególnych białek Gli. W przypadku metody qRT-PCR zoptymalizowałem sekwencję oraz stężenie starterów do reakcji PCR (Tabela 1 w [34]), natomiast w przypadku metody western blot zoptymalizowałem rozcieńczenia przeciwciał oraz parametry rozdziału i transferu białek (Ryc. 1 w [34]).

F. Wpływ fosforylacji przez PKA na aktywność białek Gli; rola białka Smo w regulacji fosforylacji białek Gli przez PKA

Mając do dyspozycji opracowane metody pomiaru ekspresji, aktywności, oraz poziomu fosforylacji białek Gli, przystąpiłem do badania molekularnych interakcji pomiędzy ścieżką Hedgehog a szlakiem GPCR/cAMP/PKA. Postawiłem dwie hipotezy badawcze:

- (1) Fosforylacja białek Gli przez PKA ma wpływ na aktywność transkrypcyjną białek Gli pełnej długości niezależnie od jej wpływu na tworzenie skróconych represorowych form Gli.
- (2) Białko Smo reguluje aktywność białek Gli przez oddziaływanie na poziom fosforylacji białek Gli przez PKA.

Aby zweryfikować pierwszą hipotezę postanowiłem zbadać aktywność transkrypcyjną zmutowanych białek Gli w których seryny będące miejscami docelowymi kinazy PKA zostały zastąpione przez alaniny. W sekwencji białek Gli2 i Gli3 znajduje się 6 miejsc docelowych PKA, które nazwałem P1-6. Wiadomo było, że miejsca P1-P4 są zaangażowane w tworzenie skróconych represorowych form białek Gli ponieważ ich mutacja (forma P1-4A) powoduje zaburzenie tego procesu [35]. Mimo to, zarodki mysie, w których zamiast endogennego białka Gli2 ekspresowane jest białko Gli2 P1-4A mają dość łagodny fenotyp w obrębie procesów rozwojowych regulowanych przez ścieżkę Hh, nie przypominający silnego fenotypu u embrionów pozbawionych aktywności PKA [5]. Sugeruje to, że pełna aktywacja białek Gli nie może zależeć jedynie od defosforylacji miejsc P1-P4. Postanowiłem porównać aktywność białek Gli2 P1-4A oraz Gli2 P1-6A, w którym wszystkie sześć seryn fosforylowanych przez PKA zostały zastąpione przez alaniny. Okazało się, że zarówno w warunkach nadekspresji, jak i w komórkach stabilnych ekspresujących badane białka na niskim poziomie, białko Gli2 P1-6A jest znacznie bardziej aktywne transkrypcyjnie niż białko Gli2 P1-4A i białko Gli2 dzikiego typu mimo (Ryc. 3 w [36]), że już mutacja pierwszych 4 seryn całkowicie hamuje powstanie represorowych form Gli (Ryc. 2B w [36]). Białko Gli2 P1-6A jest ponadto bardziej skoncentrowane w jądrze komórkowym niż Gli2 P1-4A (Ryc. 3B w [36]), co też świadczy o jego podwyższonym poziomie aktywności. Oznacza to, że o ile seryny P1-4 regulują powstawanie form represorowych białek Gli, o tyle seryny P5 i P6 mają kluczowe znaczenie dla aktywności transkrypcyjnej białek Gli pełnej długości.

Mimo, że wyniki uzyskane na hodowlach komórkowych były niezwykle obiecujące, trudno było na ich podstawie stwierdzić, czy te same mechanizmy mają kluczowe znaczenie w regulacji białek Gli w żywym organizmie. Aby zweryfikować *in vivo* wyniki badań przeprowadzonych w hodowlach, nawiązałem współpracę z Jennifer Kong z laboratorium dr Bennetta Novitcha na University of California, Los Angeles. Dr Novitch specjalizuje się w badaniu rozwoju embrionalnego kręgowców przy użyciu metody elektroporacji embrionów kurzych wewnątrz jaja. Ta metoda jest niezwykle przydatna w analizie regulacji ścieżki Hh, ponieważ w embrionach kurzych, tak jak w embrionach ludzkich, Shh odgrywa kluczową rolę w tworzeniu wzorca osi grzbietowo-brzuszej w rdzeniu kręgowym (patrz również część B). Wprowadzenie do cewy nerwowej konstruktyw które zaburzają funkcję ścieżki Hh powoduje zmiany w różnicowaniu się różnych typów neuronów: konstrukty które aktywują ścieżkę Hh powodują ektopową ekspresję genów charakterystycznych dla brzusznych neuronów w grzbietowej części rdzenia, natomiast konstrukty, które hamują sygnalizację Hh powodują nieprawidłowe różnicowanie się neuronów grzbietowych w brzusznej części rdzenia. Pani Kong elektroporowała przygotowane przeze mnie konstrukty DNA zawierające sekwencję Gli2 dzikiego typu, Gli2 P1-4A oraz Gli2 P1-6A do cewy nerwowej zarodków kurzych, a następnie po 2 dniach utrzymywała embriony i badała ekspresję markerów poszczególnych grup neuronów metodą immunofluorescencji. Z badań tych wynikało, że Gli2 P1-6A, ale nie Gli2 P1-4A, stymuluje różnicowanie neuronów z rejonów brzusznych rdzenia kręgowego (ekspresujących markery FOXA2, NKX2.2, oraz NKX6.1) w grzbietowych częściach rdzenia (Ryc. 4 w [36]). Świadczy to o ektopowej aktywacji ścieżki Hh w grzbietowych częściach rdzenia kręgowego u embrionów z ekspresją Gli2 P1-6A i stanowi potwierdzenie wysokiej aktywności transkrypcyjnej tego mutantu Gli2. Doświadczenia te pokazują, że fosforylacja białek Gli przez PKA odgrywa kluczową rolę w regulacji ich aktywności nie tylko w hodowlach komórkowych, ale także *in vivo*.

W celu zbadania hipotezy (2) a więc sprawdzenia, czy białko Smo kontroluje poziom fosforylacji białek Gli użyłem opracowanej przeze mnie we współpracy z dr Robertem Ahrendsem metodologii polegającej na izolacji białka Gli2 z lizatów komórkowych i badaniu poziomu jego fosforylacji przy użyciu spektrometrii mas. Ustaliliśmy, że w komórkach hodowanych w obecności agonisty Smo – SAG poziom fosforylacji miejsc P1, P2, P5 i P6 jest niższy niż w komórkach kontrolnych (Ryc. 5 w [36]). Jest to zgodne z postawioną przeze mnie hipotezą, że Smo aktywuje białka Gli przez zahamowanie fosforylacji białek Gli przez PKA.

Dodatkowym ciekawym wynikiem, jaki uzyskaliśmy w przebiegu badań nad fosforylacją Gli2, był rosnący poziom fosforylacji dodatkowego miejsca niebędącego miejscem docelowym dla PKA znajdującego się w N-końcowej części białka Gli2. Miejsce to, nazwane Pg, ulegało fosforylacji w tym samym czasie kiedy fosforylacja miejsc P1-P6 zmniejszała się (Ryc. 6 w [36]). Sugeruje to, że fosforylacja miejsca Pg uczestniczy w aktywacji białek Gli. Zgodnie z tą hipotezą, kiedy serynę Pg oraz kilka dodatkowych seryn i treonin w tej samej okolicy zamieniono na kwaśne („fosfomimetyczne”) reszty glutaminianu, tak skonstruowany mutant Pc-gE miał wyższą aktywność transkrypcyjną niż Gli2 dzikiego typu. Co więcej, Gli2 Pc-gE jest mniej stabilny w komórkach, co często jest oznaką wyższej aktywności białka Gli2. Aktywne formy białek Gli są bowiem degradowane w jądrze przy udziale białka adaptorowego ligazy ubikwityny o nazwie SPOP [22]. Dalsze badania powinny odpowiedzieć na pytanie jaka kinaza jest odpowiedzialna za fosforylację miejsca Pg oraz czy i w jaki sposób Pg i inne miejsca fosforylacji w tym samym klastrze seryn i treonin biorą udział w zwiększeniu aktywności transkrypcyjnej białek Gli.

G. Podsumowanie

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionych prac uważam:

1. Pokazanie, że ścieżka Hh jest regulowana przez oś PACAP/cAMP/PKA w komórkach progenitorowych rdzenia kręgowego. Hodowla tych komórek w obecności aktywatora ścieżki Hh powoduje, że powstają z nich neurony o fenotypie zbliżonym do neuronów w brzusznej części rdzenia kręgowego. Dodanie PACAP do hodowli hamuje różnicowanie progenitorów w kierunku neuronów brzusznych.
2. Odkrycie, że ścieżka Hh regulowana jest przez dwie niezależne pule komórkowego PKA. Jedna z tych pul regulowana jest bezpośrednio przez sygnalizację Hh, ale jej udział w całkowitej aktywności PKA w komórce jest niewielki. Druga większa pula nie podlega bezpośrednio regulacji przez sygnalizację Hh, ale jest modulowana przez receptory związane z białkami G (GPCR). Współpraca pomiędzy tymi dwiema pulami PKA w komórce daje możliwość precyzyjnego regulowania poziomu aktywności czynników transkrypcyjnych Gli.
3. Wykazanie, że PKA wpływa na czynniki transkrypcyjne Gli poprzez zmianę ich lokalizacji w rzęsce pierwotnej. Stymulacja komórek agonistami ścieżki Hh powoduje akumulację białek Gli na koniuszku rzęski. Aktywacja PKA działa antagonistycznie do sygnału Hh i powoduje ucieczkę białek Gli z rzęski.
4. Pokazanie, że białka rozpuszczalne mogą przedostawać się do rzęski pierwotnej na zasadzie utrudnionej dyfuzji przez sito molekularne. To zjawisko tłumaczy dlaczego większe cząsteczki białek dostają się do rzęski znacznie wolniej niż by to wynikało z fizycznych praw dyfuzji w cieczach. Duże białka są selektywnie wychwytywane przez sito u podstawy rzęski i ich przedostawanie się do wnętrza jest przez to zahamowane.
5. Opracowanie nowatorskich metod badania molekularnych i biochemicznych aspektów regulacji białek Gli w sygnalizacji Hh. Aktywność zmutowanych białek Gli badana była przy użyciu szybkiej metody generowania stabilnych linii komórkowych przy użyciu systemu Flp-In. Poziom fosforylacji białek Gli na wybranych resztach aminokwasowych był sprawdzany przez ilościową spektrometrię mas (metoda SRM).
6. Pokazanie, że fosforylacja białek Gli przez PKA ma kluczowe znaczenie nie tylko dla tworzenia skróconych form represorowych, ale również dla zahamowania aktywności transkrypcyjnej białek Gli pełnej długości. Białko Gli2 w którym usunięto miejsca fosforylacji przez PKA jest konstytutywnie aktywne i nie podlega regulacji przez ścieżkę Hh. Aktywność mutantu Gli2 P1-6A została pokazana zarówno w hodowli komórkowej, jak i w modelu *in vivo*.
7. Odkrycie, że stymulacja Smo powoduje defosforylację białek Gli na resztach fosforylowanych przez PKA. Sugeruje to, że PKA jest nie tylko zewnętrznym modulatorem ścieżki Hh, ale że kinaza ta stanowi integralną część sygnału Hh bezpośrednio regulowaną przez Ptch i Smo i wpływającą na aktywność transkrypcyjną białek Gli.

Uzyskane wyniki sugerują, że fosforylacja białek Gli przez PKA stanowi podstawowy mechanizm dzięki któremu pod nieobecność liganda Hh białka te pozostają nieaktywne transkrypcyjnie lub ulegają konwersji do form represorowych. W obecności liganda Hh, kinaza PKA podlega regulacji przez receptory związane z białkami G takie, jak receptor peptydu PACAP, co z kolei przyczynia się do modulacji transkrypcji zależnej od ścieżki Hh niezależnie od kanonicznej kaskady Hh. Podstawowym efektem fosforylacji białek Gli przez PKA jest zablokowanie ich lokalizacji w rzęsce pierwotnej, co może być związane z zahamowaniem ich aktywnego transportu przez barierę w postaci sita molekularnego u podstawy rzęski.

H. Literatura

(Prace wchodzące w skład osiągnięcia zaznaczono pogrubionym drukiem.)

1. Jiang J, Hui C-C. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*. 2008;15: 801–812. doi:10.1016/j.devcel.2008.11.010
2. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996;85: 841–851.
3. Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science*. 1998;280: 1603–1607.
4. Chen Y, Gallaher N, Goodman RH, Smolik SM. Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95: 2349–2354.
5. Epstein DJ, Marti E, Scott MP, McMahon AP. Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Dev Camb Engl*. 1996;122: 2885–2894.
6. Goetz SC, Anderson KV. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet*. 2010;11: 331–344. doi:10.1038/nrg2774
7. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. Gli2 and Gli3 Localize to Cilia and Require the Intraflagellar Transport Protein Polaris for Processing and Function. *PLoS Genet*. 2005;1: e53. doi:10.1371/journal.pgen.0010053
8. Metcalfe C, de Sauvage FJ. Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against Smoothed antagonists. *Cancer Res*. 2011;71: 5057–5061. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0923
9. Jones DTW, Jäger N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*. 2012;488: 100–105. doi:10.1038/nature11284
10. Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Dev Camb Engl*. 2008;135: 2489–2503. doi:10.1242/dev.009324
11. Waschek JA, Casillas RA, Nguyen TB, DiCicco-Bloom EM, Carpenter EM, Rodriguez WI. Neural tube expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and receptor: potential role in patterning and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95: 9602–9607.
12. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev*. 2000;52: 269–324.
13. **Hirose M, Niewiadomski P, Tse G, Chi GC, Dong H, Lee A, et al. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide counteracts hedgehog-dependent motor neuron production in mouse embryonic stem cell cultures. *J Neurosci Res*. 2011;89: 1363–1374. doi:10.1002/jnr.22675**
14. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 2002;110: 385–397.

15. Lelievre V, Seksenyan A, Nobuta H, Yong WH, Chhith S, Niewiadomski P, et al. Disruption of the PACAP gene promotes medulloblastoma in *ptc1* mutant mice. *Dev Biol.* 2008;313: 359–370. doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.031
16. Kenney AM. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development.* 2003;130: 15–28. doi:10.1242/dev.00182
17. Schüller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han Y-G, et al. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell.* 2008;14: 123–134. doi:10.1016/j.ccr.2008.07.005
- 18. Niewiadomski P, Zhujiang A, Youssef M, Waschek JA. Interaction of PACAP with Sonic hedgehog reveals complex regulation of the hedgehog pathway by PKA. *Cell Signal.* 2013;25: 2222–2230. doi:10.1016/j.cellsig.2013.07.012**
19. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature.* 2003;426: 83–87. doi:10.1038/nature02061
20. Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102: 11325–11330. doi:10.1073/pnas.0505328102
21. Liu A, Wang B, Niswander LA. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Dev Camb Engl.* 2005;132: 3103–3111. doi:10.1242/dev.01894
22. Chen M-H, Wilson CW, Li Y-J, Law KKL, Lu C-S, Gacayan R, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* 2009;23: 1910–1928. doi:10.1101/gad.1794109
23. Kim J, Kato M, Beachy PA. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothed in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 21666–21671. doi:10.1073/pnas.0912180106
24. Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol.* 2009;187: 365–374. doi:10.1083/jcb.200907126
25. Liem KF, Ashe A, He M, Satir P, Moran J, Beier D, et al. The IFT-A complex regulates Shh signaling through cilia structure and membrane protein trafficking. *J Cell Biol.* 2012;197: 789–800. doi:10.1083/jcb.201110049
26. Nachury MV, Loktev AV, Zhang Q, Westlake CJ, Peränen J, Merdes A, et al. A Core Complex of BBS Proteins Cooperates with the GTPase Rab8 to Promote Ciliary Membrane Biogenesis. *Cell.* 2007;129: 1201–1213. doi:10.1016/j.cell.2007.03.053
- 27. Lin Y-C, Niewiadomski P, Lin B, Nakamura H, Phua SC, Jiao J, et al. Chemically inducible diffusion trap at cilia reveals molecular sieve-like barrier. *Nat Chem Biol.* 2013;9: 437–443. doi:10.1038/nchembio.1252**
28. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Dev Camb Engl.* 1999;126: 3915–3924.

-
- 29. Niewiadomski P, Rohatgi R. Rapid Screening of Gli2/3 Mutants Using the Flp-In System. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2015;1322: 125–130. doi:10.1007/978-1-4939-2772-2_11**
 30. Blaydes JP, Vojtesek B, Bloomberg GB, Hupp TR. The development and use of phospho-specific antibodies to study protein phosphorylation. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2000;99: 177–189. doi:10.1385/1-59259-054-3:177
 31. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods.* 2012;9: 555–566. doi:10.1038/nmeth.2015
 - 32. Ahrends R, Niewiadomski P, Teruel MN, Rohatgi R. Measuring Gli2 Phosphorylation by Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2015;1322: 105–123. doi:10.1007/978-1-4939-2772-2_10**
 33. Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 2010;24: 670–682. doi:10.1101/gad.1902910
 - 34. Niewiadomski P, Rohatgi R. Measuring Expression Levels of Endogenous Gli Genes by Immunoblotting and Real-Time PCR. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2015;1322: 81–92. doi:10.1007/978-1-4939-2772-2_8**
 35. Pan Y, Wang C, Wang B. Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol.* 2009;326: 177–189. doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.009
 - 36. Niewiadomski P, Kong JH, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, et al. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. Cell Rep. 2014;6: 168–181. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.003**

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1 Dane bibliometryczne

Sumaryczny IF publikacji (wg JCR – wg daty publikacji): 55.84

Całkowita liczba cytowań („Sum of times cited” wg bazy ISI Web of Knowledge): 200

Index Hirscha (wg bazy ISI Web of Knowledge): 8

5.2 Lista publikacji niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

1. Karolczak J, Pavlyk I, Majewski Ł, Sobczak M, **Niewiadomski P**, Rzhepetsky Y, Sikorska A, Nowak N, Pomorski P, Prószyński T, Ehler E, Rędownicz MJ. „Involvement of unconventional myosin VI in myoblast function and myotube formation.”, *Histochemistry and Cell Biology*, 144:21-38 (2015)
2. Cohen JR, Resnick DZ, **Niewiadomski P**, Dong H, Liau LM, Waschek JA., “Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide inhibits gli1 gene expression and proliferation in primary medulloblastoma derived tumorsphere cultures.”, *BMC Cancer*, 10: 676 (2010).
3. Kim WK, Meliton V, Park KW, Hong C, Tontonoz P, **Niewiadomski P**, Waschek JA, Tetradis S, Parhami F., “Negative regulation of Hedgehog signaling by liver X receptors.” *Molecular Endocrinology*, 23: 1532-43 (2009).
4. **Niewiadomski P**, Coûté-Monvoisin AC, Abad C, Ngo D, Menezes A, Waschek JA., “Mice Deficient in both Pituitary Adenylyl Cyclase-activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Peptide Survive, but Display Growth Retardation and Sex-dependent Early Death.”, *Journal of Molecular Neuroscience*, 36: 200-7 (2008).
5. Lelievre V, Seksenyan A, Nobuta H, Yong WH, Chhith S, **Niewiadomski P**, Cohen JR, Dong H, Flores A, Liau LM, Kornblum HI, Scott MP, Waschek JA. “Disruption of the PACAP gene promotes medulloblastoma in ptc1 mutant mice.”, *Developmental Biology*, 313: 359-70 (2008).
6. Abad C, **Niewiadomski P**, Loh DH, Waschek JA “Neurotransmitter and Immunomodulatory Actions of VIP and PACAP: Lessons from Knockout Mice.” *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 12: 297-310 (2006).
7. Zawilska JB, Dejda A, **Niewiadomski P**, Nowak JZ, “Receptors for VIP and PACAP in guinea pig cerebral cortex: effects on cyclic AMP synthesis and characterization by [125I]-VIP binding”, *Journal of Molecular Neuroscience* 25: 215-224 (2005).
8. Zawilska JB, **Niewiadomski P**, Nowak JZ, “Receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in goose cerebral cortex.” *Polish Journal of Pharmacology* 56: 203-211 (2004).
9. Zawilska JB, **Niewiadomski P**, Nowak JZ, “Receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) in turkey cerebral cortex: characterization by [125I]-VIP binding and effects on cyclic AMP synthesis.” *General and Comparative Endocrinology*, 137: 187-195 (2004).

10. Zawilska JB, **Niewiadomski P**, Nowak JZ, "Characterization of vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptors in chick cerebral cortex." *Journal of Molecular Neuroscience*, 20: 153-162 (2003).
11. Zawilska JB, **Niewiadomski P**, Nowak JZ, "PAC(1) receptors in chick cerebral cortex: characterization by binding of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, [125I]-PACAP27." *Neuroscience Letters*, 338: 155-158 (2003).
12. Zawilska JB, **Niewiadomski P**, Nowak JZ, "Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-evoked increase in cyclic AMP production in chick cerebral cortex: lack of role of the protein kinase C pathway." *Polish Journal of Pharmacology*, 55: 245-250 (2003).
13. Sędkowska P, **Niewiadomski P**, Zawilska JB, Nowak JZ, "Peptydy PACAP i VIP: występowanie, receptory i rola fizjologiczna" *Postępy Biologii Komórki* 30: 522-547 (2003).
14. **Niewiadomski P**, Nowak JZ, Sedkowska P, Zawilska JB. "Rapid desensitization of receptors for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in chick cerebral cortex." *Polish Journal of Pharmacology*, 54: 717-721 (2002).
15. **Niewiadomski P**, Sędkowska P, Nowak JZ, „Receptory dla VIP i PACAP” rozdział w książce „Receptory i Mechanizmy Przekazywania Sygnału”, pod redakcją Nowak JZ i Zawilska JB, PWN, Warszawa, 2004: str. 491-504. (*monografia*)

5.3 Krótkie streszczenie osiągnięć naukowych niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

A. Analiza porównawcza sygnalizacji PACAP/VIP w mózgu kręgowców

W przebiegu mojego stażu magisterskiego a następnie doktorskiego zajmowałem się biochemicznymi mechanizmami sygnalizacji zależnej od peptydów PACAP i VIP w mózgu kręgowców. PACAP i VIP należą do rodziny wydzielanych peptydów sygnalizujących przez receptory związane z białkami G. U ssaków występują trzy rodzaje receptorów PACAP/VIP – PAC1 selektywnie wiąże PACAP, natomiast receptory VPAC1 i VPAC2 wiążą VIP i PACAP z podobnym powinowactwem. Najpierw pokazałem, że receptory PACAP w korze mózgowej kurczęcia ulegają szybkiej desensytyzacji pod wpływem niskich stężeń PACAP (publikacja 14) a także pokazałem, że kinaza białkowa C nie wpływa zwrótnie na sygnalizację przez PACAP (publikacja 12). W dalszej kolejności dokonałem analizy porównawczej charakterystyki farmakologicznej receptorów dla PACAP i VIP w korze mózgowej trzech gatunków ptaków (kurczęcia, gęsi i indyka) oraz jednego ssaka (świnki morskiej) przy użyciu metod wiązania radioligandów do receptorów w preparatach błonowych oraz pomiaru produkcji cAMP pod wpływem ligandów nieoznakowanych (publikacje 7,8,9,10,11). Pokazałem, że receptory PACAP/VIP u różnych gatunków mają bardzo podobne właściwości biochemiczne, choć receptory ssacze wykazują paradoksalnie nieco wyższe powinowactwo do krótkiej formy VIP niż do formy ssaczej. Było to zgodne z obserwacją, że kurzy VIP silnie stymulował w korze mózgowej świnki morskiej produkcję cAMP.

B. Badanie wpływu mutacji genów PACAP i VIP na rozwój postnatalny u myszy

Po obronie pracy doktorskiej i krótkim okresie pracy dydaktyczno-naukowej na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi wyjechałem na staż podoktorski do University of California, Los Angeles do laboratorium dr Jamesa A. Waschek'a. Tam kontynuowałem swoje badania nad peptydami PACAP i VIP, tym razem skupiając się na roli tych peptydów w rozwoju postnatalnym u ssaków. Ponieważ zarówno PACAP, jak i VIP wiąże się do receptorów typu VPAC z podobnym powinowactwem, ich role w organizmie mogą częściowo pokrywać się ze sobą. W związku z tym, delecja jednego z peptydów może spowodować, że drugi przejmie jego funkcję. Aby zbadać rolę peptydów VIP i PACAP u mysich

osesków i u osobników dorosłych, skrzyżowałem myszy z delecją genu vip oraz myszy z delecją genu pacap. Myszy pozbawione obu genów (DKO – double knockout) wykazały wiele zaburzeń rozwoju postnatalnego, które nie były widoczne u myszy z delecją jednego z genów. W szczególności, myszy DKO rosną znacznie wolniej niż myszy typu dzikiego. Różne organy myszy DKO wykazują różne tempo wzrostu, przy czym najwolniej rosną u nich grasica i śledziona, a najszybciej mózg. Co więcej, samice myszy DKO umierają znacznie częściej niż samice dzikiego typu w pierwszych sześciu miesiącach życia. Nie udało się nam ustalić przyczyny śmierci samic DKO ani też przyczyny spowolnionego wzrostu osesków, ale sądzimy, że zaburzenie wzrostu może być spowodowane zmniejszonym poziomem peptydu IGF1 w osoczu myszy DKO (publikacja 4).

C. Badanie hamującego wpływu PACAP na powstawanie rdzeniaka zarodkowego u myszy z mutacją ptch1

W laboratorium Jamesa Waschek'a również po raz pierwszy podjąłem tematykę interakcji między sygnalizacją zależną od PACAP/GPCR a ścieżką Hh. Uczestniczyłem w projekcie, w którym badaliśmy nowotworzenie u myszy ze zmutowanym jednym z alleli genu ptch1 (myszy ptch1+/-). U około 20% tych myszy rozwijają się nowotwory mózdzku bardzo przypominające ludzki nowotwór rdzeniak zarodkowy (ang. medulloblastoma; MB). Wykazaliśmy, że dodatkowa mutacja jednego allelu genu pacap (myszy podwójnie heterozygotyczne – double heterozygous ; DH) powoduje trzykrotne zwiększenie odsetka myszy z nowotworami (publikacja 5). Co więcej pokazaliśmy, że MB z myszy DH mają wyższą ekspresję genów zależnych od ścieżki Hh niż nowotwory u myszy ptch1+/- oraz, że egzogennie podany PACAP obniża proliferację linii komórkowej wyprowadzonej z mysiego guza MB.

W wielu nowotworach występują tak zwane rakowe komórki macierzyste (cancer stem cells – CSC), które są odporne na tradycyjną chemio- i radioterapię i mogą powodować nawrót nowotworu nawet po długotrwałym i agresywnym leczeniu. Kontynuując nasz cykl badań nad rdzeniakiem zarodkowym, postanowiliśmy sprawdzić, czy PACAP wpływa na właściwości komórek nowotworowych, które upodabniają je do komórek macierzystych. Opracowaliśmy metodę propagacji komórek CSC z mysiego rdzeniaka zarodkowego, polegającą na hodowli tych komórek w zawieszynie jako tzw. rakosfery. Wykazaliśmy, że PACAP hamuje ekspresję genu docelowego sygnalizacji Hh – Gli1 oraz zmniejsza proliferację komórek wewnątrz rakosfer, co potwierdza potencjalną użyteczność PACAP jako środka terapeutycznego w MB (publikacja 2).

D. Wykazanie wpływu receptorów LXR na sygnalizację Hh

We współpracy z grupą dr Farhada Parhamiego z UCLA podjąłem tematykę interakcji ścieżki Hh z receptorami typu Liver X Receptors (LXR). Wykazaliśmy, że stymulacja LXR przy użyciu agonistów tych receptorów powoduje zmniejszenie aktywacji ścieżki Hh w komórkach zrębu szpiku kostnego oraz w hodowlach organotypowych kości czaszki. Agoniści LXR nie hamują ścieżki Hh w fibroblastach, gdzie receptory LXR nie ulegają ekspresji, ani w komórkach, w których ekspresja LXR jest zahamowana przy użyciu siRNA. Podawanie agonistów LXR myszom powoduje obniżenie ekspresji genów docelowych ścieżki Hh w wątrobie, płucach i śledzionie. Badania te sugerują, że agoniści LXR mogą być użyci do zahamowania ścieżki Hh w stanach patologicznych takich jak nowotwory zależne od sygnalizacji Hh (publikacja 3).

E. Badanie funkcji miozyny VI w rozwoju komórek mięśniowych

Po powrocie do Polski pracowałem przez niemal dwa lata w Pracowni Synaptogenezy Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego pod kierunkiem dr Tomasza Prószyńskiego. W ramach współpracy między Pracownią Synaptogenezy a Pracownią Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych badaliśmy wpływ miozyny VI na rozwój komórek mięśniowych. Pokazaliśmy, że zahamowanie ekspresji miozyny VI lub ekspresja formy zmutowanej w mioblastach powoduje zaburzenie migracji oraz kształtu tych komórek oraz zaburza formowanie przez nie miotub. Mioblasty z zahamowaną ekspresją miozyny VI wykazywały również liczne zaburzenia morfologii organelli oraz cytoszkieletu. Nasze badania sugerują, że miozyna VI odgrywa istotną rolę w rozwoju komórek mięśniowych (publikacja 1).

5.4 Kierowanie i udział w projektach naukowych

Charakter udziału w projekcie	Tytuł projektu	Nr projektu	Źródła finansowania	Wysokość finansowania	Miejsce realizacji	Lata
Współwykonawca	PKA modulation of Hedgehog: a mouse medulloblastoma model	CA110384	US National Institutes of Health	1 431 835 USD	University of California Los Angeles	2005-2009
Główny wykonawca/współautor or wniosku	Protein kinase A/Hedgehog pathway interaction at the primary cilium	HD068686	US National Institutes of Health	154 000 USD	University of California Los Angeles/Stanford University	2011-2012
Główny wykonawca/współautor or wniosku	High throughput imaging of Hedgehog pathway components at the primary cilium	NS074091	US National Institutes of Health	316 000 USD	Stanford University	2011-2012
Współwykonawca	Regulation of Gli Proteins in Medulloblastoma	-	Sontag Foundation Distinguished Scientist Award	600 000 USD	Stanford University	2011-2012
Współwykonawca	Dissecting the Role of the Tumor Suppressor Sufu in Hedgehog-driven Cancers	-	V Foundation Scholar Award	200 000 USD	Stanford University	2011-2012
Współwykonawca	Molekularne podstawy rozwoju synapsy nerwowo-mięśniowej	2012/05/E/N Z3/00487	Narodowe Centrum Nauki	1 500 000 PLN	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego	2013-2015
Kierownik grantu	Rola białka Arhgef5 w rozwoju synapsy nerwowo-mięśniowej	2014/13/B/N Z3/00909	Narodowe Centrum Nauki	1 497 300 PLN	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego	2015-2018
Kierownik grantu	Rola rzęski pierwotnej w aktywacji czynników transkrypcyjnych Gli w sygnalizacji Hedgehog	2014/14/E/N Z3/00033	Narodowe Centrum Nauki	1 981 030 PLN	Uniwersytet Warszawski	2015-2020

5.5 Udział i w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Byłem współautorem doniesień zjazdowych na następujących konferencjach:

- 2015 – 44th European Muscle Conference, Warszawa
- 2015 – EMBO Young Scientists Forum, Warszawa
- 2014 – 1st Congress of the Polish Biochemistry, Cell Biology, Biophysics and Bioinformatics - Warszawa
- 2012 – 1st Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting – Poznań
- 2009 - 17th International Symposium on Regulatory Peptides – Santa Barbara, USA
- 2009 – 9th International Congress of the Polish Neuroscience Society, Warszawa
- 2008 - Hedgehog Signaling in Development and Disease – Stanford University, USA
- 2004 - 4th Forum of European Neuroscience – Lizbona, Portugalia
- 2004 - XVth International Congress of the Polish Pharmacological Society - Poznań
- 2003 - 6th International Congress of the Polish Neuroscience Society – Warszawa