



Autoreferat

Dr Paweł Kozielowicz

Department of Physiology and Pharmacology

Karolinska Institute

Stockholm, Sweden



2021

Spis treści

1. Imię i nazwisko	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	5
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	5
4.1. Tytuł osiągnięcia.....	5
4.2 Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia.....	6
4.3. Opis wyników badań.....	7
4.4. Podsumowanie	24
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną, realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	24
5.1. Wykaz prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora	24
5.2. Wykaz prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora (wykaz nie obejmuje prac przedstawionych w punkcie 4.2.)	26
5.3. Publikacje w czasopismach lub w monografiach nieposiadających współczynnika Impact Factor:.....	27
5.4. Informacje naukometryczne	28
5.5. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.....	29
5.6. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji	30
5.7. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów. Podano rok przyznania finansowania.....	31
5.8. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach	31
5.9. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru	32

5.10. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych	32
5.11. Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.....	32
5.12. Współpraca z ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą	33
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	34
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej	34
7.1. Przyznanie finansowanie w ramach indywidualnych grantów badawczych	34
7.2. Nagrody, wyróżnienia i stypendia.....	36
7.3. Przebyte szkolenia i kursy	36
8. Literatura	37

1. Imię i nazwisko

Paweł Kozielowicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2017: stopień doktora w naukach medycznych (PhD in Clinical and Experimental Medicine)

Uczelnia: Institute of Clinical Sciences, College of Medical & Dental Sciences, University of Birmingham, United Kingdom

data obrony: 06/01/2017

Praca doktorska: "Neuropharmacological studies on potential therapeutical drugs and targets".

Promotor: Profesor Nicholas M. Barnes, University of Birmingham, UK

Promotor pomocniczy: Doktor John S. Curnow, University of Birmingham, UK

Recenzenci: Doktor Youcef Mehellou, University of Cardiff, UK

Doktor Tom Blackburn, Translational Pharmacology BioVentures Ltd, UK

2013: tytuł magistra farmacji

Uczelnia: Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

data obrony: 28/02/2013

Praca magisterska: „Modelowanie molekularne w badaniu pentacyklicznych alkaloidów oksoindolowych *Uncaria tomentosa*”.

Pracę wykonałem w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Promotor: Profesor Iwona Wawer, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzent: Profesor Maciej Małecki, Warszawski Uniwersytet Medyczny

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

od VIII 2017: stanowisko typu post-doc w grupie Prof. Gunnara Schulte, Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

III – VI 2017: stanowisko badacza w grupie Prof. Agnieszki Chacińskiej, Laboratorium Biogenezy Mitochondriów, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Polska

XI 2016 – II 2017: stanowisko asystenta w grupie Prof. Agnieszki Chacińskiej, Laboratorium Biogenezy Mitochondriów, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Polska

IX 2013 – IX 2016: stanowisko typu Marie-Curie Research Associate w Celentyx Ltd., Birmingham, United Kingdom

IX 2013 – I 2017: studia doktoranckie w ramach europejskiego programu stypendialnego Marie Curie (FP-7 Marie-Curie Initial Training Network "DECIDE"), Institute of Clinical Sciences, College of Medical & Dental Sciences, University of Birmingham, United Kingdom

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia

Badania strukturalno-funkcyjne, farmakologia i znaczenie kliniczne receptorów sprzężonych z białkiem G z klasy F.

4.2 Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

Prace oryginalne:

1. Wright, S.C.#, **Kozielowicz, P.#**, Kowalski-Jahn, M., Petersen, J., Bowin, C.F., Słodkiewicz, G., Solano, M.M., Rodríguez, D., Hot, B., Okashah, N., Strakova, K., Valnohova, J., Babu, M.M., Lambert, N.A., Carlsson, J., Schulte, G.,
A conserved molecular switch in Class F receptors regulates receptor activation and pathway selection,
(2019) **Nature Communications** 10, 667, # equal contribution, **IF2019 = 12,121; MNiSW = 200** (czasopismo klasyfikowane m.in. w dyscyplinie nauki medyczne wg MNiSW)
2. **Kozielowicz, P.**, Bowin, C.-F., Turku, A., Schulte, G.,
A NanoBRET-Based Binding Assay for Smoothed Allows Real-time Analysis of Ligand Binding and Distinction of Two Binding Sites for BODIPY-cyclopamine,
(2020) **Molecular Pharmacology**, 97 (1), pp. 23-34, **IF2019 = 3,664; MNiSW = 140** (czasopismo klasyfikowane m.in. w dyscyplinie nauki medyczne wg MNiSW)
3. **Kozielowicz, P.**, Turku, A., Bowin, C.-F., Petersen, J., Valnohova, J., Cañizal, M.C.A., Ono, Y., Inoue, A., Hoffmann, C. and Schulte, G.,
Structural insight into small molecule action on Frizzleds,
(2020) **Nature Communications** 11, 414, **IF2019 = 12,121; MNiSW = 200** (czasopismo klasyfikowane m.in. w dyscyplinie nauki medyczne wg MNiSW)
4. Wesslowski, J. #, **Kozielowicz, P. #**, Wang X., Curi, H., Schihada, H., Kranz, D., Karuna M.P., Levkin, P., Gross, J.C., Boutros, M., Schulte, G. and Davidson, G.,
eGFP-tagged Wnt-3a enables functional analysis of Wnt trafficking and signaling and kinetic assessment of Wnt binding to full-length Frizzled,
(2020) **Journal of Biological Chemistry**, 295 (26), pp. 8759-8774, # equal contribution, **IF2019 = 4,238; MNiSW = 100** (czasopismo klasyfikowane m.in. w dyscyplinie nauki medyczne wg MNiSW)

Prace przeglądowe:

5. **Kozielowicz, P.**, Turku, A., Schulte, G.,
Molecular Pharmacology of Class F Receptor Activation,
(2020) **Molecular Pharmacology**, 97 (2), pp. 62-71, **IF2019 = 3,664**;
MNiSW = 140 (czasopismo klasyfikowane m.in. w dyscyplinie nauki medyczne wg MNiSW)
6. Schulte, G. and **Kozielowicz, P.**,
Structural insight into Class F receptors – what have we learnt regarding agonist-induced activation?,
(2019) **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**,
<https://doi.org/10.1111/bcpt.13235> published in: (2020) **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 126 (S6), pp. 17-24, **IF2019 = 2,651**;
MNiSW = 70 (czasopismo klasyfikowane m.in. w dyscyplinie nauki medyczne wg MNiSW)

Sumaryczny IF cyklu publikacji: **38,459**

Sumaryczna punktacja MNiSW cyklu publikacji: **850**

4.3. Opis wyników badań

Receptory sprzężone z białkami G (ang. *G protein-coupled receptor, GPCR*) stanowią największą grupę białek produkowanych w organizmie ludzkim [1]. Około 700 różnych leków oddziałuje na 134 receptory sprzężone z białkami G, zatem GPCRs są jednocześnie najczęstszymi celami makromolekularnymi dla leków dostępnych na rynku. [2, 3]. Co ważne, do tej pory nie udało się w pełni scharakteryzować wszystkich GPCRs, część z nich pozostaje tzw. receptorami sierocymi (ang. *orphan*), wciąż nie zostały jeszcze odkryte ich ligandy endogenne [4]. Wydaje się więc, że rozwój badań nad GPCR jest jednym z kluczowych celów dla dalszego rozwoju medycyny.

Aktywacja GPCR jest obecnie opisywana tzw. modelem trzeciorzędowym (ang. *ternary complex model*), gdzie przyłączenie substancji aktywującej receptor (agonisty) w miejscu wiązania receptora, w obecności podjednostki α białka G, powoduje zmianę konformacji receptora – otwarcie szóstej domeny transbłonowej (ang. *transmembrane*

domain 6, TM6). Ten mechanizm leży u podstaw inicjacji ścieżki sygnałowej i aktywacji różnych szlaków komórkowych [5]. Z drugiej strony, klasyczne substancje antagonistyczne blokują działanie agonisty, gdyż wiążą się z receptorem w tym samym miejscu wiązania [6]. Duży postęp w metodach analitycznych, takich jak: krystalografia rentgenowska (ang. *X-ray crystallography*) czy mikroskopia krioelektronowa (ang. *Cryo-EM*) umożliwił poznanie elementów strukturalnych aktywowanych receptorów głównie z klasy A, ale także B, C oraz F [7-11].

Bardzo ciekawą klasę GPCRs – klasę F – stanowią Frizzled (FZD) [12]. Białka te pełnią kluczową rolę w ścieżce sygnałowej Wnt/ β -katenina i często są one klasyfikowane jako „podobne do GPCR” (ang. *GPCR-like*) [13]. Niemniej jednak w ciągu ostatnich opublikowanych zostało kilka kluczowych artykułów naukowych o analizie strukturalnej i funkcyjnej tych receptorów, które pokazują ich pewne podobieństwa do receptorów Klasy A i B GPCR [14-18]. Do rodziny Frizzled należy 10 paralogów Frizzled (FZD₁₋₁₀) i Smoothened (SMO). Dziesięć FZD jest podzielonych na cztery powiązane ewolucyjnie klastry składające się z FZD_{1, 2, 7}, FZD_{3, 6}, FZD_{5, 8} i FZD_{4, 9, 10}. Frizzled regulują wiele procesów podczas rozwoju embrionalnego, dojrzewania komórek macierzystych i homeostazy tkanek dorosłych, jednak ich za duża aktywacja może przyczyniać się do rozwoju różnych chorób nowotworowych [12, 19]. Lipoglikoproteiny z rodziny Wnt są naturalnymi ligandami dla Frizzled. Wyróżnia się 19 ich typów, które oddziałują z Frizzled poprzez interakcje z ich zewnątrzkomórkową domeną bogatą w cysteiny (CRD) [16]. Dotychczas nie udało się poznać dokładnego profilu farmakologicznego Wnt-Frizzled [20]. Wiadomo, że jeden typ Wnt potrafi aktywować kilka różnych białek Frizzled, niewykluczone, że niektóre Wnt są antagonistami lub odwrotnymi agonistami (ang. *inverse agonist*, substancja redukująca konstytucyjną aktywność receptora) [badania grupy Prof. Gunnara Schulte, nieopublikowane]. W klasycznym modelu aktywacji Frizzled, związanie się ligandu Wnt powoduje utworzenie kompleksu Wnt-Frizzled-LRP5/6 [21]. Wewnątrzkomórkowo Frizzled oddziałują z wieloma białkami, z których fosfoproteina Disheveled (DVL) stanowi ważne ogniwo ścieżki WNT/ β -katenina, czyli tzw. ścieżki kanonicznej [21]. Poza ścieżką kanoniczną wyróżnia się ponadto ścieżki niekanoniczne: ścieżkę planarnej polaryzacji komórek (ang. *planar cell polarity*, PCP) i ścieżkę mobilizacji jonów wapnia. Nie jest do końca jasne, czy i jak heterotrymeryczne białka G uczestniczą w ścieżce kanonicznej [22, 23]. Interesujące, że wyścig w opracowywaniu

leków dla FZD już się rozpoczął. Jak wynika z analizy patentów zgłoszonych w latach 2014 – 2016 w naukach medycznych za pośrednictwem World Intellectual Property Organization, FZD to trzecia (*ex aequo* z receptorami hormonów glikoproteinowych z dziewięcioma zgłoszonymi patentami) najintensywniej badana w tym kierunku rodzina receptorów (1. miejsce przypadło receptorom chemokin (ponad sto patentów), zaś 2. miejsce receptorom CaS (jedenaście patentów)) [2].

Z kolei SMO, które na poziomie strukturalnym jest w około 20-30% podobne do Frizzled [24], jest receptorem stanowiącym ważny element szlaku Sonic Hedgehog. W przypadku tego receptora również rozróżnia się sygnalizację kanoniczną i niekanoniczną. Interesujące jest to, że farmakologia SMO została lepiej poznana niż FZD, mimo że stosunkowo niedawno dowiedziono, że to cholesterol jest endogennym ligandem SMO [16, 25, 26]. Natomiast szereg prac pokazał, że SMO wiąże się z i aktywuje białko G_i [10, 27-29].

Najczęściej podawanymi argumentami przeciwko klasyfikacji Frizzled jako GPCR są: brak klasycznych motywów strukturalnych, które posiadają receptory klasy A, jak motywy DR(E)Y lub NPXXY oraz sprzeczne dane na temat roli, jaką białka G pełnią w ścieżce Wnt/ β -katenina [23, 30, 31].

Istotne jest to, że prowadzenie badań nad Frizzled w sposób podobny do klasycznych GPCR było do tej pory praktycznie niemożliwe z powodu stosowania nieodpowiednich metod. Najczęściej stosowaną metodą badania aktywacji Frizzled jest TOPFlash – system genów reporterowych TCF-LEF, gdzie analizowana jest aktywacja ścieżki kanonicznej Wnt/ β -katenina, zazwyczaj po co najmniej kilkugodzinnej stymulacji receptorów [32]. Niestety analiza aktywacji Frizzled tą metodą jest jednowymiarowa, ponieważ nie bierze pod uwagę wczesnych elementów ścieżki sygnałowej. Ponadto wydaje się, że nie wszystkie Frizzled (zwłaszcza FZD₃ i FZD₆) aktywują ścieżkę kanoniczną [30, 33], wobec czego klasyczne metody badań Frizzled nie mogą być stosowane do badania tych dwóch paralogów. Pomimo wyżej wymienionych trudności, w kilku ośrodkach badawczych prowadzone są analizy Frizzled jako GPCR. Wyniki tych badań wskazują m.in. na to, że:

- a) Frizzled wchodzi w interakcje z białkami G [34, 35],
- b) białka Wnt aktywują nieaktywne kompleksy Frizzled-białko G [36],
- c) aktywacja Frizzled przez Wnt inicjuje ścieżki sygnałowe zależne od białka G [37, 38],

d) zmiany konformacyjne w aktywowanych Frizzled przypominają te obserwowane w klasycznych GPCR [38, 39].

Moje zainteresowania naukowe i zbieżny z nimi cel prowadzonych przeze mnie badań naukowych to **rozwój nowych koncepcji i metodologii, które pogłębią naszą wiedzę na temat mechanizmów aktywacji Frizzled**. W swojej pracy skupiam się na zrozumieniu przekazywania sygnału Frizzled, zwłaszcza poprzez analizę struktury tych białek. Mam nadzieję, że wyniki moich badań przyczynią się do stworzenia niskocząsteczkowych ligandów FZD – zwłaszcza odwrotnych agonistów lub antagonistów – które w przyszłości będą stosowane w farmakoterapii.

Celem przedstawionego cyklu badań było:

Publikacja 1: Zastosowanie połączonych metod analizy danych z genomiki populacji osób zdrowych i chorych na różne choroby nowotworowe, analizy dostępnych struktur, użycia modelowania komputerowego oraz nowoczesnych metod biofizycznych, w celu zbadania patofizjologicznego znaczenia mutacji argininy/lizyny w pozycji 6.32 (R/K^{6.32}), konserwatywnej dla receptorów klasy F.

Publikacja 2: Zastosowanie techniki NanoBRET do analizy wiązania ligandów ze SMO, celem ustanowienia czułej i wysoce-przepustowej metody do projektowania nowych ligandów dla SMO i Frizzled.

Publikacja 3: Analiza porównawcza Frizzled i SMO za pomocą metod *in silico* i *in vitro*, celem ustalenia potencjalnego miejsca wiązania dla ligandów niskocząsteczkowych dla Frizzled.

Publikacja 4: Analiza interakcji ligand-Frizzled przy użyciu fluorescencyjnego białka eGFP-Wnt-3a, celem ustalenia siły wiązania i kinetyki oddziaływania ligand-receptor.

Publikacja 5 i 6: Prace przeglądowe mające na celu opis mechanizmów aktywacji receptorów z klasy Frizzled z krytyczną analizą dostępnych artykułów naukowych.

Analiza poszczególnych prac:

Ad Publikacja 1:

W niniejszej publikacji odkryliśmy i opisaliśmy obecność „przełącznika molekularnego” (*ang. molecular switch*) w receptorach klasy F GPCR. W pracy wykorzystaliśmy szereg metod genomiki, modelowania molekularnego i badań *in vitro*. Analiza sekwencji aminokwasowej receptorów klasy F 750 ssaków i nie-ssaków ujawniła kilka pozycji, które są zachowane wśród 10 paralogów człowieka, innych ssaków, a także w całym królestwie zwierząt. Zaobserwowaliśmy, że konserwatywna reszta zasadowa - arginina (R) lub lizyna (K) – w dolnej części TM6 (aminokwas R/K^{6.32} według nomenklatury Ballesterosa-Weinsteina[40]) występuje w kilku zmutowanych postaciach w różnych nowotworach ludzkich, takich jak np. gruczolakorak jelita grubego. W przypadku FZD₆, mutacja R416Q^{6.32} jest najbardziej rozpowszechnionym wariantem związanym ze zmianami nowotworowymi w receptorach klasy F. W innych paralogach FZD lub SMO mutacja R^{6.32} na H, C, Q i S jest związana z różnymi postaciami nowotworów. Prócz tego przeanalizowaliśmy dane genetyczne od ponad 120000 osób zdrowej populacji (gnomAD; www.gnomad.broadinstitute.org). Analiza ta ujawniła, że R^{6.32} wykazuje stosunkowo niewielką naturalną zmienność. Co ciekawe, obliczając względną zmienność (tj. stosunek częstości mutacji nowotworowych do częstości mutacji naturalnej) stwierdziliśmy, że R^{6.32} jest wybiórczo najczęściej mutowaną pozycją w receptorach klasy F. W badaniach *in silico*, analiza obecności kontaktów molekularnych pomiędzy aminokwasami z TM6 i TM7 w opublikowanych strukturach krystalicznych SMO w stanie nieaktywnym wskazała na obecność wiązań wodorowych i oddziaływań kation- π między R451^{6.32} a dolnym końcem TM7 (T534^{7.54}, W535^{7.55}, W537^{7.57}). Co ciekawe, jeden z tryptofanów w TM7 (W^{7.55}) jest konserwatywny u wszystkich członków klasy F, a jego mutacja została zidentyfikowana jako onkogenna w ludzkim SMO (SMOM2; SMOA1 u myszy) [41, 42]. Ponadto analiza struktury jedyne go dostępnego w tamtym czasie Frizzled – FZD₄ [18] – również ujawniła obecność wiązań między K^{6.32} i W^{7.55}.

Następnie skupiliśmy się na analizie *in vitro* wpływu mutacji R/K na aktywację receptorów klasy F. Konstytutywna aktywność GPCR jest tradycyjnie oceniana za pomocą odwrotnych agonistów. Ze względu na brak odwrotnych agonistów FZD,

zastosowaliśmy inhibitory farmakologiczne, w celu stworzenia warunków wolnych od endogennie wydzielanych białek Wnt. Aby sprawdzić, jak mutacja R416A^{6.32} wpływa na konstytutywną aktywność transfekowanego rekombinowanego FZD₆ (SNAP-FZD₆), monitorowaliśmy podstawową fosforylację kinaz aktywowanych mitogenami ERK1/2. Zastosowanie substancji C59 [43], która hamuje porkupinę – enzym niezbędny do acylacji i wydzielania Wnt – prowadzi do uzyskania warunków, gdzie receptory nie mogą być aktywowane przez endogenne ligandy. Podczas gdy komórki HEK293 produkujące FZD₆ w nadekspresji wykazywały wyższą podstawową fosforylację ERK1/2 w porównaniu z komórkami kontrolnymi, nadekspresji FZD₆ R416A^{6.32} towarzyszyła bardziej wyraźna fosforylacja ERK1/2. Ponadto, inkubacja komórek z C59 zmniejszała fosforylację ERK1/2 indukowaną zarówno przez nadekspresję FZD₆, jak i FZD₆ R416A^{6.32}. Niemniej jednak, konstytutywna aktywność FZD₆ R416A^{6.32} była wciąż bardziej wyraźna, tj. statystycznie istotna. Wyniki te sugerują, że mutacja w pozycji 6.32 nadaje wyższą konstytutywną aktywację receptora, inicjując odpowiedź komórkową.

Następnie przeanalizowaliśmy wpływ mutacji w pozycji 6.32 na sygnalizację przez fosfoproteinę DVL – centralny mediator sygnalizacji Wnt/FZD [44]. Mutacje w R^{6.32} FZD₆ negatywnie wpłynęły na aktywację DVL, która manifestuje się fosforylacją tego białka (analiza western blot). Ponadto skorzystaliśmy z niedawno opisanego fosfo-specyficznego przeciwciała wykrywającego C-końcówką, CK1-fosforylowaną serynę S648 w FZD₆ [45]. Podczas gdy FZD₆ ulega znacznej fosforylacji w obecności koekspresji CK1 ϵ i DVL2, przerwanie przełączania molekularnego u wszystkich trzech mutantów upośledza fosforylację S648. Ponadto, mutacja w K^{6.32} u FZD₄ prowadzi do braku Wnt-3a-zależnej aktywacji tego receptora w klasycznej ścieżce sygnałowej (badanie TOPFlash).

Aby lepiej zrozumieć mechanizm działania mutacji R/K^{6.32} obecnych w receptorach klasy F, wykorzystaliśmy sensory konformacyjne aktywacji GPCR – białka miniG (mG) [46]. Białka te dotychczas służyły do wykrycia konformacji stanu aktywnego GPCR w żywych komórkach i do stabilizacji aktywnych, oczyszczonych receptorów do badań krystalizacji i CryoEM, np. w publikacji [47]. Jak wspomniałem wcześniej, dziesięć FZD jest podzielonych na cztery powiązane ewolucyjnie klastry składające się z FZD_{1, 2, 7}, FZD_{3, 6}, FZD_{5, 8} i FZD_{4, 9, 10}. W celu zbadania wpływu mutacji na konformację receptorów, oceniliśmy ich interakcje z Venus-mG dla jednego

przedstawiciela każdego klastra homologii FZD i SMO za pomocą technologii BRET (receptory z tagiem *Rluc8* albo *Nluc* na końcu C). W oparciu o to, co wiadomo na temat selektywności interakcji FZD – G, skupiliśmy się na FZD₄-G₁₃, FZD₅-G_q, FZD₆-G_i, FZD₇-G_s i SMO-G_i [35, 38, 48-50]. Testy BRET przeprowadzono w tymczasowo transfekowanych komórkach HEK293 przy użyciu rekombinowanych, oczyszczonych Wnt-5a (FZD) i SAG (SMO) jako agonistów. Wykryliśmy wzrost aktywacji dla mutantów R/K^{6.32} klasy F, w tym mutantów SMO M2, w porównaniu z odpowiednimi receptorami typu dzikiego na podobnych poziomach ekspresji powierzchniowej. Eksperymenty te potwierdziły, że: **a) białka mG działają jako czujniki konformacyjne, wykrywając i wiążąc się z aktywną konformacją odpowiednich receptorów klasy F, b) mutacja R/K^{6.32} lub W^{7.55} zwiększa siłę działania agonistów poprzez zdolność do lepszego wiązania się z odpowiednimi białkami G, i c) naturalnie występujące mutanty nowotworowe w FZD i SMO (FZD₆ R416Q^{6.32}, SMO R455H^{6.32}, FZD₆ W493L^{7.55} oraz SMO W539L^{7.55}) zachowują się tak samo jak eksperymentalne mutanty R/K->A.**

Podsumowując, najważniejszym odkryciem naszych badań jest **identyfikacja konserwatywnej sieci interakcji w TM6-TM7, która służy jako przełącznik molekularny wymagany do pełnej aktywacji receptorów klasy F w ścieżkach zależnych od białka G.** Co znamienne, mutacja argininy 6.32 jest najczęstszą mutacją nowotworową spośród wszystkich mutacji dla receptorów klasy F. Taki mutant FZD nie jest zdolny do indukcji kanonicznej ścieżki Wnt/ β -katenina, a tylko do indukcji ścieżek zależnych od białek G. Odkrycia te niewątpliwie przyczynią się do lepszego zrozumienia mechanizmów aktywacji tych receptorów i wzrostu zainteresowania ich rolą nie tylko jako elementów szlaku kanonicznego.

Wkład habilitanta w powstanie pracy: koncepcja pracy i zaplanowanie badań, przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, przygotowanie rycin, opracowanie i analiza manuskryptu. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych i przeanalizowanych przez habilitanta przedstawione są na następujących rycinach omawianej publikacji: Fig. 2c-d, Fig. 3, Fig. 4b-c, Fig. 5g, Fig. S5, Fig. S6a-c, Fig. S7a, Fig. S8, Fig. S9b, Fig. S10,

Ad Publikacja 2:

Jednym ze sposobów projektowania leków dla FZD jest lepsze poznanie Smoothened (SMO), gdyż jak wykazała analiza w **Publikacji 1** – receptory te mają podobne motywy strukturalne odpowiadające za przekaźnictwo sygnałowe. SMO to receptor sprzężony z białkiem G (GPCR), który wraz z 10 paralogami Frizzled tworzy klasę F GPCR [12]. Aktywacja SMO ma ogromne znaczenie podczas rozwoju embrionalnego, a jakiegokolwiek błędy w przekaźnictwie przez SMO są przyczyną rozwoju różnych nowotworów, w tym raka podstawnokomórkowego [51]. Z tego powodu SMO stał się atrakcyjnym obiektem badań nad nowymi lekami.

W badaniach podstawowych oraz w początkowych etapach projektowania ligandów, w celu badania powinowactwa ligandu do SMO stosowane są: test wiązania radioligandów [52] oraz mikroskopia fluorescencyjna/konfokalna lub cytometria przepływowa z użyciem BODIPY-cyklopamina [53-56]. Metody te obciążone są jednak pewnymi wadami, wśród których wymienić należy: niebezpieczeństwo dla zdrowia i czas trwania eksperymentów w przypadku testu wiązania radioligandów oraz detekcja niespecyficznych interakcji w przypadku metod fluorescencyjnych. Aby przezwyciężyć te ograniczenia eksperymentalne oraz stworzyć metodę wysokoprzepustową, stworzyliśmy i zwalidowaliśmy test wiązania oparty na rezonansowym przenoszeniu energii nanolucyferazy (NanoBRET) przy użyciu żywych komórek, w celu oceny powinowactwa BODIPY-cyklopaminy i nieznakowanych ligandów SMO z receptorem SMO znakowanym nanolucyferazą (Nluc) na końcu N aminokwasowym. W badaniach użyliśmy mysiego SMO z domeną CRD (Nluc-SMO) i SMO bez CRD (Δ CRD Nluc-SMO). Badania były prowadzone na komórkach HEK293A pozbawionych endogennego SMO (Δ SMO HEK293A), celem uniknięcia potencjalnego wiązania się egzogennych ligandów z endogennymi receptorami.

Aby opracować test wiązania oparty na NanoBRET dla SMO receptora klasy F, przyjęliśmy strategię klonowania receptora znakowanego Nluc przedstawioną wcześniej dla GPCR klasy A [57]. Jak wspomniałem wcześniej, znakowana fluorescencyjnym BODIPY pochodna roślinnego alkaloidu cyklopaminy (BODIPY-cyklopamina) została użyta jako ligand. Na początku zbadaliśmy powinowactwo BODIPY-cyklopaminy do SMO po 60 minutach inkubacji w teście wiązania nasycającego (ang. *saturation binding*). Wyniki wskazały, że ligand ten wiąże się

z Nluc-SMO w sposób zależny od stężenia, osiągając nasycenie przy ~ 1000 nM (*one-site binding model*, $pK_d = 6,8 \pm 0,1$), co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi [58]. Podobnie, BODIPY-cyklopamina wiąże się z Δ CRD SMO (*two-site binding model*, $pK_{d1} = 8,4 \pm 0,2$) z większym powinowactwem niż do Nluc-SMO o pełnej długości. Ponadto sygnał NanoBRET kompleksu BODIPY-cyklopamina- Δ CRD Nluc-SMO był większy niż dla kompleksu BODIPY-cyklopamina-Nluc-SMO (*two-site binding model*, Δ BRET B_{max1} dla Δ CRD = 0,080, 95% CI [0,07–0,09] i *one-site fit* dla receptora o pełnej długości Δ BRET $B_{max} = 0,034$, 95% CI [0,031–0,036]). Ponadto wiązanie BODIPY-cyklopaminy z Δ CRD Nluc-SMO było bardziej złożone niż wiązanie z Nluc-SMO, na co wskazuje dwufazowa krzywa wiązania dla Δ CRD Nluc-SMO, zwłaszcza przy wyższych stężeniach liganda (*two-site fit*, $pK_{d2} = 6,8 \pm 0,7$ i Δ BRET $B_{max2} = 0,033$, 95% CI [0,021–0,045]). Wyniki dla Δ CRD Nluc-SMO sugerowały istnienie dwóch miejsc wiązania dla BODIPY-cyklopaminy w międzybłonowym rdzeniu receptora. Co ważne, z uwagi na wyższe powinowactwo ligandu do receptora bez domeny CRD, wyniki sugerują, że ta domena jest negatywnym allosterycznym modulatorem dla wiązania tego ligandu z SMO.

Następnie badaliśmy kinetykę asocjacji ligand – receptor. Analizę przeprowadziliśmy, stosując różne stężenia BODIPY-cyklopaminy dla dwóch wersji receptora. Analiza kinetyczna pozwoliła na stwierdzenie, że powinowactwo BODIPY-cyklopaminy do Δ CRD Nluc-SMO było większe, a sygnał BRET był wyższy w porównaniu z Nluc-SMO. Kinetyczne wartości K_d (105 ± 25 i 23 ± 16 nM odpowiednio dla receptora o pełnej długości i Δ CRD) były zbliżone do wartości uzyskanych z eksperymentów wiązania nasycającego.

Porównując wzrost NanoBRET między BODIPY-cyklopaminą i Nluc-SMO (lub Δ CRD Nluc-SMO) ze wzrostem sygnału fluorescencji pochodzącego z BODIPY-cyklopaminy, potwierdziliśmy, że NanoBRET może wykryć specyficzne i nasycalne wiązanie dla niższych stężeń ligandu (zwłaszcza dla Δ CRD Nluc-SMO).

Co ważniejsze, sygnał NanoBRET nasycy się przy stężeniach ligandów, dla których wzrost fluorescencji wciąż ma charakter liniowy szczególnie w przypadku Δ CRD Nluc-SMO). Świadczy to o wyższości detekcji za pomocą techniki NanoBRET nad techniką fluorescencyjną.

Następnie badaliśmy nieznakowane, dostępne komercyjnie ligandy SMO: agoniści (purmorfamina i SAG1.3), antagoniści (SANT-1) i odwrotny agonista

(cyklopamina-KAAD). Analiza siły ich powinowactwa została zmierzona konkurencją z BODIPY-cyklopaminą, wykorzystując zarówno pełnej długości Nluc-SMO (współzawodnictwo z 200 nM BODIPY-cyklopaminą), jak i Δ CRD Nluc-SMO (konkurencja z 10 nM BODIPY-cyklopaminą). Podczas gdy cyklopamina-KAAD i SANT-1 wykazywały najwyższe powinowactwo do Nluc-SMO, agonista SAG1.3 był pośredni, a purmorfamina wykazywała najniższe powinowactwo. Podobną kolejność uzyskaliśmy w komórkach transfekowanych Δ CRD Nluc-SMO. Celowana terapia za pomocą antagonisty vismodegibu w terapii raka podstawnokomórkowego doprowadziła również do odkrycia opornych na terapię mutacji punktowych w SMO [59]. Te mutacje punktowe: D477G^{6.54}/E522K^{7.38}, wprowadziliśmy do Nluc-SMO i Δ CRD Nluc-SMO (homologiczne aminokwasy w ludzkim SMO to D473^{6.54} i E518^{7.38}) i zbadaliśmy powinowactwo BODIPY-cyklopamina. Ponadto, aby dokładniej zdefiniować charakterystykę wiązania w dwóch oddzielnych miejscach wiązania BODIPY-cyklopaminy w rdzeniu receptora, wykorzystaliśmy nasycające stężenie antagonisty SANT-1 (10 μ M) i porównaliśmy wiązanie BODIPY-cyklopaminy z typem dzikim oraz z podwójnym mutantem, zarówno dla Nluc-SMO, jak i Δ CRD Nluc-SMO. Zgodnie z danymi dotyczącymi konkurencji przy użyciu stałego stężenia BODIPY-cyklopaminy, stwierdziliśmy, że SANT-1, który wiąże się wyłącznie z dolnym miejscem wiązania w międzybłonowym rdzeniu SMO [60], zmniejsza maksymalne wiązanie BODIPY-cyklopaminy w Nluc-SMO o jedną trzecią z zachowaniem podobnego powinowactwa. Jednak w przypadku Δ CRD Nluc-SMO, SANT-1 w praktyce blokuje wiązanie BODIPY-cyklopaminy z receptorem do stężenia 100 nM BODIPY-cyklopaminy. Stężenia 100 nM i wyższe były niewrażliwe na SANT-1 (Δ CRD Nluc-SMO). Niemniej jednak, niewrażliwa na SANT-1 frakcja BODIPY-cyklopaminy wykazuje obniżone B_{max} i mniejsze powinowactwo. W przypadku analizy mutacji, podwójny mutant Nluc-SMO nie wpływał na maksymalne wiązanie BODIPY-cyklopaminy, ale około czterokrotnie zmniejszał jej powinowactwo do receptora (*one-site fit* $B_{max} = 0,035$, 95% CI [0,032–0,039], $P = 0,8193$; $pK_d = 6,2 \pm 0,1$; $P < 0,0001$). Z kolei dla Δ CRD Nluc-SMO D477G^{6.54}/E522K^{7.38} wiązanie BODIPY-cyklopaminy przebiegało w zgodzie z *one-site fit*, w przeciwieństwie do receptora typu dzikiego. Co więcej, zarówno powinowactwo ($pK_d = 6,3 \pm 0,1$), jak i maksymalne wiązanie (*one-site fit* $B_{max} = 0,074$, 95% CI [0,071–0,077], $p < 0,0001$) zmniejszyły się znacząco. W przypadku Nluc-SMO, krzywe: konkurencyjna z SANT-1 (10 μ M), jak i krzywa bez

antagonisty, są prawie identyczne w przypadku podwójnego mutantu. Z kolei dla Δ CRD Nluc-SMO D477G^{6.54}/E522K^{7.38}, SANT-1 obniża zarówno powinowactwo, jak i maksymalne wiązanie BODIPY-cyklopaminy. Zgodnie z trybem wiązania SANT-1, podwójny mutant w górnym miejscu wiązania nie wpływa na niewrażliwą na SANT-1 frakcję wiązania BODIPY-cyklopaminy w Δ CRD Nluc-SMO. Nasz model wiązania 2-miejscowego poparliśmy analizą *in silico*.

Podsumowując, przeanalizowaliśmy interakcje BODIPY-cyklopamina z dwoma allosterycznie połączonymi miejscami wiązania na rdzeniu SMO 7TM o różnych powinowactwach. Nasza hipoteza zakładała, że miejscem o wysokim powinowactwie do BODIPY-cyklopaminy dla SMO jest niższa kieszeń wiążąca SANT-1 (dolne miejsce wiązania w rdzeniu). Ponieważ mutacje D477G^{6.54}/E522K^{7.38} w TM6 i TM7 częściowo wpływają na składnik o wysokim powinowactwie wiązania BODIPY-cyklopaminy do SMO, może to oznaczać, że interakcja z D477^{6.54}/E522^{7.38} zapewnia mechanizm przejścia ligandu do głębszej kieszeni (miejsce o wysokim powinowactwie). Wiązanie z niskim powinowactwem do mutantu D477G^{6.54}/E522K^{7.38} w górnym miejscu TM (miejsce o niskim powinowactwie) jest nadal możliwe i wiązanie to jest niewrażliwe na allosteryczną modulację przez wiązanie SANT-1 z głębszym miejscem (miejsce o wysokim powinowactwie).

Podsumowując, w publikacji **z sukcesem zastosowaliśmy technologię NanoBRET do badania interakcji ligand-receptor w klasie F**. Najważniejszymi odkryciami naszych badań są: **a) identyfikacja dwóch miejsc wiążących dla BODIPY-cyklopaminy w rdzeniu SMO, b) konkluzja, że CRD może pełnić rolę negatywnego allosterycznego modulatora dla wiązania ligandów z miejscem wiązania w rdzeniu SMO**. Nasze wyniki już przyczyniły się do rozwoju badań nad **projektowaniem nowych ligandów dla SMO** [współpraca grupy Prof. Gunnara Schulte z grupami chemików projektującymi leki].

Wkład habilitanta w powstanie pracy: koncepcja pracy i zaplanowanie badań, przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, przygotowanie rycin, opracowanie i analiza manuskryptu, finansowanie badań. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych i przeanalizowanych przez habilitanta znajdują się na następujących rycinach publikacji oraz odpowiadających im tabelach: Fig. 1B-C, Fig. 2B-E, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5B-C, Fig. 6, Fig. S4

Ad Publikacja 3:

Pomimo dostępności kilku niskocząsteczkowych ligandów, które oddziałują ze SMO jako: agoniści (SAG1.3, SAG1.5 i purmorfamina), odwrotni agoniści (cyklopamina-KAAD) i neutralni antagoniści (wismodegib i SANT-1; oraz patrz: **Publikacja 2**), dotychczas nieodkryto żadnych specyficznych ligandów dla FZD. Biorąc pod uwagę rolę tych receptorów w patofizjologii, FZD mają duży potencjał terapeutyczny [61, 62]. Niemniej jednak, analiza struktury receptora FZD₄ bez związanego ligandu sugerowała, że międzybłonowy rdzeń receptorów FZD jest zbyt hydrofilowy i dlatego niekorzystny dla małych ligandów [18]. Jednak wcześniej ukazała się jedna publikacja, w której autorzy scharakteryzowali potencjalne ligandy dla FZD₇ [63]. Ideą w naszej publikacji było to, że ligandy SMO mogą działać na FZD₆ z uwagi na homologię sekwencji między SMO i FZD₆. W pracy tej pokazaliśmy, że małowcząsteczkowy agonista SMO – SAG1.3 celuje w transbłonowy rdzeń FZD₆ jako częściowy agonista z ograniczoną selektywnością.

Analiza filogenetyczna receptorów klasy F i dopasowanie sekwencji ludzkich SMO, FZD₆ i FZD₄ wskazują na znaczną homologię między tymi receptorami. Jednak FZD₆ wykazuje wyższy stopień podobieństwa swojej sekwencji do SMO niż w przypadku FZD₄ w regionach odpowiadających miejscu wiązania w rdzeniu transbłonowym. Za pomocą modelowania molekularnego i dynamiki molekularnej, przewidzieliśmy, że najbardziej prawdopodobna konformacja SAG1.3 w miejscu wiązania jest zbliżona w FZD₆ i SMO. Sugeruje to, że FZD₆ ma miejsce wiązania dla SAG1.3 w transbłonowym rdzeniu receptora między TM5, TM6, TM7 i zewnątrzkomórkową pętlą 2 (ECL2). Porównując ten obszar wiązania ze strukturą FZD₄, widać, że zewnątrzkomórkowa część TM6 oraz ECL3 w FZD₄ blokują potencjalne miejsce wiązania w tym receptorze, tj. jego pojemność jest za mała, aby SAG1.3 mógł się tam zadokować. W kompleksie z FZD₆, SAG1.3 oddziaływał najbardziej stabilnie z E438^{6.54} w trakcie 1 μ s symulacji.

W celu analizy powinowactwa, w badaniach *in vitro* posłużyliśmy się metodą NanoBRET przedstawioną w **Publikacji 2**. Biorąc pod uwagę podobieństwa SMO i FZD₆ w kieszeni wiążącej ligand, użyliśmy BODIPY-cyklopaminy jako ligandu dla FZD₆. Ponadto, aby wykluczyć jakikolwiek wpływ endogennych SMO, użyliśmy linii Δ SMO HEK293. Wiązanie BODIPY-cyklopaminy do Nluc-FZD₆ przebiegało zgodnie

z jednomiejscową krzywą ($pK_d \pm s.d. = 6,3 \pm 0,1$). Dodatkowo, sygnał NanoBRET był zależny od poziomów ekspresji dawcy energii (Nluc) i stosunku akceptor energii (BODIPY): donor (Nluc) i nie był wprost proporcjonalny do poziomów akceptora, co przemawiało za specyficznością wiązania BODIPY-cyklopaminy do Nluc-FZD₆. W teście konkurencji SAG1.3 redukowało wiązanie BODIPY-cyklopaminy (300 nM) z Nluc-FZD₆ w sposób zależny od stężenia ($pK_i \pm s.d. = 5,6 \pm 0,1$).

Następnie, w celu uzyskania funkcjonalnej miary interakcji SAG1.3 – FZD₆, zaprojektowaliśmy wewnątrzcząsteczkową sondę FRET (receptor znakowany FIAsH w pętli ICL3 oraz TFP na końcu C) do badania zmian konformacyjnych receptora po wiązaniu liganda. Stymulacja komórek HEK293 przejściowo transfekowanych FZD₆-FRET za pomocą SAG1.3 spowodowała sigmoidalne, zależne od stężenia zmniejszenie sygnału FRET o 1,7% w stosunku do podstawowego sygnału z $pEC_{50} \pm s.d. (M) = 6,5 \pm 0,9$.

Ponadto, w celu dalszej analizy sposobu działania SAG1.3 na FZD₆, ponownie wykorzystaliśmy białka mini G (mG) znakowane Venus – patrz: **Publikacja 1**. Co ciekawe, SAG1.3 indukował krzywą dzwonową – w zgodzie z tym, co było wcześniej publikowane dla aktywacji SMO przez SAG w różnych testach, np. [39, 41]. Wyniki uzyskane przy użyciu komórek HEK293, jak i Δ SMO HEK293 były tożsame, co potwierdziło, że mierzony sygnał pochodził od interakcji Venus-mG z rekombinowanym FZD₆. W celu dalszego sprawdzenia, czy SAG1.3 działa jako funkcjonalny agonista FZD₆, zdolny do inicjowania dalszego przekazywania sygnałów w sposób zależny od białka G, wykorzystaliśmy heterotrimeryczne białka G znakowane NanoBiTs [64]. Podobnie jak w teście rekrutacji białka mGsi, SAG1.3 wiążąc się z SNAP-FZD₆, wywołał dzwonową (ang. *bell-shaped*) odpowiedź.

Ponadto przeanalizowaliśmy wpływ SAG1.3 na interakcję FZD₆ – DVL2. Za pomocą dwóch różnych konfiguracji eksperymentalnych w technice BRET, oceniliśmy rekrutację DVL2 do FZD₆. Po pierwsze, zmierzaliśmy rekrutację Nluc-DVL2 do błony komórkowej komórek wydzielających SNAP-FZD₆ i Venus-KRas. Po drugie, zmierzaliśmy BRET pomiędzy FZD₆-Venus i Nluc-DVL2. W obu konfiguracjach SAG1.3 wywołał zmiany BRET FZD₆ – DVL2, jednak z mniejszą siłą niż miało to miejsce w przypadku interakcji FZD₆-białko G (testy z mG oraz NanoBiTs).

Nasza analiza za pomocą dynamiki molekularnej wykazała, że aminokwasy D351, E438^{6,54}, K479^{7,41} i R442^{6,58} są najważniejszymi aminokwasami polarnymi.

W badaniach *in vitro* przeanalizowaliśmy mutacje tych aminokwasów. Odpowiedzi mutantów E438D^{6.54} i R442K^{6.58} wywołane SAG1.3 wykazały niższą maksymalną odpowiedź i siłę w porównaniu z receptorem typu dzikiego. W teście wiązania, skoncentrowaliśmy się na FZD₆ R442^{6.58} i jego mutacji alaninowej, porównując powinowactwo BODIPY-cyklopaminy do FZD₆ i FZD₆ R442A^{6.58} w obecności i nieobecności 10 μM SAG1.3. Dodanie SAG1.3 spowodowało redukcję powinowactwa BODIPY-cyklopaminy tylko dla receptora typu dzikiego. Sugerowało to, że R442^{6.58} – zgodnie z przewidywaniami *in silico* – jest kluczowym aminokwasem w miejscu wiązania SAG1.3.

Opublikowane dane wskazują, że jest możliwe projektowanie niskocząsteczkowych ligandów dla FZD. **Najważniejszym odkryciem naszych badań jest udowodnienie, że mogą istnieć niskocząsteczkowe ligandy dla FZD.** Nasze odkrycie otwiera drzwi do **opracowania ukierunkowanych na FZD małych cząsteczek oddziałujących z receptorem w miejscu wiązania w rdzeniu transbłonowym**, podobnie jak dla GPCR klasy A i SMO.

Wkład habilitanta w powstanie pracy: koncepcja pracy i zaplanowanie badań, przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, przygotowanie rycin, opracowanie i analiza manuskryptu, finansowanie badań. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych i przeanalizowanych przez habilitanta znajdują się na następujących rycinach publikacji: Fig. 1c-e, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 bez 6i, Fig. S2, Fig. S3 a-c, f, Fig. S5a-b, Fig. S6a-c, e-i, Fig. S9c-d, Fig. S10 a, c-f, Fig. S12, Fig. S13a, Fig. S14, Fig. S15, Fig. S16, Fig. S18, Fig. S19b-c, Fig. S20c-e, Fig. S21.

Ad Publikacja 4:

W następnej pracy podjęliśmy kluczowy temat: analizę wiązania endogennego ligand-FZD. Do tej pory poznano i zrozumiano wiele złożonych procesów, w których zaangażowane są białka Wnt (ligandy dla FZD). Jednak sposób wiązania, kinetyka i selektywność dziesięciu WNT do ich receptorów – FZD – pozostawały niejasne. Próby zbadania interakcji Wnt-FZD są utrudnione przez liczne niedogodności występujące podczas pracy z białkami Wnt, ich niestabilność i oporność na znakowanie epitopami. W tej publikacji udało nam się uzyskać i użyć znakowanego fluorescencyjnie eGFP na końcu N mysiego białka Wnt-3a do badania interakcji Wnt-FZD. Nasz konstrukt jest podobny do Flag-GFP-Wnt-3a użytego w [65], jednak bez tagu FLAG.

W celu sprawdzenia, czy nasze rekombinowane białko eGFP-Wnt-3a jest funkcjonalne, przetestowaliśmy jego własności i aktywność z wykorzystaniem kilku testów. Białko eGFP-Wnt-3a zachowało w teście TOPFlash w komórkach NCI-H1703 aktywność porównywalną z Wnt-3a typu dzikiego.

Białka Wnt są acylowane w retikulum endoplazmatycznym (ER) przez porkupinę, a specyficzny dla Wnt chaperon EVI/Wntless pośredniczy w ich dalszym wydzielaniu jako lipidowane białka. Zgodnie z tym, nasze białko eGFP-Wnt-3a nie jest wydzielane w zmutowanych komórkach HEK293 bez EVI (Δ EVI HEK293).

Żeby ocenić względne oddziaływanie eGFP-Wnt-3a z FZD na żywych komórkach, wygenerowaliśmy stabilne linie komórkowe NCI-H1703 produkujące umiarkowane poziomy mysich FZD₁₋₁₀ (poza FZD₃) z tagiem mCherry na końcu C. Dodatkowo użyliśmy również przejściowo-transfekowanych komórek Δ FZD1-10 HEK293, celem wyeliminowania wpływu asocjacji eGFP-Wnt-3a z endogennymi receptorami. Nasze wyniki wskazały na powiązanie ligandu ze wszystkimi testowanymi FZD poza FZD₆, FZD₈ i FZD₉.

Aby dokładniej określić ilościowo wiązanie eGFP-Wnt-3a z FZD, ponownie zastosowaliśmy przedstawiony w **Publikacji 2** test NanoBRET. Skoncentrowaliśmy się na FZD₄, ponieważ: a) w teście asocjacji ten receptor wykazywał dobrą asocjację z eGFP-Wnt-3a, b) jest to dobrze opisany receptor Wnt-3a aktywujący ścieżkę Wnt/ β -kateniny [66], i c) ma dobrą ekspresję na powierzchni komórki. Użyliśmy rekombinowanego receptora Nluc-FZD₄ w przejściowej nadekspresji w komórkach

Δ FZD₁₋₁₀ HEK293. Do testów wiązania NanoBRET zastosowano dwa różne preparaty eGFP-Wnt-3a: jeden z przejściowo transfekowanych komórek zawiesinowych HEK293F w pożywce bez surowicy, z lub bez koekspresowanej afaminy, i jeden ze stabilnej linii komórek L w normalnej pożywce zawierającej surowicę. eGFP-Wnt-3a pochodzący z komórek zawiesinowych HEK293F związał się stosunkowo szybko ($k_{on} = 2,69 * 10^6 M^{-1} * min^{-1}$ dla + afaminy, $4,34 * 10^6 M^{-1} * min^{-1}$ dla - afaminy) z Nluc-FZD₄ i osiągnął nasycenie po około 100 minutach. Te testy kinetyczne dały wartości kinetycznego K_d 3,41 nM i 1,79 nM odpowiednio dla preparatów + afamina i - afamina. Natomiast wiązanie eGFP-Wnt-3a pochodzącego z komórek L z receptorem nie osiągnęło nasycenia nawet po 3 godzinach inkubacji, co utrudniło obliczenie powinowactwa wiązania z tych eksperymentów kinetycznych. W celu dokładniejszego określenia powinowactwa wiązania Wnt-3a do FZD₄, inkubowaliśmy komórki z nadekspresją Nluc-FZD₄ ze wzrastającymi stężeniami eGFP-Wnt-3a pochodzącego z komórek HEK293F lub komórek L przez 2 godziny. Stosunek BRET reprezentujący wiązanie eGFP-Wnt-3a do Nluc-FZD₄ wzrastał w sposób zależny od stężenia i osiągnął saturację. Dla eGFP-Wnt-3a pochodzącego z HEK293F wartości powinowactwa obliczono następująco: $pK_d = 8,43 \pm 0,06$ (3,68 nM) dla + afaminy oraz $pK_d = 8,64 \pm 0,02$ (2,31 nM) dla - afamina. Podobnie jak w eksperymentach kinetycznych, wiązanie eGFP-Wnt-3a pochodzące z komórek L nie osiągnęło nasycenia po 2 godzinach inkubacji, więc powinowactwo można było tylko oszacować ($pK_d = 8,48 \pm 0,05$; 3,32 nM).

Najważniejszym odkryciem naszych badań jest uzyskanie wartości liczbowych charakteryzujących wiązanie Wnt-FZD, co nie zostało nigdy wcześniej pokazane dla receptorów o pełnej długości w komórkach żywych. Nasze badania pokazują, że otrzymanie fluorescencyjnych białek Wnt-3a, które zachowują właściwości natywnych Wnt-3a, stanowi ważny krok w celu zrozumienia oddziaływania ligand-receptor.

Wkład habilitanta w powstanie pracy: koncepcja pracy i zaplanowanie badań, przeprowadzenie eksperymentów, analiza i interpretacja danych, przygotowanie rycin, opracowanie i analiza manuskryptu, finansowanie badań. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych i przeanalizowanych przez habilitanta znajdują się na następujących rycinach publikacji: Fig. 5, Fig. S4b-f.

Ad Publikacja 5 i 6:

Obie publikacje to prace przeglądowe. W **publikacji 5** skupiliśmy się na mechanizmach aktywacji receptorów klasy F przez ligandy. W pracy omówione zostały koncepcje aktywacji receptorów z klasy A GPCR oraz ogólna charakterystyka receptorów klasy F i proponowane koncepcje ich aktywacji (np. signalosom). Ponadto, skupiliśmy się na krytycznej ocenie dostępnych struktur receptorów klasy F, ze szczególnym uwzględnieniem struktur z [42], oraz oceniliśmy potencjalny wpływ cholesterolu i jego pochodnych na aktywację SMO. **Wydaje się, że kolejne odkrycia naukowe w ramach badania receptorów klasy F odbędą się raczej z udziałem metod biofizycznych (FRET czy BRET) niż biochemicznych.**

Z kolei w **publikacji 6** zainspirowani najnowszymi spostrzeżeniami na temat mechanizmów aktywacji receptorów klasy F z analizy strukturalnej i funkcjonalnej Frizzled i Smoothened, dążyliśmy do podsumowania tego, co wiemy o molekularnych szczegółach wiązania ligandów, zmianach konformacyjnych powodowanych przez agonistów oraz aktywacji receptorów klasy F. Lepsze zrozumienie mechanizmów aktywacji receptorów pozwoli nam zaangażować się w odkrywanie nowych, które mogą być selektywne względem izoform i potencjalnie selektywne dla szlaków sygnałowych. W pracy skupiliśmy się na ogólnym opisie ligandów dla FZD i SMO, oraz mechanizmów przekaźnictwa Wnt i Hedgehog. Następnie omówiliśmy i przedstawiliśmy nasze hipotezy odnośnie interakcji ligand-receptor zarówno dla FZD, jak i SMO. Dalej **skupiliśmy się na analizie dostępnych wtedy od niedawna aktywnych struktur SMO. Wreszcie przedstawiliśmy, jakie aminokwasy w FZD są kluczowe za aktywację receptorów w jednej ścieżce sygnałowej, a nie innej (R/K^{6.32} czy Y^{2.39} dla FZD₄).**

Wkład habilitanta w powstanie obu prac przeglądowych: koncepcja pracy, przygotowanie rycin, opracowanie i analiza manuskryptów.

4.4. Podsumowanie

Nasze badania wykazały, że:

1. FZD zachowują się jak klasyczne GPCR, posiadające ważne motywy strukturalne determinujące ich aktywność.
2. Metody analizy powinowactwa ligand-receptor, znane z badań klasycznych GPCR, mogą być z powodzeniem użyte w badaniach receptorów klasy F.
3. FZD posiadają transbłonowe miejsce wiązania dla ligandów niskocząsteczkowych.
4. Opracowane przez nas techniki badania małych ligandów mają zastosowanie do badania interakcji Wnt-FZD i dzięki nim możliwe jest uzyskanie wartości liczbowych opisujących te interakcje.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną, realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

5.1. Wykaz prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora

1. **Kozielowicz, P.**, Grafton, G., Kutner, A., Curnow, S.J., Gordon, J., Barnes, N.M.
Novel vitamin D analogues; cytotoxic and anti-proliferative activity against a diffuse large B-cell lymphoma cell line and B-cells from healthy donors,
(2016) Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 164, pp. 98-105, IF2016 = 4,561; MNiSW = 30
2. Sajkowska-Kozielowicz, J.J., **Kozielowicz, P.**, Barnes, N.M., Wawer, I., Paradowska, K.,
Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Activities and Total Polyphenol Contents of the Extracts of Geissospermum reticulatum Bark,
(2016) Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, art. no. 2573580, IF2016 = 4,593; MNiSW = 30
3. Tzeli, D., **Kozielowicz, P.**, Zervou, M., Potamitis, C., Kokkotou, K., Rak, B., Petrou, A., Tsolaki, E., Gavalas, A., Geronikaki, A., Petsalakis, I.D., Tsoungas, P.G.,

2, 2'-Dihydroxybenzophenones and Derivatives. Efficient Synthesis and Structure Endoscopy by DFT and NMR. Credentials as Potent Antiinflammatory Agents,

(2016) ChemistrySelect, 1 (10), pp. 2426-2438

4. Tzeli, D., Tsoungas, P.G., Petsalakis, I.D., **Kozieliwicz, P.**, Zloh, M.,

Intramolecular cyclization of β -nitroso-o-quinone methides. A theoretical endoscopy of a potentially useful innate 'reclusive' reaction,

(2015) Tetrahedron, 71 (2), pp. 359-369, IF2015 = 2,645; MNiSW = 30

5. **Kozieliwicz, P.**, Tzeli, D., Tsoungas, P.G., Zloh, M.,

Arene-fused 1,2-oxazole N-oxides and derivatives. the impact of the N-O dipole and substitution on their aromatic character and reactivity profile. Can it be a useful structure in synthesis? A theoretical insight,

(2014) Structural Chemistry, 25 (6), pp. 1837-1846, IF2014 = 1,837; MNiSW = 15

6. **Kozieliwicz, P.**, Tsoungas, P.G., Tzeli, D., Petsalakis, I.D., Zloh, M.,

β -Nitroso-o-quinone methides: Potent intermediates in organic chemistry and biology. the impact of the NO group on their structure and reactivity profile: A theoretical insight,

(2014) Structural Chemistry, 25 (6), pp. 1711-1723. IF2014 = 1,837; MNiSW = 15

7. **Kozieliwicz, P.**, Paradowska, K., Erić, S., Wawer, I., Zloh, M.,

*Insights into mechanism of anticancer activity of pentacyclic oxindole alkaloids of *Uncaria tomentosa* by means of a computational reverse virtual screening and molecular docking approach,*

(2014) Monatshefte für Chemie, 145 (7), pp. 1201-1211, IF2014 = 1,222; MNiSW = 25

Doniesienia konferencyjne:

8. Sajkowska-Kozieliwicz, J.J., **Kozieliwicz, P.**, Makarova, K., Wawer, I., Paradowska, K.,

Analysis of impact of cytotoxic and antioxidant activities of the Jerusalem Balsams using chemometric methods

(2016) Planta Medica 82(S 01), pp. S1 – S381, IF2016 = 2,342; MNiSW = 25

9. Sajkowska-Kozieliwicz, J.J., **Kozieliwicz, P.**, Barnes, N.M., Wawer, I., Paradowska, K.,

Cytotoxic, anti-radical and reducing properties of ethanol bark extracts of Geissospermum reticulatum,

(2016) *Planta Medica* 82(S 01), pp. S1 – S381, IF2016 = 2,342; MNiSW = 25

5.2. Wykaz prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora (wykaz nie obejmuje prac przedstawionych w punkcie 4.2.)

1. Sajkowska-Kozielowicz, J.J., **Kozielowicz, P.**, Makarova, K., Stocki, M., Barnes, N.M., Paradowska, K.,

Geissospermiculatine, a New Alkaloid from Geissospermum reticulatum Bark,

(2021) *Molecules* 26(1), 143, IF2019 = 3,267, MNiSW = 100

2. Kuzniewska, B., Cysewski, D., Wasilewski, M., Sakowska, P., Milek, J., Kulinski, T.M., Winiarski, M., **Kozielowicz, P.**, Knapska, E., Dadlez, M., Chacinska, A., Dziembowski, A., Dziembowska, M.,

Mitochondrial protein biogenesis in the synapse is supported by local translation,

(2020) *EMBO reports* 21: e48882, <https://doi.org/10.15252/embr.201948882>, IF2019 = 7,497; MNiSW = 140

3. Alexander, S.P.H., Christopoulos, A., Davenport, A.P, Kelly, E., Mathie, A., Veale, E.L., Armstrong, J.F., Faccenda, E., Harding, S.D., Pawson, A.J., Sharman, J.L., Southan, C., Davies, J.A.; CGPT Collaborators (including **Kozielowicz, P.**),

THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors,(2019) *British Journal of Pharmacology*, 176 (Suppl 1), pp. 21-141, IF2019 = 7,730; MNiSW = 140

4. **Kozielowicz, P.**,

Comment on: Triazoles bind the C-terminal domain of SMO: Illustration by docking and molecular dynamics simulations the binding between SMO and triazoles,

(2019) *Life Sciences*, 225, pp. 132, IF2019 = 3,647; MNiSW = 70

5. **Kozielowicz, P.**, Grafton, G., Sajkowska-Kozielowicz, J.J., Barnes, N.M.,

Overexpression of Orphan Receptor GPR61 Increases cAMP Levels upon Forskolin Stimulation in HEK293 Cells: in vitro and in silico Validation of 5-(Nonyloxy)Tryptamine as a Low-Affinity Inverse Agonist,

- (2019) *Pharmacology*, 104 (5-6), pp. 377-382, IF2019 = 1,625; MNiSW = 40
6. Tzeli, D., **Kozielowicz, P.**, Zloh, M., Antonow, D., Tsoungas, P.G., Petsalakis, I., *Naphthalene Peri-Annulated N,N- and N,O-Heterocycles: The Effect of Heteroatom-guided perifusion on their Structure and Reactivity Profiles. A Theoretical Endoscopy*, (2018) *ChemistrySelect*, 3 (33), pp. 9743-9752, IF2018 = 1,716;
7. **Kozielowicz, P.**, Alomar, H., Yusof, S., Grafton, G., Cooper, A.J., Curnow, S.J., Ironside, J.W., Pall, H., Barnes, N.M., *N-glycosylation and expression in human tissues of the orphan GPR61 receptor*, (2017) *FEBS Open Bio*, 7 (12), pp. 1982-1993, IF2017 = 1,782; MNiSW = 20
8. Tzeli, D., Tsoungas, P.G., Petsalakis, I.D., **Kozielowicz, P.**, *Intramolecular single H bonding vs bifurcation in tuning the conformation of 2,2'-dihydroxybenzophenone and its derivatives: a DFT insight*, (2017) *Structural Chemistry*, 28 (4), pp. 925-943, IF2017 = 2,019; MNiSW = 25

5.3. Publikacje w czasopismach lub w monografiach nieposiadających współczynnika Impact Factor:

1. Kwas, K., Mostowy, M., **Kozielowicz, P.**, Sajkowska-Kozielowicz, J.J., *Przegląd leków aktualnie stosowanych w chorobie zwyrodnieniowej stawów*, *Farmacja Polska*, Tom 76, nr 10, 2020; MNiSW = 20
2. **Kozielowicz, P.**, Owczarek K., Sajkowska-Kozielowicz, J.J., *Receptory Klasy F GPCR – aktywacja i farmakologia*, *Farmacja Polska*, Tom 75, nr 8, 2019; MNiSW = 20
3. Sajkowska, J.J., **Kozielowicz, P.**, Paradowska K., *Aktualny stan wiedzy dotyczący witaminy D i jej niedoborów, Wybrane substancje: znaczenie dla organizmu oraz możliwe zastosowania*, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, (2015), pp. 7-26 ISBN 978-83-65272-02-7
4. Sajkowska-Kozielowicz, J.J., Gulik, K., **Kozielowicz, P.**, Makarova, K., Paradowska, K., Wawer, I.,

Nowoczesne metody badania związków biologicznie czynnych w preparatach pochodzenia roślinnego;

monografia Materiały naukowe z II Międzynarodowej Konferencji „Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna” Krosno, 6-7 maja (2015), pp. 377-402

5. Sajkowska, J. and **Kozielowicz, P.**,

Personalized Care: Impact of Vitamin D Polymorphic Variants on Body Parameter,

Phuture 2013 Edition

6. **Kozielowicz, P.**,

Suplementy diety w osteoartrozie,

Lek w Polsce, czerwiec 2011; MNiSW = 3

7. **Kozielowicz, P.**,

Leki cyjankowe,

Gazeta Farmaceutyczna, wrzesień 2011

8. **Kozielowicz, P.**,

Ślina łagodzi ból,

Gazeta Farmaceutyczna, grudzień 2011

5.4. Informacje naukometryczne

Tabela 1. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego na dzień 27 stycznia 2021 roku.

	Przed doktoratem		Po doktoracie	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW
Prace oryginalne	16,695	145	50,050	965
Prace przeglądowe	-	-	14,045	350
Listy do redakcji	-	-	3,647	70
Recenzowane materiały z konferencji	4,684	50	-	-
Prace przeglądowe w czasopismach bez IF	-	3	-	40
Razem	21,379	198	67,742	1425

Mój dorobek naukowy na dzień 27 stycznia 2021 roku obejmuje:

- **17 prac oryginalnych pełnotekstowych**, w tym 17 w czasopismach posiadających IF (w 6 jestem pierwszym autorem, w 4 jestem pierwszym i korespondującym autorem),
- 3 prace przeglądowe w czasopismach posiadających IF,
- 1 list do redakcji w czasopiśmie z IF,
- 2 recenzowane materiały z konferencji,
- **Impact Factor: 89,121**
- **Cytowania: 306 (287 bez autocytowań; wg Web of Science)**
- **Indeks Hirscha: 6 (wg Web of Science), 8 (wg GoogleScholar)**

5.5. Informacja o wystąpieniach na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

5-9 VII 2020 8th European Congress of Pharmacology, Prague, Czechia. **Zaproszony do wygłoszenia wykładu.** (konferencja przeniesiona na 2021r. z uwagi na COVID-19),

14 - 20 III 2020 Gordon Research Seminar and Conference Ligand Recognition and Molecular Gating, Il Ciocco, Italy. Plakat. (konferencja przeniesiona na 2021r. z uwagi na COVID-19),

5 – 7 VI 2019 International Congress of the Polish Pharmacological Society, Lublin, Polska. Plakat: „Studies on the activation mechanism in the Frizzled family of GPCRs”,

28 – 31 X 2018 G Protein-coupled Receptors from Physiology to drugs (RCPG-PHYSIO-MED), Strasbourg, France. Plakat: „Multi-method analysis reveals common activation mechanism in the Frizzled family of GPCRs”,

15 – 17 XII 2015 British Pharmacological Society Annual Meeting, London, UK. Plakat: „Potential N-glycosylation of the orphan receptor GPR61; the role in membrane expression”,

21 – 24 IV 2015 Vitamin D workshop, Delft, The Netherlands. Plakat: „Calcitriol and side-chain modified vitamin d analogs: their impact on healthy and malignant B-cells”,

12 IV 2014 PhD Students' Achievements, Krakow, Polska. Plakat: „Studies on enzymes in *in vitro* cultured cells”,

25 – 26 V 2013 I Students' conference Biofusions. University of Warsaw, Polska. Plakat: „Molecular biology and computational chemistry in natural sciences”,

19 – 20 III 2013 Discovery Chemistry Congress: Chemical Biology, Monachium, Germany. Plakat: „Computational chemistry in studies on oxindole pentacyclic alkaloids of *Uncaria tomentosa*”,

26 – 28 X 2012 Farmakoterapia kobiet w ciąży, Katowice, Polska. Prezentacja multimedialna: „Modelowanie molekularne w opisie pentacyklicznych oksoindolowych alkaloidów z *Uncaria tomentosa*”,

10 – 13 V 2012 Warsaw International Medical Congress for Young Scientists, Warsaw, Polska. Prezentacja multimedialna: „Molecular modeling studies on pentacyclic oxindole alkaloids of *Uncaria tomentosa* (Cat's claw)”,

6 – 9 IX 2011 Amgen Scholars European Symposium, Cambridge, UK. Plakat: „Hue scaling in a cone-opponent color space”,

5.6. Informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji

16 II 2013 Ogólnopolskie Sympozjum Naukowe Studentów Wydziałów Farmaceutycznych, Warszawa, Polska, współorganizator.

5.7. Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów. Podano rok przyznania finansowania

od 2019 COST action 'Adher'n Rise' on adhesion GPCRs CA18240, członek komitetu ze Szwecji,

od 2019 European Research Network on Signal Transduction (ERNEST) CA18133, członek 2 zespołów badawczych.

5.8. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach

od VIII 2017 Karolinska Institute Postdoc Association, członek,

IX 2015 – IX 2016 British Pharmacological Society, członek,

II 2012 – II 2013 Studenckie Towarzystwo Naukowe Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, członek,

I 2012 – XII 2013 Royal Pharmaceutical Society w Londynie, członek,

X 2010 – VIII 2013 Studenckie Koło Naukowe „Free Radical” przy Zakładzie Chemii Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, członek,

X 2009 – VIII 2013 Młoda Farmacja Warszawa, The European Pharmaceutical Students' Association, The International Pharmaceutical Students' Federation, członek,

2009 – 2010 Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Fizjologii Człowieka Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, członek,

2007 – 2013 Samorząd Studentów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Warszawie, członek.

5.9. Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru

IX 2012 Pobyt stażowy w ramach IPSF Student Exchange Programme na University of Granada, Spain, Wydział Farmaceutyczny, Department of Pharmaceutical and Organic Chemistry,

VII – IX 2011 Pobyt stypendialny w ramach AMGEN SCHOLARS Programme Europe 2011 na Ludwig Maximilian University of Munich, Germany, Department Biology II,

X 2010 – VI 2011 Pobyt stypendialny w ramach programu Erasmus w UCL School of Pharmacy, London, UK, Department of Pharmaceutical and Biological Chemistry.

5.10. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych

Byłem recenzentem prac naukowych w następujących czasopismach o międzynarodowym zasięgu (w nawiasach podałem najnowszy IF): British Journal of Pharmacology (IF2019 = 7,730), Cell Chemical Biology (IF2019 = 7,739), Plants (IF2019 = 2,762), FEBS Open Bio (IF2019 = 2,231), Structural Chemistry (IF2019 = 2,081) oraz Communications Biology.

Od XII 2020 Członek Rady Naukowej czasopisma Farmacja Polska (MNIŚW = 20)

5.11. Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych

2013 – 2016 Stypendium EU FP-7 Marie-Curie dla Early Stage Researcher realizowane na Uniwersytecie w Birmingham oraz firmie Celentyx w Birmingham, w Wielkiej Brytanii.

5.12. Współpraca z ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą

1. Dr Gary Davidson, Karlsruhe Institute of Technology, Germany, współpraca w zakresie produkcji fluorescencyjnych białek Wnt, jedna wspólna publikacja,
2. Dr Petros Tsoungas, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, współpraca w zakresie badań własności aromatycznych cząsteczek aromatycznych, sześć wspólnych publikacji,
3. Prof. Mire Zloh, Hertfordshire University, Hatfield, United Kingdom (professor emeritus), współpraca w zakresie badań NMR, pięć wspólnych publikacji,
4. Dr Joanna J. Sajkowska-Kozieliwicz, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska, współpraca w zakresie badań biologicznych substancji pochodzenia naturalnego, trzy wspólne publikacje,
5. Prof. Nicholas M. Barnes, University of Birmingham, United Kingdom, współpraca w zakresie zagadnień farmakologicznych, trzy wspólne publikacje po ukończeniu studiów doktoranckich,
6. Dr Jens Carlsson, Uppsala University, Sweden, współpraca w zakresie modelowania molekularnego, jedna wspólna publikacja,
7. Dr Madan Babu, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom, współpraca w zakresie analiz genomicznych, jedna wspólna publikacja,
8. Prof. Carsten Hoffmann, Jena University Hospital, Germany, współpraca w zakresie projektowania fluorescencyjnych biosensorów konformacji, jedna wspólna publikacja,
9. Prof. Vitezslav Bryja, Masaryk University, Brno, Czech Republic, współpraca w zakresie analizy interakcji FZD – DVL,
10. Dr Anna-Lena Gustavsson, Chemical Biology Consortium Sweden, współpraca w zakresie wysoceprzepustowego skryningu ligandów.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

W ramach działalności dydaktycznej:

- od czerwca 2020 na Karolinska Institute jestem opiekunem (30 %) doktoranta: Rawan Shekhani; planowana obrona w roku 2023,
- od roku 2020 współprowadzę seminaria z farmakokinetyki i farmakologii receptorów dla studentów 2. roku medycyny na Karolinska Institute,
- w latach 2013-2016 prowadziłem zajęcia laboratoryjne z farmakologii (test wiązania radioligandów, immunocytochemia, western blot) dla studentów kierunków biomedycznych i medycznych na Uniwersytecie w Birmingham.

W ramach działalności popularyzatorskiej:

- uczestnictwo w Wrocław Think Corner 2015 (współprowadzenie warsztatów),
- uczestnictwo w Birmingham Think Corner 2014 (współprowadzenie warsztatów),
- prowadzenie zajęć języka polskiego dla studentów kierunków biomedycznych i medycznych na Uniwersytecie w Birmingham (2014-2015),
- w latach 2011-2013 publikacje popularno-naukowe na temat suplementów diety w czasopiśmie KiF (ISSN: 1429-5156).

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

7.1. Przyznanie finansowanie w ramach indywidualnych grantów badawczych

W trakcie realizacji:

2020 The Lars Hierta Memorial Foundation (FO2020-0304), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 40 000 koron szwedzkch,

2020 Karolinska Institute's Research Foundation Grant (2020-01426), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 202 000 koron szwedzkch,

2020 Cancerfonden Postdokortjänster (20 0264 P), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 2 196 000 koron szwedzkch,

2020 The Alex and Eva Wallström Foundation for scientific research (2020-00228), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 275 000 koron szwedzkch,

2020 Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) medium and small allocations, kierownik i wykonawca grantu.

Zrealizowane:

2020 The Swedish Society of Medical Research (SSMF) (P19-0055), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 600 000 koron szwedzkch,

2019 The Lars Hierta Memorial Foundation (FO2019-0086), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 50 000 koron szwedzkch,

2019 Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) medium and small allocations, kierownik i wykonawca grantu,

2018 Karolinska Institute's Research Foundation Grant (2018-01520), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 98 600 koron szwedzkch,

2018 Karolinska Institute Travel Grant (2018-02427), kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 5 000 koron szwedzkch,

2018 Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) medium and small allocations, kierownik i wykonawca grantu,

2017 Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) medium and small allocations, kierownik i wykonawca grantu,

2012 Mini-grant studencki (FW28/NM2/2012) „Badanie właściwości biologiczno-chemicznych pentacyklicznych alkaloidów oksoindolowych z *Uncaria tomentosa* z użyciem metod modelowania molekularnego”, kierownik i wykonawca grantu. Wartość grantu: 10 000 polskich złotych.

7.2. Nagrody, wyróżnienia i stypendia

I 2020 Wyróżniony autor miesiąca czasopisma *Molecular Pharmacology* za artykuł „A NanoBRET-Based Binding Assay for Smoothed Allows Real-time Analysis of Ligand Binding and Distinction of Two Binding Sites for BODIPY-cyclopamine”,

XII 2013 2. Nagroda w grupie tematycznej Modelowanie Molekularne podczas L Wydziałowego Konkursu Prac Magisterskich kierunku Farmacja WFzOML WUM,

XII 2012 Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia na rok akademicki 2012/2013,

V 2012 3. miejsce podczas Warsaw International Medical Congress w kategorii Pharmacy za prezentację „Molecular modelling studies on pentacyclic oxindole alkaloids of *Uncaria tomentosa* (Cat's claw)”,

2008-2013 Stypendia JM Rektora dla najlepszych studentów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,

X 2006 Stypendium Prezesa Rady Ministrów dla najlepszych uczniów szkół ponadgimnazjalnych.

7.3. Przebyte szkolenia i kursy

23 V 2019 Open radioactive sources training, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden,

2017 – 2018 kursy: Pharmaceutical Bioinformatics, Applied Pharmaceutical Bioinformatics oraz Applied Structural Pharmaceutical Bioinformatics, Uppsala University, Sweden,

2017 Szkolenie z planowania, wykonywania procedur i uśmiercania zwierząt, POLLASA, Warszawa,

I 2015 Phlebotomy training at the Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, UK,

X – XI 2014 Flow cytometry training at the Queen Elizabeth Hospital in Birmingham, UK,

15 I 2013 Writing Great Papers in International Journals. An Introduction for Researchers. Organizator: Wiley, Warszawa,

10 X 2012 Podstawowe Zabiegi Resuscytacyjne z zastosowaniem Defibrylatora Automatycznego. Organizator: Warszawski Uniwersytet Medyczny,

26 VIII 2011 Poster design & presentation II. Organizatorzy: Amgen Foundation oraz Pete Moore ThinkWrite, Munich, Germany,

21 – 25 VII 2011 Scientific writing & publishing, Poster design & presentation I. Organizatorzy: Amgen Foundation oraz Pete Moore ThinkWrite, Munich, Germany.

8. Literatura

1. Hu, G.M., T.L. Mai, and C.M. Chen, *Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 15495.
2. Hauser, A.S., et al., *Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(12): p. 829-842.
3. Hauser, A.S., et al., *Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 41-54 e19.
4. Alexander, S.P.H., et al., *THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors*. Br J Pharmacol, 2019. **176 Suppl 1**: p. S21-S141.
5. De Lean, A., J.M. Stadel, and R.J. Lefkowitz, *A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor*. J Biol Chem, 1980. **255**(15): p. 7108-17.
6. Berg, K.A. and W.P. Clarke, *Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity*. Int J Neuropsychopharmacol, 2018. **21**(10): p. 962-977.
7. Krishna Kumar, K., et al., *Structure of a Signaling Cannabinoid Receptor 1-G Protein Complex*. Cell, 2018.
8. Liang, Y.L., et al., *Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex*. Nature, 2018.
9. Koehl, A., et al., *Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors*. Nature, 2019. **566**(7742): p. 79-84.
10. Deshpande, I., et al., *Smoothened stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity*. Nature, 2019. **571**(7764): p. 284-288.
11. Shaye, H., et al., *Structural basis of the activation of a metabotropic GABA receptor*. Nature, 2020. **584**(7820): p. 298-303.
12. Schulte, G., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(4): p. 632-67.
13. Erlandson, S.C., C. McMahon, and A.C. Kruse, *Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Signaling*. Annu Rev Biophys, 2018. **47**: p. 1-18.
14. Schulte, G. and S.C. Wright, *Frizzleds as GPCRs - More Conventional Than We Thought!* Trends Pharmacol Sci, 2018. **39**(9): p. 828-842.

15. Schulte, G. and P. Kozielowicz, *Structural insight into Class F receptors - What have we learnt regarding agonist-induced activation?* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019.
16. Kozielowicz, P., A. Turku, and G. Schulte, *Molecular Pharmacology of Class F Receptor Activation*. Mol Pharmacol, 2020. **97**(2): p. 62-71.
17. Tsutsumi, N., et al., *Structure of human Frizzled5 by fiducial-assisted cryo-EM supports a heterodimeric mechanism of canonical Wnt signaling*. Elife, 2020. **9**.
18. Yang, S., et al., *Crystal structure of the Frizzled 4 receptor in a ligand-free state*. Nature, 2018. **560**(7720): p. 666-670.
19. Schulte, G. and V. Bryja, *The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(10): p. 518-25.
20. Wesslowski, J., et al., *eGFP-tagged Wnt-3a enables functional analysis of Wnt trafficking and signaling and kinetic assessment of Wnt binding to full-length Frizzled*. J Biol Chem, 2020.
21. MacDonald, B.T. and X. He, *Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/beta-catenin signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
22. Dijksterhuis, J.P., J. Petersen, and G. Schulte, *WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(5): p. 1195-209.
23. Bowin, C.F., A. Inoue, and G. Schulte, *WNT-3A-induced beta-catenin signaling does not require signaling through heterotrimeric G proteins*. J Biol Chem, 2019. **294**(31): p. 11677-11684.
24. Kozielowicz, P., et al., *Structural insight into small molecule action on Frizzleds*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 414.
25. Kong, J.H., C. Siebold, and R. Rohatgi, *Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling*. Development, 2019. **146**(10).
26. Radhakrishnan, A., R. Rohatgi, and C. Siebold, *Cholesterol access in cellular membranes controls Hedgehog signaling*. Nat Chem Biol, 2020. **16**(12): p. 1303-1313.
27. Shen, F., et al., *Smoothed is a fully competent activator of the heterotrimeric G protein G(i)*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(3): p. 691-7.
28. Qi, X., et al., *Sterols in an intramolecular channel of Smoothed mediate Hedgehog signaling*. Nat Chem Biol, 2020.
29. Qi, X., et al., *Cryo-EM structure of oxysterol-bound human Smoothed coupled to a heterotrimeric Gi*. Nature, 2019. **571**(7764): p. 279-283.
30. Wess, J., *Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity*. Pharmacol Ther, 1998. **80**(3): p. 231-64.
31. Angers, S. and R.T. Moon, *Proximal events in Wnt signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(7): p. 468-77.
32. Molenaar, M., et al., *XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos*. Cell, 1996. **86**(3): p. 391-9.
33. Golan, T., et al., *The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14879-88.
34. Kilander, M.B., et al., *Disheveled regulates precoupling of heterotrimeric G proteins to Frizzled 6*. FASEB J, 2014. **28**(5): p. 2293-305.
35. Kilander, M.B., J. Dahlstrom, and G. Schulte, *Assessment of Frizzled 6 membrane mobility by FRAP supports G protein coupling and reveals WNT-Frizzled selectivity*. Cell Signal, 2014. **26**(9): p. 1943-1949.

36. Halleskog, C., et al., *Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**(1): p. 111.
37. Petersen, J., et al., *Agonist-induced dimer dissociation as a macromolecular step in G protein-coupled receptor signaling*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 226.
38. Wright, S.C., et al., *FZD5 is a Galphaq-coupled receptor that exhibits the functional hallmarks of prototypical GPCRs*. Sci Signal, 2018. **11**(559).
39. Wright, S.C., et al., *A conserved molecular switch in Class F receptors regulates receptor activation and pathway selection*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 667.
40. Ballesteros, J.A. and H. Weinstein, *Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors*. Methods in Neurosciences, 1995. **25**: p. 366–428.
41. Taipale, J., et al., *Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine*. Nature, 2000. **406**(6799): p. 1005-1009.
42. Huang, P., et al., *Structural Basis of Smoothed Activation in Hedgehog Signaling*. Cell, 2018. **174**(2): p. 312-324 e16.
43. Proffitt, K.D., et al., *Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(2): p. 502-7.
44. Gao, C. and Y.G. Chen, *Dishevelled: The hub of Wnt signaling*. Cell Signal, 2010. **22**(5): p. 717-27.
45. Strakova, K., et al., *Dishevelled enables casein kinase 1-mediated phosphorylation of Frizzled 6 required for cell membrane localization*. J Biol Chem, 2018. **293**(48): p. 18477-18493.
46. Wan, Q., et al., *Mini G protein probes for active G protein-coupled receptors (GPCRs) in live cells*. J Biol Chem, 2018. **293**(19): p. 7466-7473.
47. Carpenter, B., et al., *Structure of the adenosine A(2A) receptor bound to an engineered G protein*. Nature, 2016. **536**(7614): p. 104-7.
48. Arthofer, E., et al., *WNT Stimulation Dissociates a Frizzled 4 Inactive-State Complex with Galpha12/13*. Mol Pharmacol, 2016. **90**(4): p. 447-59.
49. von Maltzahn, J., C.F. Bentzinger, and M.A. Rudnicki, *Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(2): p. 186-91.
50. Manning, D.R., F. Shen, and N.A. Riobo, *Evaluating the Activity of Smoothed Toward G Proteins Using [(3)(5)S]Guanosine 5'-(3-O-thio)triphosphate [(3)(5)S]GTPgammaS*. Methods Mol Biol, 2015. **1322**: p. 35-44.
51. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
52. Frank-Kamenetsky, M., et al., *Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists*. J Biol, 2002. **1**(2): p. 10.
53. Chen, J.K., et al., *Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2743-8.
54. Manetti, F., et al., *Virtual screening-based discovery and mechanistic characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothed antagonists*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(4): p. 658-65.

55. Huang, P., et al., *Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling*. Cell, 2016. **166**(5): p. 1176-1187 e14.
56. Gorojankina, T., *Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(7): p. 1317-32.
57. Stoddart, L.A., et al., *Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs*. Nat Methods, 2015. **12**(7): p. 661-3.
58. Lu, W., et al., *Discovery of potent and novel smoothed antagonists via structure-based virtual screening and biological assays*. Eur J Med Chem, 2018. **155**: p. 34-48.
59. Zhang, H., et al., *Overcoming the emerging drug resistance of smoothed: an overview of small-molecule SMO antagonists with antiresistance activity*. Future Med Chem, 2018. **10**(24): p. 2855-2875.
60. Wang, C., et al., *Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4355.
61. Shaw, H.V., A. Koval, and V.L. Katanaev, *A high-throughput assay pipeline for specific targeting of frizzled GPCRs in cancer*. Methods Cell Biol, 2019. **149**: p. 57-75.
62. Koval, A. and V.L. Katanaev, *Platforms for high-throughput screening of Wnt/Frizzled antagonists*. Drug Discov Today, 2012. **17**(23-24): p. 1316-22.
63. Zhang, W., et al., *Discovery of novel frizzled-7 inhibitors by targeting the receptor's transmembrane domain*. Oncotarget, 2017. **8**(53): p. 91459-91470.
64. Inoue, A., et al., *Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs*. Cell, 2019. **177**(7): p. 1933-1947 e25.
65. Takada, R., et al., *Assembly of protein complexes restricts diffusion of Wnt3a proteins*. Commun Biol, 2018. **1**: p. 165.
66. Wang, Y., et al., *Frizzled Receptors in Development and Disease*. Curr Top Dev Biol, 2016. **117**: p. 113-39.

P. Kozieliwicz