

ZAŁĄCZNIK 3a

AUTOREFERAT

dr Wojciech Strzałka
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

1. Imię i Nazwisko.

Wojciech Strzałka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**2a. Stopień naukowy doktora**

Data nadania stopnia naukowego doktora: 28.09.2007.

(Rada Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Kraków).

Dziedzina i dyscyplina nadanego stopnia: nauki biologiczne, biologia.

Promotor: dr hab. Alicja Ziemiencowicz.

Recenzenci: prof. dr hab. Hanna Rokita; prof. dr hab. Jacek Hennig.

Tytuł rozprawy doktorskiej: Analiza molekularna PCNA *Phaseolus coccineus*.

2b. Tytuł zawodowy magistra

Data nadania tytułu zawodowego magistra: 13.06.2001.

(Instytut Biologii Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UJ, Kraków).

Promotor: prof. dr hab. Jan Potempa.

Recenzent: prof. dr hab. Hanna Rokita.

Tytuł pracy magisterskiej: Analiza polimorfizmu genu proteiny V8 oraz elementów repetytywnych występujących w genach proteiny V8, białka A, koagulazy oraz białka wiążącego fibrynogen (ClfB) *Staphylococcus aureus*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

2012 – obecnie Stanowisko adiunkta w Zakładzie Biotechnologii Roślin, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ, Kraków.

2009 – 2012 Stanowisko asystenta w Zakładzie Biotechnologii Roślin, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ, Kraków.

2004 – 2009 Stanowisko asystenta w Zakładzie Genetyki Molekularnej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ, Kraków.

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,**

Charakterystyka roślinnych białek PCNA1 i PCNA2 oraz ich kompleksów tworzonych z innymi białkami z wykorzystaniem modelu doświadczalnego *Arabidopsis thaliana*.

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

1. **Strzałka W.**, Oyama T., Tori K., Morikawa K.
Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment.
(2009), Prot. Sci. 18:1072-1080.
(IF₂₀₀₉=2,937; IF₅=2,86; MNiSzW=25; cyt.=24).
2. **Strzałka W.**✉, Labecki P., Bartnicki F., Aggarwal C., Rapala-Kozik M, Tani C., Tanaka K., Gabrys H.
Arabidopsis thaliana Proliferating Cell Nuclear Antigen has several potential sumoylation sites.
(2012), J. Exp. Bot. 63:2971-2983.
(IF₂₀₁₂=5,242; IF₅=6,23; MNiSzW=45; cyt.=11).
3. **Strzałka W.**✉, Bartnicki F., Pels K., Jakubowska A., Tsurimoto T., Tanaka K.
RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen.
(2013), J. Exp. Bot. 64:859-869.
(IF₂₀₁₃=5,794; IF₅=6,23; MNiSzW=45; cyt.=9).
4. **Strzałka W.**✉, Aggarwal C., Krzeszowiec W., Jakubowska A., Sztatelman O., Banas A.K.
Arabidopsis PCNAs form complexes with selected D-type cyclins.
(2015), Front. Plant Sci. 6:516.
(IF₂₀₁₅=4,495; IF₃=4,03; MNiSzW=40; cyt.=1).

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

PCNA to skrótowa nazwa białka, które po raz pierwszy odkryto w jądrach aktywnie dzielących się komórek, stąd też jego angielska nazwa to Proliferating Cell Nuclear Antigen. W języku polskim białko to nazywane jest jądrowym antygenem komórek proliferujących. Odkrycia PCNA dokonał zespół E. Tana w rezultacie badań prowadzonych z wykorzystaniem surowicy pacjentów cierpiących na chorobę autoimmunologiczną określaną jako systemowy toczeń rumieniowaty (Miyachi i in., 1978). Niezależnie od wyników uzyskanych przez grupę E. Tana, w 1980 roku R. Bravo i J. Celis opublikowali pracę dotyczącą cyklu komórkowego. Przy użyciu techniki elektroforezy dwuwymiarowej zidentyfikowali oni syntetyzowane w fazie S cyklu komórkowego białko o masie cząsteczkowej 36 000. Późniejsze badania M. Mathews i współpracowników (1984) wykazały, że białko opisane przez grupę E. Tana oraz R. Bravo i J. Celisa jest tą samą cząsteczką. Badania replikacji DNA, prowadzone w latach 80-tych XX wieku, doprowadziły do odkrycia funkcji jakie PCNA pełni w tym procesie. Na ich podstawie wykazano, że PCNA jest białkiem pomocniczym eukariotycznej polimerazy DNA typu delta, niezbędnym podczas replikacji DNA (Tan i in., 1986; Bravo i in., 1987). Obecnie wiadomo, że w trakcie procesu

replikacji genomowego DNA, PCNA tworzy tak zwaną platformę białkową ślizgającą się po DNA. Do tej platformy rekrutowane są białka zaangażowane w metabolizm DNA, w tym jego replikację, proces kluczowy dla każdej dzielącej się komórki. PCNA naturalnie występuje w formie trimerycznej. Trzy monomery PCNA łączą się ze sobą w odpowiedniej konfiguracji tworząc homotrimer o kształcie pierścienia. W trakcie replikacji homotrimer PCNA umieszczany jest na DNA, przy udziale kompleksu RFC (ang. *Replication Factor C*) (Strzałka i Ziemiłowicz, 2011).

Do rozwoju wiedzy dotyczącej PCNA u eukariontów przyczyniły się głównie badania prowadzone z wykorzystaniem modelu drożdżowego (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz modeli zwierzęcych. Wyniki intensywnych prac eksperymentalnych doprowadziły do identyfikacji ponad pięćdziesięciu białek oddziałujących z PCNA (Tsurimoto, 1987). Na postawie m.in. funkcji jakie pełnią one w komórkach wykazano, iż PCNA uczestniczy nie tylko w replikacji DNA, ale także w jego naprawie oraz w kontroli cyklu komórkowego (Maga i Hubsher, 2003; Strzałka i Ziemiłowicz, 2011). W białkach wchodzących w interakcje z PCNA zidentyfikowano m.in. motyw PIP-box (ang. PCNA interacting protein) uczestniczący w oddziaływaniu z PCNA. Sekwencja aminokwasowa tego motywu to q-x-x-(h)-x-x-(a)-(a), gdzie q oznacza glutaminę, h - aminokwas średnio hydrofobowy (L, I lub M), a – aminokwas hydrofobowy (F lub Y) oraz x - dowolny aminokwas (Tsurimoto i in., 1987; Strzałka i Ziemiłowicz, 2011). Kolejnym ważnym obszarem badań nad PCNA są modyfikacje potranslacyjne tego białka, które w zasadniczy sposób mogą zmieniać właściwości PCNA (Hoege i in., 2002; Ortega i in., 2015).

Do podjęcia tematyki badawczej dotyczącej PCNA1 i PCNA2 u *Arabidopsis* skłonił mnie przede wszystkim fragmentaryczny stan wiedzy na temat roślinnego PCNA, w szczególności u organizmów w genomach których wykazano obecność więcej niż jednego genu kodującego białko PCNA. W związku z powyższym, **celem przewodnim moich badań była analiza białek PCNA1 i PCNA2 oraz ich kompleksów tworzonych z innymi białkami w komórkach rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*. Rezultaty przeprowadzonych badań eksperymentalnych, zawarte są w czterech oryginalnych publikacjach, które przedstawiłem jako osiągnięcie naukowe.**

Białka PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis*, zbudowane odpowiednio z 263 i 264 aminokwasów, są identyczne w 97% różniąc się dziewięcioma aminokwasami. Aby określić czy różnica 9 aminokwasów ma wpływ na różnice w strukturze przestrzennej pomiędzy PCNA1 i PCNA2, w pierwszej pracy skupiłem się na analizie strukturalnej tych białek w celu identyfikacji różnic i podobieństw pomiędzy nimi. Ponadto, dodatkowym celem badań było ustalenie możliwości tworzenia struktur heterotrimerycznych przez białka PCNA1/2 (Strzałka i in., 2009). W kolejnych dwóch pracach skoncentrowałem się na badaniu modyfikacji potranslacyjnych (sumoilacji oraz ubikwitynacji) białek PCNA1 i PCNA2 (Strzałka i in., 2012; 2013). Badania zaprezentowane w tych dwóch publikacjach miały na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy białka PCNA u roślin mogą być modyfikowane przez SUMO (ang. *Small Ubiquitin-like Modifier*) i/lub ubikwitynę tak jak to ma miejsce u drożdży i ssaków (Hoege i in., 2002). Po pozytywnym zweryfikowaniu przyjętych hipotez przeprowadziłem szczegółową analizę sumoilacji i ubikwitynacji białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis*. Wyniki badań jednoznacznie wykazały, że wzór sumoilacji obydwu białek PCNA *Arabidopsis* odbiega znacznie od wzoru sumoilacji PCNA drożdżowego. Nie można zatem wykluczyć, że różnica ta jest odzwierciedleniem odmiennych funkcji pełnionych przez sumoilowane PCNA u drożdży i u roślin. Dlatego też rezultaty badań funkcji roślinnego sumoilowanego PCNA z wykorzystaniem modelu drożdżowego muszą zostać ostatecznie poddane weryfikacji *in planta* (Strzałka i in., 2012). Wyniki badań dotyczących ubikwitynacji PCNA pozwoliły na

zidentyfikowanie podobieństw między ubikwitynacją białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis* a ubikwitynacją PCNA drożdżowego (Strzałka i in., 2013). Czwartą przedstawioną pracę eksperymentalną poświęciłem analizie kompleksów białek PCNA i cyklin z grupy D *Arabidopsis* (Strzałka i in., 2015). Zaprezentowane w niej wyniki są kluczowe ponieważ wskazują na możliwość zróżnicowania funkcjonalnego białek PCNA1 i PCNA2 u *Arabidopsis*. Podsumowując, prace przedstawione w ramach mojego osiągnięcia naukowego dostarczają nowych informacji na temat roślinnych białek PCNA, ich modyfikacji potranslacyjnych oraz kompleksów tworzonych z cyklinami typu D.

Analiza strukturalna białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis thaliana* występujących w kompleksie z C-kończym fragmentem ludzkiego białka p21.

(Zwięzły opis badań zaprezentowanych w publikacji: Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. (2009), Protein Sci. 18:1072-1080).

Główne cele naukowe pracy:

- Krystalizacja białek PCNA1 i PCNA2 w kompleksie z C-kończym fragmentem ludzkiego białka p21.
- Budowa modelu przestrzennego wybranych kompleksów na podstawie analizy danych uzyskanych metodą dyfrakcji rentgenowskiej.
- Określenie stałej dysocjacji kompleksów PCNA1/C-kończym fragment białka p21 oraz PCNA2/C-kończym fragment białka p21.
- Weryfikacja zdolności białek PCNA1 i PCNA2 do tworzenia kompleksów heterotrimerycznych.

W genomach niektórych roślin (na przykład: *A. thaliana*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*) zidentyfikowane zostały dwa geny kodujące białka PCNA nazwane PCNA1 i PCNA2. Badania opublikowane przez H. Andersona i współpracowników z wykorzystaniem modelu drożdżowego zasugerowały możliwe funkcjonalne zróżnicowanie białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis* (Anderson i in, 2008). Fakt ten zainspirował mnie do badań, których celem było uzyskanie odpowiedzi na pytanie dotyczące roli/znaczenia obecności dwóch genów kodujących dwa różne białka PCNA u roślin. W pierwszym podejściu eksperymentalnym, którego rezultaty opisano w omawianej publikacji, przeprowadzono krystalizację kompleksu C-końcowego fragmentu ludzkiego białka p21 (peptyd p21) z białkiem PCNA1 lub PCNA2 *Arabidopsis*. Wykorzystanie fragmentu ludzkiego białka p21 było spowodowane faktem, iż początkowe próby krystalizacji czystych białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis* zakończyły się niepowodzeniem. Dlatego podjęto próbę ich krystalizacji w kompleksie z fragmentem białka p21, tak jak to miało miejsce w przypadku ludzkiego PCNA (Gulbis i in., 1996). Na podstawie analizy rentgenowskiej uzyskanych kryształów zbudowano model trójwymiarowy badanych kompleksów. Stwierdzono, że obydwie analizowane białka PCNA tworzą homotrimeryczne struktury o kształcie pierścienia. Każdy z monomerów zbudowany jest z domeny N-końcowej oraz C-końcowej, które są ze sobą połączone międzydomenową pętlą. We wnętrzu trimerycznego pierścienia PCNA1 jak i PCNA2 znajdują się α helisy, natomiast na zewnątrz dominują struktury β . Analiza porównawcza trimerów PCNA1 oraz PCNA2 nie wykazała obecności znaczących różnic strukturalnych, mogących sugerować ich zróżnicowanie funkcjonalne. Oznacza to, że jeżeli występuje zróżnicowanie funkcjonalne badanych białek, to jest ono związane prawdopodobnie z subtelnymi różnicami pomiędzy architekturą powierzchni PCNA1 i PCNA2. Analiza głównych miejsc oddziaływania białek PCNA1 i

PCNA2 z C-kończącym fragmentem białka p21 (peptyd p21) również nie wykazała istotnych różnic w wiązaniu tego peptydu do analizowanych białek. Uzyskana struktura kompleksu N-końcowej części peptydu p21 (odcinek białka p21 zawierający typową sekwencję PIP-box zaangażowaną w oddziaływanie z PCNA) z oboma białkami PCNA *Arabidopsis* okazała się zgodna z danymi zamieszczonymi wcześniej w literaturze dla ludzkiego kompleksu PCNA/PIP-box (Gulbis i in., 1996). Z kolei wiązanie C-końcowego fragmentu peptydu p21 do PCNA1/2 *Arabidopsis* różniło się od wiązania pomiędzy tym fragmentem a PCNA ludzkim. Przymuszczałnie było to efektem innego upakowania kryształu. Charakterystyka oddziaływania peptydu p21 z PCNA1 i PCNA2, z wykorzystaniem zjawiska plazmonowego rezonansu powierzchniowego, potwierdziła znaczące powinowactwo pomiędzy badanymi cząsteczkami, wskazując jednocześnie na istotne znaczenie sekwencji PIP-box u roślin. Ostatecznie podjęto badania w wyniku których potwierdzono możliwość tworzenia przez białka PCNA1 i PCNA2 heterotrimerycznych kompleksów. Tworzenie takich kompleksów może mieć istotne znaczenie w kontekście proponowanego zróżnicowania funkcjonalnego tych białek.

Osiągnięte wyniki:

- Skryzalizowano kompleksy PCNA1/C-końcowy fragment białka p21 oraz PCNA2/C-końcowy fragment białka p21.
- Zbudowano modele struktury przestrzennej obu wykrystalizowanych kompleksów.
- Nie znaleziono istotnych różnic strukturalnych pomiędzy białkami PCNA1 i PCNA2.
- Wykazano znaczące powinowactwo pomiędzy PCNA1/2 a C-kończącym fragmentem białka p21 posiadającym sekwencje PIP-box.
- Wykazano zdolność białek PCNA1 i PCNA2 do tworzenia homo- i heterotrimerycznych pierścieni.

Analiza sumoilacji białek PCNA 1 i PCNA2 *Arabidopsis thaliana*.

(Zwięzły opis badań zaprezentowanych w publikacji: *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen has several potential sumoylation sites. (2012), J. Exp. Bot. 63(8):2971-83).

Główne cele naukowe pracy:

- Weryfikacja hipotezy zakładającej możliwość tworzenia w komórce roślinnej kompleksów PCNA1 lub PCNA2 z SUMO.
- Analiza modyfikacji białek PCNA1 i PCNA2 przez SUMO.
- Porównanie wzoru sumoilacji roślinnego i drożdżowego PCNA.
- Identyfikacja reszt aminokwasowych PCNA1 ulegających sumoilacji.

Białko SUMO należy do grupy modyfikatorów potranslacyjnych białek eukariotycznych. Może ono regulować właściwości/funkcje innych białek zarówno poprzez ich kowalencyjną modyfikację jak i niekowalencyjne oddziaływanie. Od czasu odkrycia SUMO zgromadzono wiele informacji na temat roli tego białka w komórce. Wykazano m.in., iż SUMO może wpływać na interakcje białko-białko oraz regulować stabilność, aktywność czy też lokalizację subkomórkową białek (Gill, 2004). W genomie drożdży i człowieka zidentyfikowano odpowiednio jeden i trzy geny kodujące SUMO. Co ciekawe, w wyniku sekwencjonowania genomu *Arabidopsis* zidentyfikowano aż osiem genów kodujących białka SUMO1 do SUMO8 oraz jeden pseudogen nazwany SUMO9. Jak dotąd u *Arabidopsis*, na poziomie mRNA, wykazano ekspresję SUMO1, 2, 3 oraz 5. Produkty ekspresji genów kodujących białka SUMO4, 6, 7 i 8 do tej pory nie zostały zidentyfikowane. Podczas procesu translacji

SUMO syntetyzowane jest w formie prekursora, który, aby uzyskać aktywność biologiczną, musi zostać poddany obróbce proteolitycznej przy udziale SUMO-specyficznej proteazy. Proteaza SUMO odcina część C-końcową łańcucha polipeptydowego SUMO w wyniku czego powstaje dojrzały produkt posiadający na C-końcu dwie reszty glicyny. Dojrzałe SUMO podlega procesowi enzymatycznej aktywacji przy udziale enzymu aktywującego SUMO (E1) (u *Arabidopsis* składającego się z dwóch polipeptydów SAE1 i SAE2). Po aktywacji SUMO przenoszone jest z E1 na E2 (enzym koniugujący SUMO, u *Arabidopsis* oznaczany skrótem SCE1a). Następnie SUMO może być przeniesione na grupę ϵ -aminową lizyny białka docelowego w sposób bezpośredni lub w sposób pośredni, wymagający zaangażowania dodatkowo enzymu E3 (ligazy SUMO) (Novatchkova i in., 2004). Do tej pory u *Arabidopsis* zidentyfikowane zostały 4 ligazy SUMO (Tomanov i in., 2014).

Badania wykorzystujące drożdże doprowadziły do odkrycia, iż białko PCNA jest modyfikowane potranslacyjnie przez SUMO (Hoegel i in., 2002). Pierwsze opublikowane dane eksperymentalne wskazywały, iż PCNA u drożdży może ulegać bezpośredniej sumoilacji poprzez transfer cząsteczki SUMO z białka Ubc9 (E2) na resztę lizyny 127 PCNA. Jednak na podstawie rezultatów kolejnych badań uaktualniono pierwotny model i zaproponowano, że w warunkach *in vivo* sumoilacja lizyny 127 wymaga zaangażowania białka Siz2 (E3 SUMO ligazy; Parker i in., 2008). Dowiedziono także, iż głównym miejscem sumoilacji w PCNA u drożdży jest lizyna 164, która jest modyfikowana w sposób pośredni, ponieważ oprócz zaangażowania białka Ubc9 wymaga udziału białka Siz1, będącego ligazą SUMO (E3). Dalsze prace eksperymentalne wykazały, że sumoilowane PCNA rekrutuje helikazę Srs2 do miejsc replikacji DNA. Obecność tej helikazy może zakłócać tworzenie filamentu formowanego przez białko Rad51 i hamować rekombinację homologiczną DNA. Na podstawie zgromadzonych danych zaproponowano model, według którego w trakcie fazy S cyklu komórkowego w wyniku sumoilacji PCNA dochodzi do rekrutacji helikazy Srs2, co prowadzi do zabezpieczenia replikujących chromosomów przed niepożądanymi zdarzeniami rekombinacyjnymi (Pfander i in., 2005). Z kolei w 2006 roku G. Moldovan i wsp. przedstawili dane wskazujące na to, że sumoilacja PCNA może negatywnie regulować zależny od białka Eco1 proces kohezji chromatyd siostrzanych. W 2012 roku dane z badań drożdżowego PCNA wskazały na rolę sumoilowanego PCNA w stymulacji aktywności białka Rad18 (E3 ligazy ubikwityny) w kierunku ubikwytynacji PCNA (Parker i Ulrich, 2012). W roku 2013 opublikowano również dane eksperymentalne wskazujące, że w przypadku wiązania helikazy Srs2 do sumoilowanego PCNA dochodzi do oddysocjowania polimeraz DNA typu delta jak i eta uczestniczących w naprawczej syntezie DNA (Burkovics i in., 2013).

Na podstawie informacji dotyczących drożdżowego PCNA postanowiłem rozpocząć badania mające na celu m.in. uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy roślinne białka PCNA również mogą ulegać sumoilacji. Badania te koncentrowały się na analizie sumoilacji białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis* z udziałem białek SUMO1, 2, 3, i 5 *Arabidopsis*. W pierwszym etapie prac, korzystając z metody bimolekularnej komplementacji fluorescencji (BIFC) wykazano możliwość tworzenia kompleksów PCNA1/SUMO3 oraz PCNA2/SUMO3 w komórkach roślinnych. W kolejnym etapie badań przystąpiono do szczegółowej analizy sumoilacji białek PCNA1/2 do której wykorzystano system sumoilacji *A. thaliana* zrekonstruowany w komórkach *E. coli*. Przeprowadzone badania zademonstrowały podobny wzór sumoilacji PCNA1 i PCNA2, niezależnie od typu użytej cząsteczki SUMO. Wykazano, że w układzie bakteryjnym zarówno PCNA1 jak i PCNA2 mogą ulegać sumoilacji bezpośredniej bez zaangażowania ligazy SUMO. Co więcej, zaobserwowano znaczące różnice we wzorze sumoilacji pomiędzy PCNA drożdżowym a PCNA *Arabidopsis*. Oznacza to, że wyniki badań funkcji roślinnego sumoilowanego PCNA prowadzone na modelu

drożdżowym powinny być interpretowane z zachowaniem należytej ostrożności i muszą ostatecznie zostać zweryfikowane na modelu roślinnym.

W kolejnym etapie badań podjęto prace mające na celu identyfikację reszt lizyny, które mogą potencjalnie ulegać sumoilacji w białkach PCNA Arabidopsis. W tym celu jako białko modelowe wykorzystano PCNA1 oraz kolekcję mutein tego białka. W każdej z mutein wszystkie reszty lizyny za wyjątkiem badanej zamieniono na argininę. Przeprowadzone eksperymenty doprowadziły do identyfikacji kilku reszt lizyny (K13, K14, K20, K217, K240 oraz K254), które były modyfikowane przez SUMO w układzie bakteryjnym ze zrekonstruowanym systemem sumoilacji Arabidopsis. Pomimo zastosowania w jednym z badanych układów eksperymentalnych roślinnego odpowiednika drożdżowej ligazy SUMO – białka Siz1, ani w PCNA1 ani w PCNA2 nie zaobserwowano sumoilacji lizyny 164, która jak stwierdzono poprzednio ulega modyfikacji w PCNA drożdżowym (Hoegel i in., 2002). Biorąc pod uwagę, że identyczność pomiędzy PCNA1 Arabidopsis a PCNA drożdżowym na poziomie aminokwasowym wynosi 40%, nie można wykluczyć występowania różnic pomiędzy tymi białkami, w tym różnicy w resztach lizyny, które ulegają sumoilacji. Korzystając ze zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonowego wyznaczono wartości stałych dysocjacji kompleksów PCNA1/SCE1a a PCNA2/SCE1a, wynoszące odpowiednio $2.47 \times 10^{-8} \text{M}$ oraz $9.33 \times 10^{-8} \text{M}$. Być może zaobserwowana prawie czterokrotna różnica w powinowactwie pomiędzy PCNA1/SCE1a oraz PCNA2/SCE1a jest powiązana z postulowanym zróżnicowaniem funkcjonalnym białek PCNA1 i PCNA2 Arabidopsis. Jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych szczegółowych badań m.in. nad rolą sumoilowanego PCNA w komórkach roślinnych.

Osiągnięte wyniki:

- Wykazano tworzenie kompleksów PCNA1/SUMO3 oraz PCNA2/SUMO3 w komórkach roślinnych.
- Wykazano możliwość potranslacyjnej modyfikacji białek PCNA1 i PCNA2 przez SUMO1, 2, 3 oraz 5.
- Stwierdzono różnice w sumoilacji drożdżowego i roślinnego PCNA.
- Zidentyfikowano reszty lizyny w PCNA1 mogące potencjalnie ulegać sumoilacji *in planta*.
- Wykazano różnicę w powinowactwie PCNA1 i PCNA2 do białka SCE1a.

Analiza roli białka RAD5a w ubikwitynacji PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis thaliana*.

(Zwięzły opis badań zaprezentowanych w publikacji: RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen. (2013), J. Exp. Bot. 64:859-869).

Główne cele naukowe pracy:

- Weryfikacja hipotezy zakładającej tworzenie kompleksów przez PCNA1 i/lub PCNA2 z ubikwityną lub białkiem Rad5a w komórce roślinnej.
- Analiza modyfikacji białek PCNA1 i PCNA2 przez ubikwitynę.
- Ustalenie czy białko RAD5a jest zaangażowane w ubikwitynację PCNA1 i/lub PCNA2.
- Identyfikacja reszt aminokwasowych w PCNA1 ulegających ubikwitynacji.

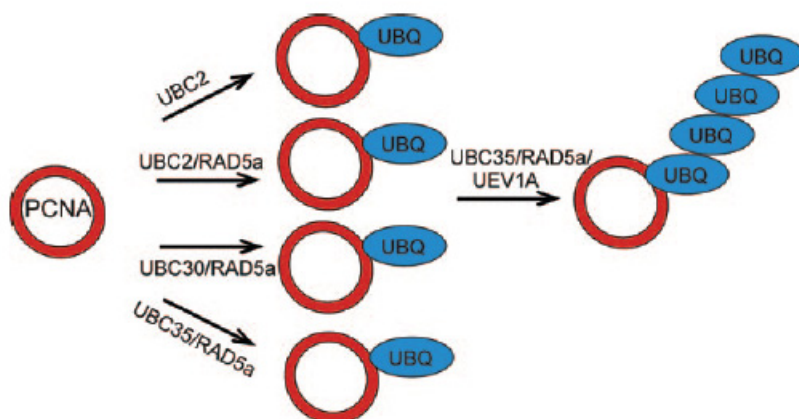
Ubikwityna, podobnie jak SUMO, jest potranslacyjnym modyfikatorem szerokiego spektrum białek komórkowych. Syntetyzowana jest ona w formie prekursora, który następnie podlega obróbce proteolitycznej przy udziale specyficznej proteazy odcinającej C-końcowy fragment

tego białka. W wyniku proteolizy powstaje dojrzała forma ubikwityny o długości 76 aminokwasów, której łańcuch polipeptydowy zakończony jest dwoma resztami glicyny. Dojrzała forma ubikwityny jest następnie aktywowana przez enzym aktywujący ubikwitynę (E1). Zaktywowana ubikwityna jest przenoszona z białka E1 na enzym koniugujący ubikwitynę (E2), aby ostatecznie ulec sprzężeniu z ϵ -aminową resztą lizyny białka docelowego w sposób bezpośredni lub w sposób pośredni, wymagający zaangażowania ligazy ubikwityny (E3). Ubikwitynacja reguluje szereg procesów w komórce, m.in. degradację białek, naprawę DNA oraz transport pęcherzykowy (Sun and Chen, 2004). Substrat ubikwitynacji, reszta lizyny ulegająca modyfikacji, liczba przyłączanych oraz rodzaj połączeń pomiędzy cząsteczkami ubikwityny są determinowane przez kombinację białek E2/E3 (Hershko and Ciechanover, 1998). Według danych literaturowych szacuje się, iż w genomie *Arabidopsis* kodowanych jest aż 1415 ligaz ubikwityny (Mazzucotelli i in., 2006).

W badaniach dotyczących drożdżowego PCNA po raz pierwszy wykazano, że zablokowanie przemieszczania się widełek replikacyjnych spowodowane uszkodzeniami w matrycy DNA indukuje mono- lub poliubikwitynację tego białka i uruchomienie mechanizmu określanego jako poreplikacyjna naprawa DNA (ang. post replication DNA repair, PRR). Proces ubikwitynacji PCNA umożliwia dokończenie syntezy DNA pomimo obecności uszkodzenia w matrycy DNA (Bergink and Jentch, 2009; Strzałka and Ziemienowicz, 2011). Z opublikowanych badań wynika, iż monoubikwitynacja PCNA sprzyja rekrutacji polimeraz DNA typu TLS (ang. *translesion synthesis*), charakteryzujących się stosunkowo niską wiernością replikacji DNA, ale umożliwiającą kontynuację syntezy DNA pomimo występowania uszkodzenia w matrycy DNA (Lee and Myung, 2008). Wykazano m.in., iż polimerazy typu TLS mogą kontynuować replikację DNA pomimo obecności w nici matrycowej np. dimerów pirymidynowych (Goodman and Woodgate, 2013) lub miejsca apurynowego/apirymidynowego (Lange i in., 2011). Na podstawie wyników z przeprowadzonych badań wywnioskowano, że poliubikwitynacja PCNA wydaje się wspierać mechanizm reaktywacji syntezy DNA niezależny od polimeraz TLS, a tym samym niewprowadzający mutacji w DNA. Obecnie uważa się, iż w mechanizmie niezależnym od polimeraz typu TLS, w przypadku wystąpienia uszkodzenia w jednej z replikowanych nici DNA, nowo zsyntetyzowana siostrzana chromatyda wykorzystywana jest chwilowo jako matryca, co umożliwia kontynuację replikacji DNA w obszarze miejsca uszkodzenia matrycy pierwotnej (Lee and Myung, 2008).

Badania poświęcone analizie ubikwitynacji PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis*, prowadziłem w okresie, w którym nie były znane żadne informacje na temat ubikwitynacji PCNA u roślin. Przystępując do nich skorzystałem z informacji, które uzyskano wcześniej badając ubikwitynację PCNA u drożdży. Wykazano wówczas, że PCNA może być modyfikowane przez ubikwitynę w pozycji lizyny 107 oraz lizyny 164. Co więcej, zademonstrowano, że modyfikacja lizyny 107 zachodzi m.in. przy udziale białek Ubc4 (E2), Mms2 oraz Rad5 (E3). Z kolei modyfikacja lizyny 164 może zachodzić m.in. przy udziale białek Ubc6 (E2) oraz Rad18 (ligaza E3, której homolog u roślin nie został do tej pory zidentyfikowany). Dodatkowo, wykazano, iż poliubikwitynacja PCNA u drożdży zależy m.in. od białek Ubc13 (E2), Mms2 oraz Rad5 (E3) (Hoegel i in., 2002, Das Bradoo i in., 2010). Na podstawie powyższych informacji, w pierwszym etapie badań, korzystając z narzędzi bioinformatycznych oraz bazy sekwencji białkowych *Arabidopsis*, przeprowadzono identyfikację białek wykazujących podobieństwo sekwencji aminokwasowej do białek drożdżowych zaangażowanych w ubikwitynację PCNA. W wyniku tych analiz znaleziono homologi wszystkich poszukiwanych białek, za wyjątkiem odpowiednika drożdżowego białka Rad18. Następnie, techniką BiFC, wykazano, iż PCNA1 i PCNA2 tworzą w komórkach

roślinnych kompleksy zarówno z ubikwityną jak i białkiem RAD5a (jedna z dwóch ligaz E3 Arabidopsis, wykazująca podobieństwo względem sekwencji drożdżowego białka Rad5). W kolejnym etapie badań, w komórkach *E. coli* zrekonstruowano układ ubikwitynacji PCNA1 i PCNA2 Arabidopsis. Następnie zademonstrowano, że ubikwityna może być bezpośrednio przenoszona z białka UBC2 (E2, homolog drożdżowego Rad6) na resztę lizyny 164 tak PCNA1 jak i PCNA2 Arabidopsis. Badając transfer ubikwityny z białka UBC30 (E2, homolog drożdżowego Ubc4) na lizynę 164 analizowanych białek PCNA wykazano, że może się on odbywać jedynie w sposób pośredni, który wymaga udziału białka RAD5a. Co więcej, pokazano, że przeniesienie cząsteczki ubikwityny z białka UBC35 (E2, homolog drożdżowego Ubc13) na resztę lizyny 164 PCNA1 jak i PCNA2 jest także procesem pośrednim i wymaga on zaangażowania ligazy ubikwityny – białka RAD5a. Analizując ubikwitynację roślinnego PCNA wykazano, że wzbogacenie układu zawierającego białka UBC35 i RAD5a o kolejne białko UEV1A (homolog drożdżowego białka Mms2) wpływa na zmianę jego właściwości, w wyniku czego dochodzi do poliubikwitynacji PCNA poprzez tworzenie łańcucha zbudowanego z wielu pojedynczych modułów ubikwityny. Wykazano, że resztą ubikwityny uczestniczącą w tworzeniu łańcuchów poliubikwitynowych jest lizyna 63. Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentalnych zaproponowano możliwe ścieżki ubikwitynacji PCNA1 i 2 u Arabidopsis (Rys 1., Strzałka i in., 2013).



Rys. 1. Model ubikwitynacji PCNA1 i PCNA2 Arabidopsis opracowany na podstawie uzyskanych wyników eksperymentalnych. Czerwonym kolorem zaznaczono trimeryczny pierścień PCNA.

Osiągnięte wyniki:

- Wykazano tworzenie kompleksów PCNA1/ubikwityna, PCNA2/ubikwityna, PCNA1/RAD5a oraz PCNA2/RAD5a w komórkach roślinnych.
- Wykazano, że ubikwitynacja białek PCNA1 i PCNA2 może zachodzić w sposób bezpośredni oraz pośredni.
- Wykazano udział i rolę białka UEV1A w poliubikwitynacji PCNA1 i PCNA2.
- Udowodniono, iż jedną z reszt aminokwasowych w PCNA1 i PCNA2 ulegającą ubikwitynacji jest lizyna 164.
- Wykazano, iż resztą aminokwasową w ubikwitynie zaangażowaną w tworzenie łańcuchów poliubikwityny na lizynie 164 PCNA1 oraz PCNA2 jest lizyna 63.

Analiza kompleksów cyklina typu D/PCNA Arabidopsis

(Zwięzły opis badań zaprezentowanych w publikacji: Arabidopsis PCNAs form complexes with selected D-type cyclins. (2015), Front. Plant Sci. 6:516).

Główne cele naukowe pracy:

- Określenie lokalizacji subkomórkowej cyklina typu D Arabidopsis.
- Identyfikacja cyklina z grupy D tworzących kompleksy z białkami PCNA1 i PCNA2.
- Określenie lokalizacji subkomórkowej kompleksów cyklina typu D/PCNA.
- Analiza porównawcza kompleksów cyklina typu D/PCNA1 i cyklina typu D/PCNA2.

Cykliny typu D należą do grupy białek regulujących aktywność kinaz cyklinozależnych oraz ich specyficzność substratową. Program sekwencjonowania genomu *Arabidopsis thaliana* doprowadził do identyfikacji 10 genów kodujących cykliny typu D (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). W obrębie sekwencji aminokwasowej roślinnych cyklina typu D wyróżnić można motywy oraz domeny charakterystyczne dla różnego typu cyklina, w tym tak zwany (i) rdzeń zbudowany albo z konserwatywnej N-końcowej domeny lub N-końcowej i mniej konserwatywnej C-końcowej domeny oraz (ii) kasetę cyklinową (ang. cyclin box), zlokalizowaną w obrębie N-końcowej domeny, która jest miejscem wiązania dla kinaz cyklinozależnych. W sekwencji białkowej niektórych cyklina typu D można również zidentyfikować domenę PEST (prolina (P), kwas glutaminowy (E), seryna (S) i treonina (T)) będącą markerem niestabilności białka (Wang i in., 2004; Buendia-Monreal i in., 2011). Innym elementem występującym w obszarze N-końcowym sekwencji aminokwasowej wielu cyklina typu D jest konserwatywny motyw wiążący białko retinoblastoma (Buendia-Monreal i in., 2011). Uzgodniony motyw tej sekwencji to LXCXE, gdzie litery L, C, E reprezentują odpowiednio leucynę, cysteinę oraz kwas glutaminowy, natomiast X oznacza dowolny aminokwas. W toku badań nad cyklina typu D u zwierząt oraz roślin wykazano, iż mogą one tworzyć kompleksy nie tylko z kinazami cyklinozależnymi, ale także z innymi białkami np. p21 czy też PCNA (Xiong i in., 1992, Becerril i in., 2012).

Z uwagi na brak informacji na temat kompleksów cyklina typu D/PCNA Arabidopsis, kolejny etap moich badań postanowiłem poświęcić eksperymentom, których celem było stwierdzenie czy, i które, cykliny typu D Arabidopsis tworzą kompleksy z białkiem PCNA1 lub PCNA2. W pierwszym etapie badań wykazano, że większość spośród dziesięciu cyklina typu D, poza cyklina typu D2;1, D4;1 oraz D4;2, których obecność obserwowano w jądrze i w cytoplazmie, lokalizuje się wyłącznie w jądrze komórkowym. Uzyskane rezultaty były częściowo zbieżne z wcześniej opublikowanymi wynikami (Kono i in., 2007, Boruc i in., 2010). Badania przeprowadzone z zastosowaniem metody BiFC, dwuhybrydowego systemu drożdżowego (Y2H) oraz metody spektroskopii fluorescencyjnej wykorzystującej zjawisko bezpromienistego transferu energii (FLIM-FRET) wskazały, że w analizowanych układach eksperymentalnych ani PCNA1 ani PCNA2 nie tworzyły kompleksów z cyklina typu D1;1, D3;1 i D3;3. Zaobserwowano natomiast kompleksy cyklina typu D2;1, D3;2, D4;1, D4;2, D5;1, D6;1, D7;1 z PCNA1 i/lub PCNA2. Uzyskane wyniki zasugerowały, że u Arabidopsis tworzenie kompleksów cyklina typu D3;2/PCNA oraz D4;1/PCNA może być regulowane przez dodatkowe i niezidentyfikowane do tej pory czynniki. Niezmiernie interesujące rezultaty uzyskano z wykorzystaniem techniki FLIM-FRET. Przeprowadzona analiza wykazała, iż odległość pomiędzy parami białek: cyklina typu D4;1/PCNA1, cyklina typu D6;1/PCNA1, cyklina typu D7;1/PCNA1 oraz cyklina typu D4;2/PCNA2 jest mniejsza od odległości pomiędzy, odpowiednio, cyklina typu D4;1/PCNA2, cyklina typu D6;1/PCNA2, cyklina typu

D7;1/PCNA2 oraz cyklina typu D4;2/PCNA1. Dane te wskazują, iż różnica 9 aminokwasów pomiędzy sekwencjami białkowymi PCNA1 i PCNA2 ma wpływ na architekturę kompleksów cyklina typu D/PCNA Arabidopsis. Jedno z zagadnień, którymi obecnie się zajmuję, dotyczy znaczenia biologicznego zaobserwowanych różnic w architekturze badanych kompleksów.

Osiągnięte wyniki:

- Zidentyfikowano cykliny typu D tworzące kompleksy z białkami PCNA1 i PCNA2.
- Określono lokalizację subkomórkową obserwowanych kompleksów cyklina typu D/PCNA w komórkach roślinnych.
- Zaobserwowano różnice w odległościach pomiędzy partnerami białkowymi dla par kompleksów cyklina typu D4;1/PCNA1 i cyklina typu D4;1/PCNA2, cyklina typu D4;2/PCNA1 i cyklina typu D4;2/PCNA2, cyklina typu D6;1/PCNA1 i cyklina typu D6;1/PCNA2 oraz cyklina typu D7;1/PCNA1 i cyklina typu D7;1/PCNA2.

Podsumowanie

Prace eksperymentalne przedstawione jako moje osiągnięcie naukowe dostarczyły nowych informacji na temat białek PCNA1 i PCNA2 Arabidopsis oraz kompleksów tworzonych przez nie z innymi białkami. We współpracy z zespołem profesora K. Morikawy z Osaka University scharakteryzowano i porównano strukturę trzecio- i czwartorzędową PCNA1 i PCNA2. Ponadto, wykazano zdolność badanych białek do tworzenia pierścieni heterotrimerycznych, co może mieć kluczowe znaczenie w kontekście ich postulowanego zróżnicowania funkcjonalnego. Podejmując badania we współpracy z naukowcami z Kwansai Gakuin University oraz Kyushu University, dotyczące wybranych modyfikacji potranslacyjnych roślinnych białek PCNA wykazano, że zarówno PCNA1 jak i PCNA2 Arabidopsis mogą ulegać sumoilacji oraz ubikwitynacji. Co więcej, zademonstrowano, które białka zaangażowane są w sumoilację, monoubikwitynację oraz poliubikwitynację roślinnego PCNA. Zidentyfikowano reszty aminokwasowe w PCNA mogące podlegać tym modyfikacjom. Ostatecznie zademonstrowano, które cykliny typu D Arabidopsis mogą tworzyć kompleksy z PCNA1 oraz PCNA2, w jakich przedziałach komórkowych występują te kompleksy i wykazano różnice w odległościach pomiędzy partnerami białkowymi w przypadku wybranych par kompleksów.

Rezultaty badań eksperymentalnych przedstawionych jako moje osiągnięcie naukowe opisano w czterech pracach opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Stanowią one wstęp do określenia szczegółowych funkcji białek PCNA w komórce roślinnej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Poza moimi pracami wymienionymi w części przedstawiającej osiągnięcie wynikające 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.) jestem współautorem 21 prac (w tym 1 pracy przeglądowej) opublikowanych w czasopiśmie indeksowanych przez bazę JCR, 1 pracy eksperymentalnej opublikowanej w czasopiśmie które nie jest indeksowane przez bazę JCR, 1 artykułu popularno-naukowego i 3 patentów. Poniżej omówiono skrótowo pozostałe prace badawcze, w tym powstałe w ramach zakończonych oraz realizowanych obecnie projektów.

Prace wpisujące się w tematykę badań PCNA.

Pierwsza praca opublikowana w roku 2007 dotyczyła klonowania cDNA kodującego białko PCNA fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) oraz analizy ekspresji PCNA na poziomie

białka (Strzałka i Ziemiłowicz, 2007). W omawianej publikacji po raz pierwszy przedstawiono sekwencję cDNA kodującą białko PCNA *P. vulgaris* o długości 265 aminokwasów. Analizując poziom białka PCNA zaobserwowano, iż jego ilość była zależna zarówno od etapu rozwoju rośliny jak i od typu badanego organu.

W kolejnej pracy opisano badania, które doprowadziły do identyfikacji genów *PCNA1* i *PCNA-like1* fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus*) (Strzałka i in., 2010). Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że zarówno organizacja opisanych genów jak i ich wzór ekspresji były podobne. Sekwencje aminokwasowe domniemyanych białek kodowanych przez geny *PCNA1* i *PCNA-like1* były w 54% identyczne. Analiza biochemiczna białek kodowanych przez zidentyfikowane geny wykazała, że białko PCNA1 w przeciwieństwie do PCNA-like1 charakteryzowało się właściwościami typowymi dla PCNA, w tym tworzyło homotrimer oraz stymulowało aktywność ludzkiej polimerazy DNA typu delta. Natomiast białko PCNA-like1 występowało w formie monomeru niezdolnego do tworzenia heterotrimeru z białkiem PCNA1. Pomimo podejmowanych prób do tej pory nie udało się ustalić funkcji białka PCNA-like1.

W roku 2013 opublikowane zostały wyniki badań analizy kompleksów białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis* w komórkach roślinnych (Strzałka i Aggarwal, 2013). Wskazały one na możliwość formowania kompleksów PCNA1/PCNA2 *in planta*. Uzyskany wynik wspiera rezultaty zaprezentowane we wcześniejszej pracy eksperymentalnej (Strzałka i in., 2009) poświęconej analizie strukturalnej białek PCNA *Arabidopsis*. Wskazuje on bowiem, iż tworzenie heterotrimerów PCNA1/PCNA2 w komórkach roślinnych jest wysoce prawdopodobne.

W roku 2015 ukazała się publikacja, która jest efektem mojej współpracy z Instytutem Fizyki, Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Dotyczy ona analizy właściwości biofizycznych ludzkiego białka PCNA metodą dynamiki molekularnej. W omawianej pracy wykazano, że prawdopodobieństwo otwarcia pierścienia PCNA (czyli utraty kontaktu pomiędzy wybranymi powierzchniami monomerów PCNA wchodzących w skład homotrimeru), do którego dochodzi podczas umieszczania PCNA na dwuniciowym DNA, jest większe od prawdopodobieństwa zerwania kontaktu pomiędzy domenami budującymi monomer PCNA (Rydzewski i in., 2015).

1. **Strzałka W.**, Ziemiłowicz A. Molecular cloning of *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding proliferating cell nuclear antigen. (2007), J. Plant Physiol. 164:209-213
2. **Strzałka W.**, Kaczmarek A., Naganowska B. Ziemiłowicz A. Identification and functional analysis of PCNA1 and PCNA-like1 genes of *Phaseolus coccineus*. (2010), J. Exp. Bot. 61: 873–888.
3. **Strzałka W.**, Aggarwal C. *Arabidopsis thaliana* Proliferating Cell Nuclear Antigen 1 and 2 possibly form homo- and hetero-trimeric complexes in the plant cell. Invited manuscript. (2013), Plant Sign. & Behavior. 7 (8) e24837.1-e24837.3
4. Rydzewski J., **Strzałka W.**, Nowak W. Nanomechanics of PCNA: A protein-made DNA sliding clamp. (2015), Chem. Phys. Lett. 634:236–242.

Prace związane z tematyką aptamerów DNA.

Możliwości zastosowania aptamerów DNA, czyli krótkich jednoniciowych sekwencji DNA (ssDNA), w biotechnologii są intensywnie eksplorowane przez ośrodki uniwersyteckie oraz

firmy biotechnologiczne. Po uzyskaniu tytułu doktora, poza kontynuacją badań nad roślinnym PCNA, zaangażowałem się w rozwijanie drugiego nurtu badań, poświęconego pracom badawczo-rozwojowym, dotyczącym aplikacyjnego wykorzystania aptamerów DNA. Uzyskane dotychczas wyniki zostały zaprezentowane m.in. w formie pięciu publikacji eksperymentalnych.

W pierwszej z opublikowanych prac przedstawiono wyniki analizy wpływu wybranych ziół chromatograficznych (wytypowanych na podstawie ich własności), stosowanych do unieruchamiania białek rekombinowanych z metką heksahistydynową (His), na wydajność selekcji aptamerów DNA. Badania te były inspirowane faktem stosowania takich ziół do unieruchamiania celów molekularnych, posiadających metkę His, podczas selekcji aptamerów. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wykazano, iż zarówno rodzaj jonu metalu, służący wiązaniu metki His do złoża chromatograficznego, jak i rodzaj matrycy mogą mieć kluczowy wpływ na ostateczny rezultat procesu selekcji aptamerów DNA (Kowalska i in., 2014).



Rezultaty badań opisane w drugiej pracy, dotyczyły wykorzystania aptameru DNA jako elementu systemu chromatografii powinowactwa służącego do oczyszczania białek rekombinowanych z metką His. Kierowana przeze mnie grupa opracowała aptamer DNA specyficznie i odwracalnie wiążący metkę His (Bartnicki i in., 2015). Selekcja aptameru DNA, do której wykorzystano syntetyczną bibliotekę aptamerów DNA (pulę wielu różnych cząsteczek ssDNA), została przeprowadzona według ściśle zaplanowanej strategii, w celu uzyskania cząsteczki ssDNA charakteryzującej się określonymi cechami, m.in. możliwością regulowania jej wiązania z białkami posiadającymi metkę His bez konieczności stosowania imidazolu. W rezultacie zidentyfikowano aptamer DNA, który umożliwia uzyskiwanie z mieszaniny białek komórkowych *E. coli*, czystego preparatu białka rekombinowanego posiadającego metkę His zbudowaną z zaledwie trzech reszt histydyny (3xHis). Zgodnie z przyjętymi założeniami oddziaływanie aptameru DNA z metką 3xHis może być regulowane stężeniem jonów sodu. Oznacza to, że w przypadku oczyszczania białka z metką 3xHis przy pomocy złoża zawierającego opracowany aptamer może ono zostać odzyskane ze złoża albo w wyniku zastosowania odpowiedniego stężenia imidazolu albo poprzez zastosowanie buforu elucyjnego pozbawionego jonów soli. Trzecia publikacja, wpisująca się w tematykę aplikacyjnego zastosowania aptamerów DNA, dotyczy opracowanego przez moją grupę nowatorskiego układu chromatograficznego, któremu autorzy nadali nazwę *Argi* system (Bartnicki i in., 2017). Układ ten oparty jest na specyficznym oddziaływaniu pomiędzy aptamerem DNA a krótką metką peptydową bogatą w reszty argininy i służy do oczyszczania białek rekombinowanych. Opracowany układ został zoptymalizowany w sposób umożliwiający jego komercjalizację. Przeprowadzone prace eksperymentalne potwierdziły możliwość wykorzystania systemu *Argi* m.in. do oczyszczania białek z metką TAT₄₉₋₅₇ oraz 8xArg. Metki te mają szczególne znaczenie w badaniach naukowych. Dzięki swoim właściwościom, umożliwiającym penetrację błony komórkowej, są one wykorzystywane do wprowadzania m.in. przyłączonych do nich peptydów lub białek do wnętrza komórek.

Czwarta publikacja w powyższym obszarze tematycznym dotyczy badań nad aptamerem DNA wiążącym toksynę muchomora sromotnikowego - α -amanitynę. Jest ona jedną z głównych toksyn tego muchomora i spożyta przez człowieka może doprowadzić do śmiertelnego zatrucia (Ferenc i in., 2009). Długofalowym zamysłem autorów jest weryfikacja hipotezy postulującej, iż aptamer DNA wiążący specyficznie α -amanitynę może blokować jej hepatotoksyczność, stanowiąc antidotum dla osób, które spożyły muchomora sromotnikowego. W omawianej pracy zaprezentowano wstępne dane eksperymentalne,

potwierdzające możliwość uzyskania aptameru DNA, wiążącego specyficznie α -amanitynę (Muszyńska i in., 2017). Jednak pełna weryfikacja opisanej powyżej hipotezy wymaga dalszych badań.

Kolejna, piąta publikacja obejmuje wyniki badań dotyczące możliwości wykorzystania aptameru DNA, skierowanego przeciwko ludzkiemu białku PCNA, jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego (Kowalska i in., 2017). Jak wspomniano wcześniej, PCNA jest kluczowym białkiem jądrowym każdej dzielącej się komórki eukariotycznej, bez którego replikacja genomowego DNA nie jest możliwa. Jest ono również zaangażowane w procesy naprawy uszkodzonego DNA. Z tych powodów PCNA zostało wytypowane jako nieonkogeniczny cel terapii przeciwnowotworowej (Stoimenov i Hellady, 2009; Wang, 2014; Nagel i in., 2016). Jedną z strategii terapii przeciwnowotworowych, celujących w zablokowanie replikacji lub naprawy DNA w komórkach nowotworowych, opiera się na zastosowaniu cząsteczek blokujących wiązanie pomiędzy PCNA a białkami oddziałującymi z PCNA (Wang 2014). Obecnie znane są wyniki badań w których podejmowano próby zablokowania funkcji PCNA z wykorzystaniem niewielkich cząsteczek chemicznych (Punchihewa i in., 2012) oraz peptydów (Gu i in., 2014; Smith i In., 2015). Jednak w okresie w którym rozpoczynałem badania nad aptamerem anty-PCNA, niskocząsteczkowe inhibitory oddziaływania PCNA-partner białkowy nie były znane. W badaniach, przeprowadzonych pod moim kierownictwem, uzyskano aptamer DNA specyficznie wiążący ludzkie białko PCNA. Następnie kompleks aptamer anty-PCNA/PCNA poddano analizom biochemicznym, w tym wyznaczono wartość stałej dysocjacji oraz stechiometrię wiązania. Stwierdzono także, że aptamer anty-PCNA po związaniu do PCNA najprawdopodobniej zmienia swoją strukturę przestrzenną. W kolejnym etapie badań zademonstrowano, że opracowany aptamer efektywnie hamuje aktywność zarówno polimerazy DNA typu delta jak i epsilon. Wartość IC_{50} (ang. half maximal inhibitory concentration) aptameru anty-PCNA względem ludzkiej polimerazy DNA typu delta oraz epsilon mieści się w zakresie nM stężeń. Szczegółowa analiza mechanizmu działania aptameru anty-PCNA wykazała, że nie pełni on funkcji matrycowego DNA dla kompleksu PCNA/polimeraza DNA. Ponadto, uzyskane dane zademonstrowały, że aptamer anty-PCNA nie blokuje formowania kompleksu PCNA z polimerazą DNA lecz jest jego częścią. Ostatecznie na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż opisany aptamer jest inhibitorem kompetycyjnym kompleksu PCNA/polimeraza DNA. Utworzenie kompleksu aptamer anty-PCNA/PCNA/polimeraza DNA blokuje możliwość wiązania matrycy DNA do kompleksu PCNA/polimeraza DNA. Opisany mechanizm zahamowania replikacji DNA, zależny od kompleksu anty-PCNA aptamer/PCNA, jest unikatowy i stanowi nową możliwość blokowania proliferacji komórek. Niewykluczone, iż w przyszłości może on być podstawą nowej strategii walki z nowotworami.

1. Kowalska E., Bartnicki F., Pels K., **Strzałka W.**✉. The impact of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resins on DNA aptamer selection. (2014), *Anal. Bioanal. Chem.* 406(22): 5495–5499.
2. Bartnicki F., Kowalska E., Pels K., **Strzałka W.**✉. Imidazole-free purification of His3-tagged recombinant proteins using ssDNA aptamer-based affinity chromatography. (2015), *J. Chrom. A.* 1418:130-9.
3. Bartnicki F., Bonarek P., Kowalska E., **Strzałka W.**✉. The Argi system: one-step purification of proteins tagged with arginine-rich cell-penetrating peptides. (2017), *Sci. Rep.* 7, 2619.

4. Muszyńska K., Ostrowska D., Bartnicki F., Kowalska E., Bodaszewska-Lubaś M., Hermanowicz P., Faulstich H., **Strzałka W.** . Selection and analysis of a DNA aptamer binding α -amanitin from *Amanita phalloides*. (2017), Acta Biochim. Pol. doi:10.18388/abp.2017_1615.
5. Kowalska E., Bartnicki F., Fujisawa R., Bonarek P., Hermanowicz P., Tsurimoto T., Muszynska K., **Strzałka W.** . Inhibition of DNA replication by an anti-PCNA aptamer/PCNA complex. (2017), Nucleic Acids Res. doi:10.1093/nar/gkx1184.

Prace dotyczące regulacji procesów fotosyntezy i odpowiedzi roślin na uszkodzenia DNA.

Pracując na WBBiB UJ podjąłem współpracę z pracownikami Zakładu Biochemii i Fizjologii Roślin oraz Zakładu Biotechnologii Roślin WBBiB dotyczącą badań różnych aspektów procesu fotosyntezy. W pierwszej pracy opublikowanej w roku 2009 (Nowicka i in., 2009) scharakteryzowano transgeniczną linię *Arabidopsis thaliana* z częściowo upośledzoną aktywnością epoksydazy zeaksantyny (ZE). W badanej linii *Arabidopsis* z wstawionym fragmentem cDNA kodującym otwartą ramkę odczytu ZE nie zaobserwowano zwiększonej ilości transkryptu kodującego to białko w porównaniu do roślin typu dzikiego. Zaobserwowano jednak upośledzoną aktywność ZE, co miało wpływ na zmianę profilu barwników ksantofilowych. U roślin transgenicznych, adaptowanych do ciemności poziom wiolaksantyny i neoksantyny był niższy, a poziom anteraksantyny i zeaksantyny był znacząco wyższy w porównaniu do roślin typu dzikiego. Co więcej, w roślinach transgenicznych zaobserwowano także produkt epoksydacji luteiny. Analiza barwników cyklu ksantofilowego w transgenicznej linii *Arabidopsis* eksponowanej na światło wykazała minimalną zmianę poziomu wiolaksantyny natomiast znaczący wzrost konwersji anteraksantyny do zeaksantyny. Brak epoksydacji zeaksantyny wskazywał na zaburzenie funkcjonowania cyklu ksantofilowego w badanej roślinie transgenicznej. Na podstawie analizy pomiarów fluorescencji chlorofilu wykazano, że szybkość transportu elektronów w badanej linii transgenicznej eksponowanej na silne światło była podobna jak w przypadku mutantu *npq2* (ang. non-photochemical quenching 2) *Arabidopsis* z upośledzoną funkcją ZE.

W roku 2013 ukazała się praca w której zaprezentowano możliwość nadekspresji i oczyszczenia z komórek *E. coli* deepoksydazy VDE oraz VDL2 *Phaeodactylum tricornutum* (Bojko i in., 2013). W omawianej publikacji zaprezentowano wyniki analizy aktywności obydwóch enzymów w stosunku do substratu jakim była wiolaksantyna.

Kolejna praca, której jestem współautorem została poświęcona enzymowi roślinnemu, który określany jest jako światło-zależna oksydoreduktaza protochlorofilidu (POR) (Gabruk i in., 2015). W ramach prowadzonych badań zrekonstruowano kompleks fotoaktywny protochlorofilid/POR/NADPH, wykorzystując do tego celu rekombinowane białka *Arabidopsis* POR A, POR B lub POR C. Analizując kinetykę fotoredukcji protochlorofilidu w temperaturze pokojowej nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy POR A, B i C. Co ciekawe, zaobserwowano natomiast mniejszą wydajność tworzenia chlorofilidu dla POR C w stosunku do POR A i B, gdy mieszaninę reakcyjną preinkubowano w ciemności, a następnie naświetlano przez krótki czas. Inną z kluczowych obserwacji odnotowaną podczas prowadzonych badań było podobieństwo pomiędzy maksimum fluorescencji zarejestrowanym dla kompleksu protochlorofilid/POR/NADPH (w temperaturze 77 K) i dla mocno zagregowanych kompleksów protochlorofilid/POR/NADPH występujących w ciałach prolamellarnych *in vivo*.

W roku 2016 ukazała się publikacja w której zaprezentowano dane porównujące wpływu impulsów światła na relokację chloroplastów u *Arabidopsis* typu dzikiego oraz roślin z mutacją fototropiny 1, fototropiny 2 (receptory światła niebieskiego u roślin) lub podjednostki A fosfatazy 2A (PP2A) (Sztatelman i in., 2016). Przeprowadzone analizy ujawniły różnice w ruchach chloroplastów w odpowiedzi na impulsy światła niebieskiego, pomiędzy mutantami fototropinowymi (*phot1* i *phot2*) a roślinami typu dzikiego. Jednym z istotnych osiągnięć zaprezentowanym w powyższej pracy było wykazanie, iż fototropina 1 i 2 mogą tworzyć homo i heterokompleksy w komórce roślinnej.

W roku 2017 opublikowana została praca opisująca i) wpływ światła na ekspresję fotolizazy *Arabidopsis* kodowanej przez gen *UVR3* oraz ii) lokalizację subkomórkową tej fotolizazy. Fotolizazy są enzymami, które wykorzystując energię światła niebieskiego/UVA bezpośrednio naprawiają dimery pirymidynowe w DNA. W omawianej pracy pokazano, że światło UVB nie wpływa na poziom transkryptu *UVR3*, natomiast światło widzialne (w tym niebieskie i czerwone) obniżało jego poziom w sposób zależny od fotosyntezy. Wykorzystanie serii mutantów fotoreceptorowych dostarczyło zaskakujących wyników. Stwierdzono, że w dorosłych liściach *Arabidopsis* aktywowany światłem czerwonym fitochrom A, przy braku fitochromu B, modulował sygnał od chloroplastów prowadzący do spadku mRNA *UVR3*. Stosując transformację przejściową liści tytoniu konstruktem kodującym białko fuzyjne *UVR3*-GFP pokazano, że białko to lokalizuje się we wszystkich trzech przedziałach komórkowych zawierających DNA: w jądrach, chloroplastach oraz mitochondriach. Szczegółowa analiza lokalizacji *UVR3* w jądrze komórkowym wykazała jego jednorodne rozmieszczenie w obszarze nukleoplazmy oraz wyraźniejsze wybarwienie jąderka. Badania z wykorzystaniem mutein białka *UVR3* oraz jego skróconych fragmentów pozwoliły na stwierdzenie, że za jego efektywny transport do chloroplastów i mitochondriów oraz retencję wewnątrz jąderka odpowiedzialne są aminokwasy zlokalizowane w obrębie C-końcowej helisy.

1. Nowicka B., **Strzałka W.**, Strzałka K. New transgenic line of *Arabidopsis thaliana* with partly disabled zeaxanthin epoxidase activity displays changed carotenoid composition, xanthophyll cycle activity and nonphotochemical quenching kinetics. (2009), J. Plant Physiol. 166: 1045-56.
2. Bojko M., Olchawa-Pajor M, Tuleja M., Kuczyńska P., **Strzałka W.**, Latowski D., Strzałka K. Expression of three diadinoxanthin de-epoxidase genes of *Phaeodactylum tricoratum* in *Escherichia coli* Origami b and BL21 strain. (2013), Acta Biochim. Pol. 60(4):857-860.
3. Gabruk M., Stecka A., **Strzałka W.**, Kruk J., Strzałka K., Mysliwa-Kurdziel B. Photoactive Protochlorophyllide-Enzyme Complexes Reconstituted with PORA, PORB and PORC Proteins of *A. thaliana*: Fluorescence and Catalytic Properties. (2015), Plos One 10(2): e0116990.
4. Sztatelman O., Łabuz J., Hermanowicz P., Banaś A.K., Bażant A., Zglobicki P., Aggarwal C, Nadziejka M., Krzeszowiec W., **Strzałka W.**, Gabryś H. Fine tuning chloroplast movements through physical interactions between phototropins. (2016), J. Exp. Bot., 67 (17): 4963-4978.
5. Banaś A.K., Hermanowicz P., Sztatelman O., Łabuz J., Aggarwal C., Zglobicki P., Jagiełło-Flasińska D., **Strzałka W.** 6,4 - PP photolyase encoded by *AtUVR3* is localized in

nuclei, chloroplasts and mitochondria and its expression is down-regulated by light in a photosynthesis-dependent manner. (2017), *Plant and Cell Physiol.*, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx159>.

Pozostałe prace:

W roku 2003 ukazała się publikacja, będąca m.in. rezultatem mojej pracy magisterskiej, opisująca nową metodę typowania szczepów *Staphylococcus aureus* (Sabat i in., 2003). Zademonstrowano w niej, że typowanie szczepów gronkowca złocistego opornych na metycylinę na podstawie analizy długości tandemowo powtarzających się sekwencji repetytywnych locus *sdr*, *clfA*, *clfB*, *ssp* i *spa* daje rezultaty porównywalne do wyników uzyskiwanych przy użyciu metody elektroforezy pulsowej (EP). Co ważne, zaletą opisanej metody jest znacznie krótszy czas oczekiwania na wyniki w porównaniu do EP.

Współpraca z prof. Martą Mizianty (Instytut Botaniki Państwowej Akademii Nauk) oraz dr Markiem Szklarczykiem (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie), rozpoczęta w roku 2003 zaowocowała publikacją opisującą badania zmienności populacyjnej *Elymus caninus* oraz *Hordelymus europaeus* z użyciem metody AFLP (Bieniek i in., 2005).

W roku 2014 nawiązałem współpracę z dr hab. Dariuszem Dzigą (WBBiB UJ), której wynikiem jest wspólna publikacja dotycząca analizy produktów degradacji toksyn sinicowych (mikrocystyn) przy udziale enzymów MlrA, MlrB i MlrC *Sphingomonas* sp. ACM-3692 (Dziga i in., 2016). Ważnym odkryciem zaprezentowanym w powyższej pracy jest m.in. opisanie nowego półproduktu degradacji mikrocystyny. Wykazano, iż zaobserwowany półprodukt jest heksapeptydem i powstaje na skutek działania enzymu MlrC. Potwierdzono również udział enzymów MlrA i MlrB w degradacji wykrytego heksapeptydu oraz zaproponowano uaktualniony model opisujący biochemiczny szlak biodegradacji mikrocystyny.

1. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., **Strzałka W.**, Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W., Travis J., Potempa. J. A new method for typing of *Staphylococcus aureus* strains: Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. (2003), *J. Clin. Microbiol.* 41(4):1801-4.
2. Mizianty M., Bieniek W., Czech A., **Strzałka W.**, Szklarczyk M. Variability and structure of natural populations of *Elymus caninus* (L.) L. and their possible relationship with *Hordelymus europaeus* (L.) Jess. ex Harz as revealed by AFLP analysis. (2005), *Plant Systematics and Evolution.* 256:193-200.
3. Dziga, D., Zielinska G., Wladyka B., Bochenska O., Maksylewicz A., **Strzałka W.**, Meriluoto J. Characterization of Enzymatic Activity of MlrB and MlrC Proteins Involved in Bacterial Degradation of Cyanotoxins Microcystins. (2016), *Toxins*, 16;8(3).

Prace przeglądowe

W pracy przeglądowej opublikowanej na zaproszenie redakcji *Annales of Botany* przedstawiono aktualną wiedzę na temat PCNA ze szczególnym uwzględnieniem informacji dotyczących roślinnego PCNA. Dodatkowo w pracy umieszczono informacje na temat własności strukturalnych i biochemicznych białka PCNA uzupełnione o dane na temat genów *PCNA* i ich ekspresji. W części poświęconej funkcji PCNA w procesie replikacji DNA wyjaśniono dlaczego białko to jest kluczowe dla tego procesu. Ponadto, przedstawiono rolę PCNA w procesie określanym jako synteza DNA pomimo zaistniałego uszkodzenia, w który zaangażowane są polimerazy typu TLS. Kolejna część pracy przeglądowej poświęcona jest

roli PCNA w naprawie DNA przez wycięcie uszkodzonej zasady (ang. base excision repair), uszkodzonego nukleotydu (ang. nucleotide excision repair) oraz w naprawie błędnie sparowanych zasad (ang. mismatch repair). Kolejne dwa poruszone aspekty to zaangażowanie PCNA w kontrolę cyklu komórkowego oraz funkcja modyfikacji potranslacyjnych tego białka – sumoilacji i ubikwitynacji.

1. **Strzałka W.**, Ziemięnowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. (invited review). (2011), *Ann. Bot.* 107: 1127-1140.

Artykuły popularyzatorskie

W ramach działalności popularyzatorskiej przygotowałem artykuł przybliżający czytelnikom czasopisma *Wszechświat* roślinę *Arabidopsis thaliana*. Artykuł ten dostarcza m.in. informacji na temat przyczyn dla których rzodkiewnik pospolity uzyskał status rośliny modelowej wykorzystywanej w badaniach naukowych. Przytoczono także przykłady jej wykorzystania w nauce.

1. Gorska-Andrzejak J. , Grzmil P., Labocha-Derkowska M., Rutkowska J., **Strzałka W.**, Tomala K., Wloch-Salamon D. Poczec modelowych organizmów badawczych. (2016). *Wszechświat*, t. 117: nr 07-09.

Podsumowanie

Badania przedstawione jako moje osiągnięcie naukowe dotyczą analizy białek PCNA1 i PCNA2 *Arabidopsis* oraz ich kompleksów tworzonych z innymi białkami. Prace zespołu którym obecnie kieruję są rozwinięciem dotychczas prowadzonych badań i dotyczą analizy funkcji roślinnych kinaz cykliczozależnych. Tematem mojego drugiego nurtu badawczego, stanowiącego obecnie jeden z tematów przewodnich realizowanych w Zakładzie Biotechnologii Roślin WBBiB UJ, są zagadnienia dotyczące zastosowania aptamerów DNA w biotechnologii i medycynie. Dodatkowo, w ramach współpracy naukowej uczestniczę w realizacji projektów badawczych dotyczących różnych aspektów procesu fotosyntezy.

Podsumowując, mój dorobek naukowy obejmuje:

- 21 artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej łączny IF:81,086.
- 1 pracy eksperymentalnej opublikowanej w czasopiśmie które nie jest indeksowane przez bazę JCR.
- h-index: 9, cytowania – 435, bez autocytowań 378.
- 1 artykuł popularno-naukowy.
- Wygłoszenie 1 wykładu na zaproszenie Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.
- Wygłoszenie 1 referatu na konferencji tematycznej.
- Wygłaszanie cyklicznego wykładu w ramach „Spotkanie w samo południe z biochemią, biofizyką i biotechnologią” dotyczącego roślin transgenicznych.
- Współautorstwo 2 referatów wygłoszonych na konferencji tematycznej.
- Współautorstwo 51 posterów prezentowanych na konferencjach tematycznych.
- Wypromowanie 4 prac magisterskich i 3 prac licencjackich.

- Wykonanie 6 recenzji artykułów naukowych dla 6 czasopism znajdujących się na liście filadelfijskiej na zaproszenie Redakcji.
- Współautor 3 patentów.

Literatura

1. Anderson H.J., Vonarx E.J., Pastushok L., Nakagawa M., Katafuchi A., Gruz P., Di Rubbo, A., Grice D.M., Osmond M.J., Sakamoto A.N., Nohmi T., Xiao W. and Kunz A.B. Arabidopsis thaliana Y-family DNA polymerase eta catalyses translesion synthesis and interacts functionally with PCNA2. (2008), Plant J. 55: 895–908.
2. Bartnicki F., Kowalska E., Pels K., Strzałka W. Imidazole-free purification of His3-tagged recombinant proteins using ssDNA aptamer-based affinity chromatography. (2015). J. Chrom. A. 1418:130-9.
3. Bartnicki F., Bonarek P., Kowalska E., Strzałka W. The Argi system: one-step purification of proteins tagged with arginine-rich cell-penetrating peptides. (2017). Sci. Rep. 7, 2619.
4. Becerril N., Martínez M. A., García E., Vazquez-Ramos J. M. Chromatin bound PCNA is complexed with cell cycle protein regulators as determined by chromatin immunoprecipitation. (2012), J. Mex. Chem. Soc. 56: 10–14.
5. Bergink S., Jentch S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. (2009), Nature 458: 461–467.
6. Boruc J., den Daele H.V., Hollunder J., Rombauts S., Mylle E., Hilson P., i in. Functional modules in the Arabidopsis core cell cycle binary protein–protein interaction network. (2010), Plant Cell 22: 1264–1280.
7. Bravo R., Celis J.E. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. (1980), J. Cell Biol. 84: 795–802.
8. Bravo R., Frank R., Blundell P.A., Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. (1987), Nature 326: 515-7.
9. Buendia-Monreal M., Renteria-Canett I., Guerrero-Andrade O., Bravo-Alberto C.E., Martinez-Castilla L.P., Garcia E., I in. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. (2011), Physiol. Plantarum. 143,297–308.
10. Burkovics P., Sebesta M., Sisakova A., Plautt N., Szukacsov V., Robert T., Pinter L., Marini V., Kolesar P., Haracska L., Gangloff S., Krejci L. Srs2 mediates PCNA-SUMO-dependent inhibition of DNA repair synthesis. (2013), EMBO J. 32: 742–755.
11. Das-Bradoo S., Nguyen H.D., Wood J.L., Ricke M., Haworth J. C., Bielinsky A-K. Defects in DNA Ligase I Trigger PCNA Ubiquitination at Lysine 107. (2010), Nat. Cell Biol. 12: 74–20.
12. Ferenc T., Lukasiewicz B., Cieciewicz J. Zatrucia muchomorem sromotnikowym (*Amanita phalloides*). (2009), Medycyna pracy 60: 415–426.
13. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? (2004), Genes Dev. 18: 2046-2059.

14. Goodman M.F., Woodgate R. Translesion DNA Polymerases. (2013), Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5:a010363
15. Gu L., Smith S., Li C., Hickey R.J., Stark J.M., i in. (2014) A PCNA-derived cell permeable peptide selectively inhibits neuroblastoma cell growth. PLoS ONE 9(4): e94773.
16. Gulbis J.M., Kelman Z., Hurwitz J., O'Donnell M., Kuriyan J. Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. (1996), Cell 87: 297-306.
17. Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system. (1998), Annu. Rev. Biochem. 67: 425–479.
18. Hoeghe C., Pfander B., Moldovan G.L., Pyrowolakis G., Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. (2002), Nature 419: 135-41.
19. Kono A., Umeda-Hara C., Adachi S., Nagata N., Konomi M., Nakagawa T., i in. The Arabidopsis D-type cyclin CYCD4 controls cell division in the stomatal lineage of the hypocotyl epidermis. (2007), Plant Cell 19:1265–1277.
20. Kowalska E., Bartnicki F., Pels K., Strzałka W. The impact of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) resins on DNA aptamer selection. (2014), Anal. Bioanal. Chem. 406: 5495–5499.
21. Kowalska E., Bartnicki F., Fujisawa R., Bonarek P., Hermanowicz P., Tsurimoto T., Muszynska K., Strzałka W. Inhibition of DNA replication by an anti-PCNA aptamer/PCNA complex. (2017), Nucleic Acids Res. doi:10.1093/nar/gkx1184.
22. Lange S.S., Takata K-i. Wood R.D. DNA polymerases and cancer. (2011), Nat Rev Cancer. 11: 96–110.
23. Lee K.Y., Myung K. PCNA modifications for regulation of postreplication repair pathways. (2008), Mol. Cells 26, 5–11.
24. Maga G., Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. (2003), J. Cell. Sci. 116: 3051-60.
25. Mathews M.B., Bernstein R.M., Franza B.R., Garrels J.I. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. (1984), Nature 309: 374-6.
26. Mazzucotelli E., Belloni S., Marone D., De Leonardis A.M., Guerra D., Di Fonzo N., Cattivelli L., Mastrangelo A.M. The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. (2006), Curr. Genomics. 7: 509–522.
27. Miyachi K., Fritzler M.J., Tan E.M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. (1978), J. Immunol. 121: 2228–2234.
28. Moldovan G-L., Pfander B., Jentsch S. PCNA Controls Establishment of Sister Chromatid Cohesion during S Phase. (2006), Mol. Cell 23: 723–732.
29. Muszyńska K., Ostrowska D., Bartnicki F., Kowalska E., Bodaszewska-Lubaś M., Hermanowicz P., Faulstich H., Strzałka W. Selection and analysis of a DNA aptamer binding α -amanitin from *Amanita phalloides*. (2017), Acta Biochim. Pol. doi:10.18388/abp.2017_1615.

30. Nagel, R., Semenova, E.A., Berns, A. Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. (2016), *EMBO Rep.* 17: 1516-1531.
31. Novatchkova M., Budhiraja R., Coupland G., Eisenhaber F., Bachmair A. SUMO conjugation in plants. (2004), *Planta* 220: 1–8.
32. Ortega J., Li J.Y., Lee S., Tong D., Gu L., Li G.M. Phosphorylation of PCNA by EGFR inhibits mismatch repair and promotes misincorporation during DNA synthesis. (2015), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112: 5667-72.
33. Parker J.L., Bucceri A., Davies A.A., Heidrich K., Windecker H., Ulrich H.D. SUMO modification of PCNA is controlled by DNA. (2008), *EMBO J.* 27:2422-2431.
34. Parker J.L., Ulrich H.D. A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards SUMO-modified PCNA. (2012), *Nucleic Acids Res.* 40:11380-11388.
35. Pfander B., Moldovan G.L., Sacher M., Hoegge C., Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. (2005), *Nature* 436: 428-33.
36. Punchihewa C., Inoue A., Hishiki A., Fujikawa Y., Connelly M., Evison B., Shao Y., Heath R., Kuraoka I., Rodrigues P. i in. Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication. (2012), *J. Biol. Chem.* 287: 14289-14300.
37. Smith S.J., Gu L., Phipps E.A., Dobrolecki L.E., Mabrey K.S. in. (2015). A peptide mimicking a region in proliferating cell nuclear antigen specific to key protein interactions is cytotoxic to breast cancer. *Mol Pharmacol.* 87(2): 263–276.
38. Stoimenov I., Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer. (2009), *Biochem. Soc. Trans.*, 37: 605-613.
39. Strzałka W., Ziemienowicz A. Molecular cloning of *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding proliferating cell nuclear antigen. (2007), *J. Plant Physiol.* 164:209-213
40. Strzałka W., Kaczmarek A., Naganowska B. Ziemienowicz A. Identification and functional analysis of PCNA1 and PCNA-like1 genes of *Phaseolus coccineus*. (2010), *J. Exp. Bot.* 61: 873–888.
41. Strzałka W., Oyama T., Tori K., Morikawa K. Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. (2009), *Prot. Sci.* 18:1072-1080.
42. Strzałka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. (2011), *Ann. Bot.* 107: 127–1140.
43. Strzałka W., Labecki P., Bartnicki F., Aggarwal C., Rapala-Kozik M, Tani C., Tanaka K., Gabrys H. *Arabidopsis thaliana* Proliferating Cell Nuclear Antigen has several potential sumoylation sites. (2012), *J. Exp. Bot.* 63: 2971-2983.
44. Strzałka W., Bartnicki F., Pels K., Jakubowska A., Tsurimoto T., Tanaka K. RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen. (2013), *J. Exp. Bot.* 64:859-869.

45. Strzałka W., Aggarwal C., Krzeszowiec W., Jakubowska A., Sztatelman O., Banas A.K. Arabidopsis PCNAs form complexes with selected D-type cyclins. (2015), *Front. Plant Sci.* 6:516.
46. Sun L., Chen Z.J. The novel functions of ubiquitination in signaling. (2004), *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 119–126.
47. Tan C.K., Castillo C., So A.G., Downey K.M. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. (1986), *J. Biol. Chem.* 261: 12310-6.
48. Tomanov K., Zeschmann A., Hermkes R., Eifler K., Ziba I., Grieco M., Novatchkova M., Hofmann K., Hesse H., Bachmair A. Arabidopsis PIAL1 and 2 Promote SUMO Chain Formation as E4-Type SUMO Ligases and Are Involved in Stress Responses and Sulfur Metabolism. (2014), *Plant Cell* 26: 4547–4560.
49. Tsurimoto T. PCNA, a multifunctional ring on DNA. (1998), *Biochim. Biophys. Acta* 1443: 23-39.
50. Wang G., Kong H., Sun Y., Zhang X., Zhang W., Altman N., i in. Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. (2004), *Plant Physiol.* 135:1084–1099.
51. Wang S.C. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? (2014), *Trends Pharmacol. Sci.* 35: 178-186.
52. Xiong Y., Zhang H., Beach D. D-type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. (1992), *Cell* 30: 505–514.

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie. W przypadku, gdy praca zbiorowa ma więcej niż pięciu współautorów, habilitant załącza oświadczenie określające jego indywidualny wkład w powstanie tej pracy oraz oświadczenia co najmniej czterech pozostałych współautorów.



Dr Wojciech Strzałka data