INSTITUTE OF
BIOCHEMISTRY
AND BIOPHYSICS
POLISH ACADEMY
OF SCIENCES
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, Poland

Warszawa, 29.03.2018

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO ORAZ OCENA ISTOTNEJ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ Pana dr Wojciecha Strzałki w postępowaniu habilitacyjnym

Do oceny przedstawiono następujące materiały:
1. Autoreferat w języku polskim i angielskim, do którego dołączono:
- wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą postępowania habilitacyjnego oraz krótkie omówienia celu i wyników badań tych prac,
- opis udziału i wkładu Habilitanta w powstawaniu przedstawionych prac oraz ich naukometryczne parametry,
- listę pozostałych prac niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego, przedstawionego do postępowania habilitacyjnego oraz krótkie ich omówienia.
- informacje o dotychczasowym zatrudnieniu i otrzymanych stopniach naukowych,
- wykaz prezentowanych wykładów,
- listę nagród i wyróżnień,
- listę projektów naukowych, w których Habilitant był kierownikiem, lub brał udział,
2. Ponadto załączono:
- publikacje naukowe,
- oświadczenia współautorów publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe,
- opis dorobku dydaktycznego.
Przygotowane dokumenty spełniają formalne wymogi zawarte w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Jako osiągniecie naukowe przedstawiono cztery publikacje z lat 2009-2015, o łącznym współczynniku oddziaływania (*ang.* Impact Factor) 18,5 pod tytułem **„Charakterystyka roślinnych białek PCNA1 i PCNA2 oraz ich kompleksów tworzonych z innymi białkami z wykorzystaniem modelu doświadczalnego *Arabidopsis thaliana*"**.

Całkowity dorobek naukowy Habilitanta, do momentu złożenia dokumentów w postępowaniu habilitacyjnym, to 21 oryginalnych prac twórczych. Prace

opublikowane były w latach 2003-2017. Liczba cytowań tych prac wynosi 378, łączny IF to 81, a index Hirscha 9.

W 2007 roku, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Pan Wojciech Strzałka obronił pracę doktorską pt.: "Analiza molekularna PCNA *Phaseolus coccineus*", której promotorem była Pani dr hab. Alicja Ziemienowicz. Od 2012 roku, Pan dr Wojciech Strzałka pracuje na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biotechnologii Roślin, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe p.t. **„Charakterystyka roślinnych białek PCNA1 i PCNA2 oraz ich kompleksów tworzonych z innymi białkami z wykorzystaniem modelu doświadczalnego *Arabidopsis thaliana*."** obejmuje 4 prace eksperymentalne opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej.

Wszystkie prace dotyczą badań białka PCNA (ang. Proliferating Cell Nuclear Antigen). Białko PCNA jest homotrimerem, odgrywającym bardzo ważną rolę w metabolizmie DNA komórek eukariotycznych. Struktura PCNA jest wysoce konserwowana. PCNA umożliwia prawidłowe funkcjonowanie replisomu poprzez formowanie platformy przesuwającej się po DNA i mediującej wiele oddziaływań białkowych czy oddziaływań białko-DNA. Określenie struktury PCNA, oddziaływania DNA - PCNA - polimerazy DNA, rola w procesie replikacji DNA było przedmiotem wielu publikacji naukowych. Obecnie wiele badań koncentruje się na potranslacyjnych modyfikacjach homotrimeru PCNA, ich znaczeniu dla oddziaływań z DNA, procesu reperacji, rekombinacji czy prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego.

Badania PCNA głównie prowadzone są na modelu drożdżowym czy ludzkim, choć ze względu na wysoce konserwowaną i istotną dla metabolizmu DNA rolę PCNA nie brakuje prac badających funkcjonowanie tego białka w innych organizmach. Niewiele jest danych dotyczących PCNA w Arabidopsis. Analizując literaturę naukową na ten temat znajdujemy tam głównie prace Habilitanta. W Arabidopsis białko to występuje w dwóch formach, zbudowanych odpowiednio z 263 i 264 aminokwasów, a różniących się jedynie kilkoma aminokwasami. Pan Wojciech Strzałka w przedstawionym osiągnięciu naukowym opisuje analizę dwóch białek PCNA1 PCNA2

oraz ich kompleksów tworzonych z innymi białkami w komórkach rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*.

W publikacji z 2009 roku z *Protein. Sci.* pt. „Crystal structures of the *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment" Habilitant jest pierwszym autorem. W pracy tej przeprowadzono analizę strukturalną dwóch heterotrimerycznych białek PCNA 1 i PCNA 2. Ponieważ początkowe próby krystalizacji czystych białek PCNA1 i PCNA2 Arabidopsis zakończyły się niepowodzeniem, korzystając z wcześniejszych doświadczeń innych grup przeprowadzono krystalizację kompleksu C-końcowego fragmentu ludzkiego białka p21 (peptyd p21) z białkiem PCNA1 lub PCNA2 Arabidopsis. Analiza porównawcza trimerów PCNA1 oraz PCNA2 wykazała podobieństwo struktury do innych eukariotycznych PCNA i nie wykazała znaczących różnic strukturalnych, które mogłyby sugerować zróżnicowanie funkcjonalne dwóch form. Wykazano że oba białka budujące PCNA1 i PCNA2 mogą formować homo- i heterotrimeryczne pierścienie.

Praca z *J. Exp. Bot.*,z 2012 roku, w której Habilitant jest pierwszym i korespondujacym autorem pt. „*Arabidopsis thaliana* Proliferating Cell Nuclear Antigen has several potential sumoylation sites" dotyczy potranslacyjnejnych modyfikacji białek PCNA1 i PCNA2 przez przyłączenie białka SUMO. Wykazano, że PCNA Arabidopsis podobnie jak w innych organizmach ulega sumoilacji. Mechanizm sumoilacji PCNA w drożdżach czy komórkach ludzkich, jest coraz lepiej poznany i wskazuje na zaangażowanie całego szeregu białek. W genomie Arabidopsis zidentyfikowano aż osiem genów kodujących białka SUMO. Analiza ekspresji tych genów nie jest jeszcze zakończona.

Prowadzono badania sumoilacji białek PCNA1 i PCNA2 analizując udział białek SUMO1, 2, 3, i 5 Arabidopsis. Wykazano, w wyniku bezpośredniej sumoilacji tworzenie kompleksów PCNA1/SUMO3 oraz PCNA2/SUMO3 i podobny wzór sumoilacji PCNA1 i PCNA2, niezależnie od typu użytej cząsteczki SUMO. Jednakże, wzór sumoilacji PCNA drożdżowego i PCNA Arabidopsis różnił się znacząco. Następnie, podjęto próbę identyfikację reszt lizyny, które ulegają sumoilacji w PCNA Arabidopsis. Przeanalizowano kolekcję mutein PCNA1 niosących wybrane lizyny zmienione na argininę. Zidentyfikowano sześć reszt lizyny (K13, K14, K20, K217,

K240 oraz K254), które podlegają modyfikacji przez SUMO w układzie bakteryjnym ze zrekonstytuowanym systemem sumoilacji Arabidopsis.

Trzecia praca, w której dr Wojciech Strzałka jest także autorem pierwszym i korespondującym, opublikowana w 2013 roku, również w *J. Exp. Bot.* (IF=3.5) pt.: " RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen" podobnie jak poprzednia praca dotyczy badania potranslacyjnych modyfikacji PCNA, ale tym razem ubikwitynacji. Wykazano, że zarówno w komórkach drożdży, Xenopus, kurzych czy ludzkich, PCNA ulega ubikwitynacji. PCNA może być mono- lub poliubikwitynowane w zależności od udziału w różnych drogach replikacji czy reperacji. Monoubikwitynacja PCNA umożliwia wyspecjalizowanym, mniej wiernym polimerazom DNA replikację uszkodzonego DNA, natomiast poliubikwitynacja umożliwia bezbłędną replikację poprzez zmianę matrycy DNA. Obie te modyfikacje są kluczowe dla zachowania stabilności materiału genetycznego w komórkach. Autorzy pracy postanowili sprawdzić, czy podobnie jak w innych eukariotycznych komórkach PCNA Arabidopsis ulega ubikwitynacji. Korzystając z wiedzy o mechanizmie ubikwitynacji PCNA w komórkach drożdży przeprowadzono analizę sekwencyjną i bioinformatyczną Arabidopsis i znaleziono homologi wszystkich zaangażowanych w ten proces białek drożdżowych, za wyjątkiem odpowiednika drożdżowego białka Rad18.

Wykazano tworzenie kompleksów PCNA1 i 2 zarówno z ubikwityną jak i białkiem RAD5a (jedna z dwóch ligaz E3 Arabidopsis - homolog drożdżowego białka Rad5). Zrekonstytuowano układ ubikwitynacji PCNA1 i PCNA2 Arabidopsis w komórkach *E. coli*, co umożliwiło zidentyfikowanie reszt aminokwasowych w PCNA ulęgających modyfikacjom i zaproponowanie modelu opisującego mechanizm ubikwitynacji PCNA1 i 2 w Arabidopsis.

W kolejnej publikacji z 2015 roku, opublikowanej w *Front. Plant Sci.* pt. „Arabidopsis PCNAs form complexes with selected D-type cyclins" zajęto się badaniem lokalizacji, identyfikacji cyklin typu D oraz analizą powstawania kompleksów cyklina D – PCNA w komórkach Arabidopsis.

W pracy tej Habilitant jest pierwszym i korespondującym autorem. Dane otrzymane w wyniku sekwencjonowania genomu *Arabidopsis thaliana* pozwoliły na

identyfikację 10 genów kodujących cykliny typu D. Wcześniej otrzymane wyniki u zwierząt czy roślin wykazały oddziaływanie cyklin typu D z PCNA, dlatego też Habilitant postanowił sprawdzić czy takie oddziaływania występują również w Arabidopsis. W wyniku przeprowadzonych badań zanalizowano, które z 10 potencjalnych cyklin D Arabidopsis mogą tworzyć kompleksy z PCNA1 oraz PCNA2. Określono lokalizację subkomórkową obserwowanych kompleksów i co bardzo interesujące wykazano, że istnieją różnice w odległościach pomiędzy poszczególnymi cyklinami D i ich partnerami PCNA występującymi w danym kompleksie. I tak, na przykład, różnice w odległości w kompleksie cyklina typu D4;1/PCNA1 a cyklina typu D4;1/PCNA2 po raz pierwszy sugerują odmienność funkcji PCNA1 i PCNA2 w Arabidopsis. Habilitant planuje dalsze badania nad znaczeniem biologicznym zaobserwowanych różnic.

Wszystkie przedstawione w osiągnięciu naukowym prace są pracami wartościowymi, o dużym znaczeniu dla rozwoju badanej dziedziny. Swój udział w powstawaniu tych prac Habilitant określa na 55 – 70%. Prace te świadczą o bardzo dobrym poziomie naukowym i dojrzałości naukowej Pana dr Wojciecha Strzałki.

OCENA POZOSTAŁEGO DOROBKU NAUKOWEGO

Pozostałe prace naukowe przedstawione we wniosku, niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego, to 16 prac eksperymentalnych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC) o sumarycznym współczynniku oddziaływania 81. Ponadto Habilitant opublikował 1 pracę przeglądową oraz jedną pracę spoza bazy JRC. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) wynosi 393. W sześciu z tych prac Pan dr Wojciech Strzałka jest autorem korespondującym.

Godny podkreślenia jest również fakt, że Pan dr Wojciech Strzałka jest autorem czterech prac opublikowanych w 2017 (w trzech autorem korespondujacym). Wyraźny wzrost ilości prac i bezpośredniego udziału Habilitanta wskazuje rosnącą dojrzałość naukową i prawidłowy przebieg jego kariery naukowej.

Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze Pana dr Wojciecha Strzałki zostały podzielone na kilka tematów. Pierwszy z nich opisuje inne, aniżeli wymienione w przedstawionym osiągnięciu cztery prace dotyczące badań PCNA. Wymienione są tu

badania PCNA nie tylko Arabidopsis, ale również z *P. vulgaris*, *Phaseouls coccineus* czy badania ludzkiego PCNA. W pracach tych Habilitant używa bardzo zróżnicowanych technik badawczych zarówno biologii molekularnej jak i analiz właściwości biofizycznych.

Zainteresowania Habilitanta dotyczą również bardziej aplikacyjnych tematów tj. wykorzystanie aptamerów DNA w biotechnologii. W pracach tych optymalizowano proces selekcji aptamerów DNA. Celem było wykorzystania aptameru DNA jako elementu systemu chromatografii powinowactwa służącego do oczyszczania białek rekombinowanych ze znacznikiem His. Ponadto, opracowano nowatorski układ chromatograficzny nazwany przez autorów systemem Argi. System ten pozwala na specyficzne oddziaływanie pomiędzy aptamerem DNA, a krótką metką peptydową bogatą w reszty argininy i służy do oczyszczania białek rekombinowanych i wprowadzania peptydów lub białek do wnętrza komórek. Czwarta, z wymienionych prac, miała na celu identyfikację aptameru DNA wiążącego specyficznie alfa-amanitynę, toksynę muchomora sromotnikowego. Takie wiązanie mogłoby blokować jej hepatotoksyczność, a aptamer DNA pełniłby rolę antidotum w przypadku zatrucia muchomorem. Badania te jednak muszą być jeszcze kontynuowane.

W ostatniej z pięciu publikacji proponowane jest wykorzystania aptameru DNA, skierowanego przeciwko ludzkiemu białku PCNA, jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego. Aptamer DNA specyficznie wiążący ludzkie białko PCNA. poddano analizom biochemicznym i wykazano, że utworzenie kompleksu aptamer anty-PCNA/PCNA/polimeraza DNA blokuje możliwość wiązania matrycy DNA do kompleksu PCNA/polimeraza DNA. Opisany wynik jest interesujący, jednakże musi być szerzej badany, gdyż hamuje podstawowe procesy fizjologiczne, co może mieć dramatyczny wpływ nie tylko na komórki nowotworowe, ale również na zdrowe komórki pacjenta. We wszystkich pięciu publikacjach Habilitant jest autorem korespondującym.

Inna wyodrębniona grupa tematyczna, dotyczy pięciu prac związanych z regulacją procesów fotosyntezy i odpowiedzi roślin na uszkodzenia DNA. Powstały one we współpracy z Zakładem Biochemii i Fizjologii Roślin oraz Zakładem Biotechnologii Roślin WBBiB.

Podsumowując, prace Pana dr Wojciecha Strzałki oceniam jako wartościowe. Prace te dotyczą bardzo różnorodnej tematyki badawczej i stosowanych metod świadcząc o bardzo wysokim potencjale naukowym Habilitanta.

OCENA ISTOTNEJ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

Pan dr Wojciech Strzałka jest współautorem 3 zgłoszeń patentowych, w których powstawanie wniósł istotny wkład. Swój udział określa na 33-40%.

Ważnym kryterium aktywności naukowej jest umiejętność złożenia wartościowych i nowatorskich projektów naukowo-badawczych, które zostają sfinansowane ze źródeł zewnętrznych (krajowych i międzynarodowych). Habilitant, jako Kierownik aktualnie realizuje dwa projekty badawcze. Jeden z to projekt TANGO finansowany przez NCBiR, drugi projekt Sonata-Bis finansowany przez NCN. Poprzednio prowadził 4 projekty badawcze jako Kierownik, a w czterech był Wykonawcą.

Pan dr Wojciech Strzałka dwukrotnie był laureatem Nagrody zespołowej Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego. W 2005 roku otrzymał nagrodę za najlepszą prezentację podczas Zimowej Szkoły Biotechnologii WBBiB UJ, a w 2013 roku Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin, za najlepszą pracę eksperymentalną opublikowaną w latach 2011-2012. Oprócz wykładu podczas Zimowej Szkoły Biotechnologii WBBiB UJ czy wykładu dla Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, wygłosił również w 2016 roku wykład na World Congress on Chromatography Amsterdam, Netherlands. Habilitant był beneficjentem stypendium wyjazdowego Polskiej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO /PAN oraz stypendium Europejskiej Fundacji Canona. Po uzyskaniu stopnia doktora Pan dr Wojciech Strzałka przebywał na kilku krótkoterminowych stażach m.in. w Open Laboratories of Advanced Bioscience and Biotechnology (OLABB). Institute for Protein Research, Osaka University czy University of Salento we Włoszech. Recenzował publikacje w czasopismach międzynarodowych i krajowych tj. np. DNA Repair, Plant Molecular Biology czy Acta Biologica Cracoviensia.

Ważnym podkreślenia jest fakt, że Habilitant współpracuje z grupami badawczymi zarówno polskimi jak i zagranicznymi.

DOROBEK ORGANIZACYJNY, DYDAKTYCZNY I POPULARYZACJA NAUKI

Pan dr Wojciech Strzałka od 2012 roku zatrudniony jest na stanowisku adiunkta w Zakładzie Biotechnologii Roślin, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, UJ.

Pan dr Wojciech Strzałka jest promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich, ponadto przez ostatnie 7 lat sprawował opiekę nad 2 licencjuszami oraz 4 magistrantami na Wydziale Biochemii Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Ponadto, prowadzi cykliczny wykład w ramach „Spotkanie w samo południe z biochemią, biofizyką i biotechnologią" dotyczący zastosowań roślin transgenicznych. Jest również autorem artykułu w popularno-naukowym czasopiśmie Wszechświat.

Habilitant jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a także Society of Experimental Biology.

Dorobek dydaktyczny i organizacyjny Pana dr Wojciecha Strzałki nie jest imponujący (jak rozumiem nie ma obowiązkowej dydaktyki na UJ), niemniej jednak spełnia wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego.

WNIOSEK KOŃCOWY

Prezentowane prace naukowe stanowią obszerny dorobek o wysokiej wartości naukowej. Przedstawione osiągnięcie naukowe i dokumentacja spełniają wszystkie kryteria stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zmianami Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2010 r. Nr 96, poz. 620 i Nr 182, poz. 1228 oraz Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Podsumowując, stwierdzam, że prezentowane osiągnięcia naukowe, dydaktyczne, organizatorskie i popularyzatorskie Pana dr Wojciecha Strzałki odpowiadają wymogom stawianym kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Wnioskuję, zatem o nadanie Panu dr Wojciechowi Strzałce stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie – biochemia.

I. Fijałkowska

Prof. dr hab. Iwona J. Fijałkowska
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN