

Autoreferat

1. Imię, drugie imię i nazwisko

Agnieszka Lidia Girstun

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2003 doktor nauk biologicznych w zakresie biologii; Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, tytuł rozprawy: „Właściwości katalityczne ludzkiej topoizomeryazy I w obecności wiążących się do niej białek SF2/ASF i CK2”; promotor: prof. dr hab. Krzysztof Staroń

1999 magister, kierunek biologia w zakresie biologii molekularnej; Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii

3. Dotychczasowe zatrudnienie w instytucjach akademickich lub badawczych

od 01.04.2019	adiunkt, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
01.10.2016 – 31.03.2019	asystent, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
01.10.2003 – 30.09.2016	adiunkt, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

4. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.1. Tytuł osiągnięcia

Czynniki determinujące rozmieszczenie topoizomerazy I na terenie jądra komórkowego.

4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Wyniki, które składają się na osiągnięcie naukowe, zostały opublikowane jako monotematyczna seria pięciu artykułów naukowych, obejmująca jedną pracę przeglądową, będącą rozdziałem w monografii (Publikacja nr 1) oraz cztery prace eksperymentalne (Publikacje nr 2 - 5).

✉ oznacza autora korespondencyjnego. IF został podany na podstawie bazy *Journal Citation Reports* zgodnie z rokiem opublikowania, dla pracy z 2019 r. podano IF za 2017 r. Cytowania (bez autocytowań) zostały podane na podstawie bazy *Web of Science (WoS)*.

Publikacja 1. Staroń K[✉], Girstun A. 2013. Nucleolar protein anchoring and translocation. W: O'Day DH, Catalano A (red.), *Proteins of the nucleolus*. Dordrecht, Netherlands: Springer, str. 209-247.

Publikacja 2. Girstun A., Kowalska-Loth B, Czuby A, Klocek M, Staroń K[✉]. 2008. Fragment responsible for translocation in the N-terminal domain of human topoisomerase I. *Biochem Biophys Res Commun*; 366:250-257.

IF₂₀₀₈= **2,648**; cytowania: **3**

Publikacja 3. Ishikawa T, Krzyśko KA, Kowalska-Loth B, Skrajna AM, Czuby A, Girstun A., Cieplak MK, Lesyng B, Staroń K[✉]. 2012. Activities of topoisomerase I in its complex with SRSF1. *Biochemistry*; 51:1803-1816.

IF₂₀₁₂= **3,377**; cytowania: **1** w *WoS Core Collection*, **+1** w *WoS BIOSIS Citation Index*

Publikacja 4. Girstun A.[✉], Ishikawa T, Kowalska-Loth B, Czuby A, Staroń K. 2017. Subnuclear localization of human topoisomerase I. *J Cell Biochem*; 118:407-419.

IF₂₀₁₇= **2,959**; cytowania: **1**

Publikacja 5. Girstun A.[✉], Ishikawa T, Staroń K. 2019. Effects of SRSF1 on subnuclear localization of topoisomerase I. *J Cell Biochem*; DOI: 10.1002/jcb.28459 (opublikowana wersja elektroniczna, oczekuje na włączenie do odpowiedniego tomu pisma).

IF₂₀₁₇= **2,959**; cytowania: **0**

Opis mojego wkładu w powstanie każdej publikacji został zamieszczony w Załączniku nr 5 („Wykaz opublikowanych prac naukowych i informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”). Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie wszystkich prac można znaleźć w Załączniku nr 6.

4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników

Cel badań.

Ogólnym celem badań było poznanie czynników odpowiedzialnych za dystrybucję topoizomerazy DNA I (top I) między jąderko a nukleoplazmę w jądrze komórek człowieka. Szczegółowe cele obejmowały identyfikację w cząsteczce top I rejonów kluczowych dla jej lokalizacji w tych przedziałach wewnątrzjądrowych oraz znalezienie zewnętrznych czynników w środowisku jądrowym wpływających na rozmieszczenie enzymu.

Uzasadnienie podjęcia badań.

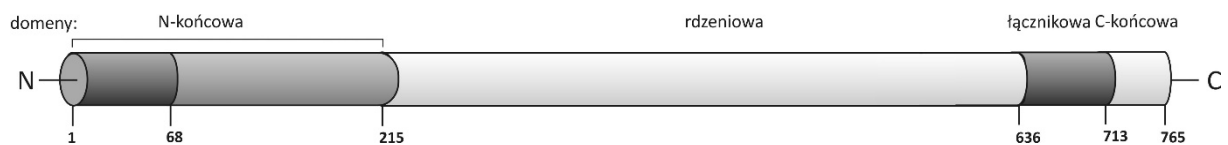
Top I jest wielofunkcyjnym enzymem wykazującym dwie niezależne aktywności katalityczne i działającym wyłącznie w jądrze komórkowym. Katalizuje relaksację superhelikalnego DNA (Capranico i in., 2017) i fosforylację czynników splicingowych należących do rodziny białek SR (bogatych w serynę-argininę), spośród których jej głównym substratem jest SRSF1 (ang. *serine/arginine-rich splicing factor 1*; Rossi i in., 1996). Niektóre ze swoich funkcji, np. relaksację DNA, top I realizuje zarówno w jąderku, jak i nukleoplazmie, chociaż zapotrzebowanie na tę aktywność jest różne w obu tych przedziałach. Inne funkcje, np. fosforylacja białek SR, są właściwe tylko dla jednego przedziału wewnątrzjądrowego, w tym wypadku dla nukleoplazmy. Dostępność top I w określonych obszarach jądra ma kluczowe znaczenie dla przebiegu podstawowych procesów komórkowych: wydajnej transkrypcji (relaksacja DNA), splicingu pre-mRNA (fosforylacja białek SR) oraz utrzymywania stabilności genomu (obie te aktywności; El Hage i in., 2010). Odpowiednia dystrybucja top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę jest zatem niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Ponadto fizjologiczne rozmieszczenie top I ulega istotnemu zaburzeniu w komórkach traktowanych lekami przeciwnowotworowymi, które są pochodnymi roślinnego alkaloidu – kamptotecyny (CPT; Christensen i in., 2004). **Istnieją zatem dwa główne wątki badawcze związane z lokalizacją wewnątrzjądrową top I. Pierwszy dotyczy poznania czynników regulujących rozdzielanie puli top I między jąderko a nukleoplazmę w warunkach fizjologicznych, drugi – czynników decydujących o gwałtownym przemieszczeniu top I z jąderka do nukleoplazmy w odpowiedzi na CPT.**

Wprowadzenie teoretyczne i hipotezy badawcze.

Jądro komórkowe to wysoce uporządkowana struktura, której wnętrze nie jest jednorodne, ale można w nim wyróżnić zdefiniowane przedziały wewnątrzjądrowe, m. in. kilka typów ciał jądrowych, do których zaliczamy jąderka, ciała Cajala, ciała PML i in. Ciała jądrowe są pozbawionymi błony konglomeratami zbudowanymi z kwasów nukleinowych i białek. Ze względu na to, że nie są oddzielone od otaczającego środowiska żadną fizyczną barierą, ich integralność ściśle zależy od oddziaływań między budującymi je cząsteczkami. Z tego samego powodu może odbywać się swobodna wymiana składników białkowych między ciałami jądrowymi a nukleoplazmą (Staněk i Fox, 2017). Najważniejszymi ciałami jądrowymi są jąderka formowane wokół fragmentów określonych chromosomów obejmujących tzw. organizatory jąderka (inaczej obszary jąderkotwórcze; ang.: *nucleolar organizer region, NOR*).

Jąderka są strukturami bardzo dynamicznymi. Obecnie uznaje się, że białka jądrowe są w ciągłym ruchu, a to, co obserwujemy jako lokalizację w jąderku (lub w innych ciałach jądrowych) wynika ze spowolnienia tego ruchu przez przejściowe oddziaływania z cząsteczkami wcześniej tam przyłączonymi. Białka jądrowe tworzą sieć oddziaływań inicjowanych przez podstawowe białka wiążące się bezpośrednio z NOR lub pre-rRNA (Németh i Grummt, 2018). Liczne białka lokalizują się w więcej niż jednym przedziale wewnątrzjądrowym, a ich rozmieszczenie jest wypadkową siły wiązania do różnych przedziałów. Wiązanie w jąderku często jest regulowane przez np. modyfikacje posttranslacyjne, wiązanie drobnocząsteczkowego ligandu, pH i in. Niektóre białka wiążą się w jąderkach za pomocą więcej niż jednego mechanizmu. Przykładem takiego białka jest ludzka top I, należąca do podrodziny topoizomeraz DNA typu IB.

Ludzka top I jest zbudowana z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, a w jej cząsteczce można wyróżnić cztery domeny: N-końcową, rdzeniową, łącznikową i C-końcową (ryc. 1). Domena rdzeniowa i C-końcowa tworzą centrum katalityczne enzymu w reakcji relaksacji. Są one połączone domeną łącznikową zbudowaną z dwóch długich helis α (Redinbo i in., 1998). Domena N-końcowa pozostaje w znacznym stopniu niesfałdowana i nie jest konieczna dla zachowania aktywności relaksacyjnej (Alsner i in., 1992), natomiast jest niezbędna dla aktywności top I działającej jako kinaza (tzw. aktywności kinazowej), ponieważ w jej obrębie wiązane są fosforylowane substraty białkowe (Labourier i in., 1998).



Ryc. 1. Schemat budowy domenowej ludzkiej top I.

Na początku realizacji projektu wiadomo było, że dystrybucja top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę zależy od jej aktywności relaksacyjnej. W warunkach fizjologicznych top I występuje w obu tych przedziałach wewnątrzjądrowych, ale znacząco koncentruje się w jąderkach, gdzie zachodzi intensywna transkrypcja rDNA (Christensen i in., 2002b). Top I jest swoiście wiązana w ośrodku włóknistym (ang. *fibrillar center*, FC) jąderek, kolokalizując się tam z polimerazą I RNA. Po wyłączeniu aktywności relaksacyjnej przez wprowadzenie punktowej substytucji w centrum katalitycznym (Y723F), preferencja do jąderka zanika, a top I lokalizuje się równomiernie na terenie całego jądra komórkowego (Christensen i in., 2002b). Obserwacje te stały się podstawą powszechnego przekonania, że aktywność relaksacyjna jest dominującym czynnikiem odpowiedzialnym za koncentrację jąderkową enzymu. Z drugiej strony, domena N-końcowa dodatkowo kotwicy top I w jąderku niezależnie od aktywności enzymatycznych, a oddziaływania niekatalityczne tej domeny są odpowiedzialne za precyzyjne rozmieszczenie białka wewnątrz jąderka. Top I pozbawiona domeny N-końcowej zachowuje aktywność relaksacyjną i pozostaje skoncentrowana w jąderkach, ale jest w nich rozmieszczona równomiernie zamiast lokalizować się głównie w ośrodku włóknistym (Christensen i in., 2002a). Warto podkreślić, że rekombinowany polipeptyd odpowiadający domenie N-końcowej silnie koncentruje się w jąderkach, ale obecność tej domeny nie wystarcza, aby skierować do jąderek pełnej długości top I pozbawioną aktywności relaksacyjnej (top I [Y723F]). Sugeruje to, że pozostała część cząsteczki top I zawiera elementy, które preferencyjnie zatrzymują enzym w nukleoplazmie.

Na podstawie powyższych danych została sformułowana **hipoteza nr 1: W cząsteczce top I można wyróżnić rejony niezbędne dla jej lokalizacji w jąderku lub nukleoplazmie. Hipoteza nr 1 stała się podstawą badań, których wyniki zostały włączone do prezentowanego osiągnięcia naukowego i opisane w publikacjach nr 2 i 4.**

Kolejne pytanie brzmi: jakie czynniki zewnętrzne odpowiadają za kierowanie top I do różnych przedziałów wewnątrzjądrowych? Najbardziej oczywistymi kandydatami są białka oddziałujące z top I i kolokalizujące się z nią w jąderku lub w nukleoplazmie. Poznano przynajmniej kilka takich białek (np. polimeraza I RNA, Christensen i in., 2002a), ale żadne z nich nie zostało dotychczas zidentyfikowane jako element wpływający na rozmieszczenie top I w komórkach człowieka. Wiadomo jedynie, że poziom białka B52/SRp55, należącego do rodziny SR, wpływa na dystrybucję wewnątrzjądrową top I u *Drosophila melanogaster* (Juge i in., 2010). Z drugiej strony, już w czasie realizacji przedstawianego projektu, pojawiły się przesłanki, że rozmieszczenie top I może zależeć nie tylko od białek, z którymi ściśle się kolokalizuje. Top I jest zaangażowana w ochronę genomu przed uszkodzeniami wywoływanymi przez rozległe hybrydy RNA:DNA zwane pętlami R, które powstają podczas transkrypcji (El Hage i in., 2010). Ochronę tę zapewnia nie tylko top I, ale także kilka innych białek, z których główną rolę odgrywają RNaza H1 i kanoniczny substrat fosforylowany przez top I/kinazę, czyli białko SRSF1. Każde nich działa na drodze innego mechanizmu. Top I usuwa generowany za aparatem transkrypcyjnym negatywny superheliks, który promuje powstawanie pętli R. RNaza H1, będąca endonukleazą swoistą względem hybryd RNA:DNA, bezpośrednio degraduje pętle R. Natomiast SRSF1 wiąże się z powstającym pre-mRNA, zapobiegając jego oddziaływaniu z matrycą DNA (Skourti-Stathaki i Proudfoot, 2014). RNaza H1, podobnie jak top I, działa zarówno w jąderkach, jak i nukleoplazmie, a jej obecność w jąderkach jest ujemnie skorelowana z lokalizacją top I. Rozmieszczenie obu enzymów jest w przybliżeniu zrównoważone. Wraz z przemieszczaniem się top I do nukleoplazmy rośnie ilość RNazy H1 w jąderkach. Ponadto, w komórkach o obniżonym poziomie RNazy H1 wzrasta ilość top I i odwrotnie, ilość top I maleje wraz ze wzrostem poziomu RNazy H1, co sugeruje, że te dwa enzymy zastępują się wzajemnie przy usuwaniu pętli R (Shen i in., 2017). Z drugiej strony, top I i SRSF1 pozytywnie wpływają wzajemnie na swoje przyłączanie do miejsc tworzenia pętli R (Li i in., 2015). Jednak SRSF1 funkcjonuje tylko w nukleoplazmie i jedynie top I zlokalizowana poza jąderkami może z nim współpracować (Keshwani i in., 2015).

Na podstawie powyższych danych, które zostały dodatkowo poparte niektórymi oryginalnymi ustaleniami własnych badań przedstawionymi w prezentowanym osiągnięciu (opisane poniżej), została sformułowana **hipoteza nr 2: SRSF1 może wpływać na dystrybucję top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę. Hipoteza nr 2 stała się podstawą badań, których wyniki zostały włączone do prezentowanego osiągnięcia naukowego i opisane w publikacjach nr 3 i 5.**

Chociaż top I w optymalnych warunkach fizjologicznych jest silnie skoncentrowana w jąderku, jednak pod wpływem stresu wywołanego np. przez promieniowanie jonizujące (Thielmann i in., 1999) lub suboptymalne warunki wzrostu (niepublikowane obserwacje własne) łatwo przemieszcza się do nukleoplazmy. Ponadto, top I opuszcza jąderko, gdy zostaje zahamowana transkrypcja rDNA (np. przez aktynomycynę D) a w jąderku zachodzą znaczne przegrupowania białek (Christensen i in., 2004). Gwałtowna delokalizacja jąderkowa top I jest również jedną z pierwszych reakcji komórek na CPT i jej kliniczne pochodne (np. topotecan), która zachodzi już po mniej niż 1 min traktowania lekiem (Christensen i in., 2004). CPT jest specyficznym inhibitorem relaksacji DNA katalizowanej

przez top I. Należy do grupy tzw. „trucizn topoizomerazowych”, ponieważ wiąże się z top I związaną kowalencyjnie z DNA, unieruchamia ją w miejscu wiązania i blokuje reakcję, co prowadzi do powstawania dwuniciowych nacięć w DNA, a ostatecznie do apoptozy. Pochodne CPT są stosowane jako leki przeciwnowotworowe (Martino i in., 2017) i delokalizacja indukowana przez CPT wzbudza największe zainteresowanie ze względu na jej potencjalne znaczenie w odpowiedzi komórek na terapię. Jednak niewiele wiadomo na temat mechanizmu tego zjawiska, z wyjątkiem obserwacji, że w odpowiedzi na CPT ruch top I zostaje znacznie spowolniony w nukleoplazmie, ale nie w jąderkach (Christensen i in., 2002b).

W toku prac związanych z badaniami lokalizacji top I została sformułowana **hipoteza nr 3: Przynajmniej niektóre czynniki wpływające na rozmieszczenie wewnątrzjądrowe top I mogą modyfikować jej delokalizację jąderkową indukowaną przez CPT. Hipoteza nr 3 stała się podstawą badań, których wyniki zostały włączone do prezentowanego osiągnięcia naukowego i opisane w publikacjach nr 4 i 5.**

Osiągnięte wyniki i wnioski z nich płynące.

Przeprowadzone badania pozwoliły mi zweryfikować trzy przedstawione powyżej hipotezy i potwierdziły mój ogólny pogląd na dystrybucję wewnątrzjądrową top I w komórkach człowieka, sformułowany w przeglądowej **publikacji nr 1**. Wszystkie eksperymenty przeprowadziłam z wykorzystaniem modelu linii komórkowej HeLa.

Odkryłam, że rozmieszczenie top I jest regulowane przez sieć równoważących się oddziaływań nieenzymatycznych. W interakcjach pośredniczą różne rejony białka top I. Zidentyfikowałam obszary odpowiedzialne zarówno za kierowanie top I do jąderka, jak i do nukleoplazmy. Wykazałam, że aktywność relaksacyjna jest istotna dla wiązania top I do jąderka tylko wtedy, gdy zrównoważone są oddziaływania nieenzymatyczne. Utrzymanie nienaruszonej sieci oddziaływań ma również krytyczne znaczenie dla przemieszczania top I indukowanego przez CPT (zob. **publikacje nr 2 i 4**).

Szukając w środowisku jądrowym czynników zewnętrznych istotnych dla regulacji rozmieszczenia top I, odkryłam, że na jej lokalizację znacząco wpływa SRSF1. Wykazałam bezpośrednio, że ilość top I w nukleoplazmie ściśle zależy od poziomu białka SRSF1. Im więcej SRSF1 znajduje się w komórce, tym więcej top I lokalizuje się w nukleoplazmie. Kiedy spada ilość SRSF1, znacznie wzrasta pula top I zatrzymywanej w jąderku. Efekt ten jest specyficzny dla SRSF1, ale już nie dla innych białek SR (zob. **publikacja nr 5**). Chociaż SRSF1 oddziałuje bezpośrednio z top I (zob. **publikacja nr 3**), to niewykluczone, że jego wpływ na lokalizację top I może być pośredni (zob. dyskusja wyników przedstawionych w **publikacji nr 5**).

SRSF1 ma kluczowe znaczenie nie tylko dla rozmieszczenia top I w warunkach fizjologicznych, ale także dla jej przemieszczania indukowanego przez CPT. W przypadku niedoboru SRSF1, top I nie ulega delokalizacji z jąderka do nukleoplazmy w odpowiedzi na traktowanie komórek CPT (zob. **publikacja nr 5**).

Badania, które stanowią podstawę osiągnięcia habilitacyjnego, zostały poniżej przedstawione bardziej szczegółowo w odniesieniu do artykułów, w których pierwotnie je opisano. Prace zostały omówione nie w porządku chronologicznym publikacji, ale w kolejności logicznej omawianych zagadnień.

Publikacja 1. Staroń K[✉], Girstun A. 2013. **Nucleolar protein anchoring and translocation.** W: O'Day DH, Catalano A (red.), Proteins of the nucleolus. Dordrecht, Netherlands: Springer, str. 209-247.

Ogólna koncepcja projektu została przedstawiona w artykule przeglądowym, który przygotowałam wspólnie z prof. Krzysztofem Staroniem w odpowiedzi na zaproszenie redaktorów monografii „Proteins of the nucleolus”. Został on napisany po ukazaniu się mojej pierwszej pracy dotyczącej lokalizacji top I (publikacja nr 2 w tej dokumentacji) i jest nie tylko czystym przeglądem wiedzy opartym na wcześniej opublikowanych pracach. **Przedstawia także mój punkt widzenia na reguły rządzące rozmieszczeniem wewnątrzjądrowym top I na tle ogólnej wiedzy dotyczącej lokalizacji białek jądrowych.** Idea lokalizacji top I w jądrze komórkowym sprowadza się do dwóch zasad:

1. Jąderko jest ogromnym wielocząsteczkowym kompleksem, powstającym na drodze samoorganizacji i kontrolowanym przez reakcje biochemiczne zachodzące zarówno w samym jąderku, jak i w otaczającym je środowisku jądrowym. Białka jądrowe są zatrzymywane w jąderku przez opóźnienie ich ruchu w tym przedziale, co jest spowodowane oddziaływaniem z innymi składnikami jąderkowymi (wcześniej związanymi białkami lub kwasami nukleinowymi).
2. Top I jest wiązana w jąderku w złożony sposób. Będąc enzymem wielozadaniowym i funkcjonalnie powiązany z innymi białkami, jest dystrybuowana pomiędzy jąderko i nukleoplazmę dzięki sieci licznych oddziaływań z elementami nie tylko jąderkowymi, ale także nukleoplazmatycznymi. Ostateczna lokalizacja jest wynikiem ustalenia równowagi pomiędzy tymi oddziaływaniami, które mogą łatwo ulec zmianie i w rezultacie spowodować przemieszczenie top I w inne miejsce na terenie jądra.

Chociaż przesłanki do sformułowania tego poglądu wynikają głównie, ale nie wyłącznie, z publikacji innych autorów, **artykuł opisuje również moje oryginalne, niepublikowane wcześniej prace eksperymentalne.** W tym artykule po raz pierwszy przedstawiłam wyniki pokazujące, że **aktywność relaksacyjna nie jest absolutnie dominującym czynnikiem regulującym lokalizację top I i że dodatkowym rejonem odpowiedzialnym za wiązanie w jąderkach może być domena łącznikowa.** Badania opisane w tej pracy przeglądowej zostały później rozwinięte, a uzyskane wyniki zaprezentowałam w publikacji nr 4.

W artykule wysunęłam również propozycje badań, które powinny doprowadzić do lepszego zrozumienia funkcjonowania białek w jąderku, ze szczególnym uwzględnieniem top I. Proponowane badania obejmują przede wszystkim dogłębne zrozumienie systemu oddziaływań odpowiedzialnych za wewnątrzjądrową dystrybucję top I. W toku dalszej pracy przeprowadziłam takie badania, a ich wyniki opisałam w publikacjach nr 2-5.

Publikacja 2. Girstun A, Kowalska-Loth B, Czuby A, Klocek M, Staroń K[✉]. 2008. **Fragment responsible for translocation in the N-terminal domain of human topoisomerase I.** Biochem Biophys Res Commun; 366:250-257.

Domena N-końcowa została wcześniej zidentyfikowana jako rejon białka wiążący top I w jąderku niezależnie od jej aktywności enzymatycznych (Christensen i in., 2002a). Za to zjawisko odpowiada najprawdopodobniej oddziaływanie z niezidentyfikowanymi dotychczas elementami jąderkowymi, przypuszczalnie z białkami. Postulowano także, że funkcjonowanie domeny N-końcowej jako elementu wiążącego top I w jąderkach jest regulowane przez sumoilację (Rallabhandi i in., 2002), ale rola tej modyfikacji pozostawała kontrowersyjna (Christensen i in., 2004). W publikacji nr 2 dokładnie zdefiniowałam część domeny N-końcowej odpowiedzialną za wiązanie w ośrodku włóknistym jąderka i przeanalizowałam białka wiążące się z top I w zidentyfikowanym rejonie.

Podstawową metodą zastosowaną w pracy była analiza lokalizacji znakowanych fluorescencyjnie polipeptydów, odpowiadających fragmentom domeny N-końcowej i jej wariantom z wprowadzonymi punktowymi substytucjami aminokwasowymi. To, co odróżniało zastosowane przeze mnie podejście od wcześniej wykorzystywanych, to dołączenie sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS) dużego antygeny T SV40 do wszystkich analizowanych fragmentów top I. Wybrana sekwencja NLS skutecznie kierowała dowolny polipeptyd do jądra, ale nie preferencyjnie do jąderka. W związku z tym można było zaobserwować potencjał wiązania jąderkowego wybranego fragmentu domeny N-końcowej, niezależnie od tego, czy on sam posiada efektywny NLS.

Dzięki temu podejściu wykazałam, że **za zagęszczenie jąderkowe domeny N-końcowej odpowiada głównie jej skrajny fragment N-końcowy obejmujący pierwsze 67 reszt aminokwasowych ([1-67]).** Co prawda dwa rejony domeny N-końcowej były zdolne do koncentracji w jąderkach – część N-końcowa (top[1-67]) i C-końcowa obejmująca reszty aminokwasowe od 171 do 214 (top[171-214]), ale tylko rozmieszczenie fragmentu top[1-67] ściśle imitowało lokalizację pełnej długości domeny N-końcowej. Ponadto, **w odpowiedzi na traktowanie komórek CPT tylko rozmieszczenie top[1-67] (ale nie top[171-214]) zmieniało się w analogiczny sposób jak lokalizacja pełnej domeny N-końcowej.** Dodatkowo zweryfikowałam rolę sumoilacji i wykluczyłam wpływ tej modyfikacji posttranslacyjnej na wiązanie domeny N-końcowej w jąderku i jej przemieszczanie indukowane przez CPT.

Aby wytypować cele jąderkowe odpowiedzialne za wiązanie domeny N-końcowej przeprowadzona została analiza proteomiczna białek tworzących kompleksy z fragmentem top[1-67] i pozostałą częścią domeny (top[68-214]). Spośród zidentyfikowanych białek, niektóre zostały wykryte w kompleksach tworzonych przez oba rejony domeny N-końcowej, ale część z nich była wiązana swoiście tylko przez top[1-67] lub top[68-214]. Analiza ta jednak nie dała odpowiedzi na postawione na wstępie pytanie, gdyż spośród białek wiązanych selektywnie tylko przez top[1-67], jedynie helikaza RNA 2 (Gu) lokalizuje się preferencyjnie w jąderku, a późniejsze badania wykluczyły jej wpływ na rozmieszczenie wewnątrzjąderkowe zarówno samej domeny N-końcowej, jak i pełnej długości top I (wyniki niepublikowane). Ustaliłam natomiast, że tym, co odróżnia top[1-67] od pozostałej części domeny N-końcowej, jest swoiste oddziaływanie z białkami SR. Te interakcje nie mogą tłumaczyć jąderkowej koncentracji domeny N-końcowej, ponieważ białka SR lokalizują

się niemal wyłącznie w nukleoplazmie. Mogą natomiast odpowiadać za częściowe zatrzymywanie top[1-67] i całej domeny N-końcowej w miejscach nukleoplazmatycznych (zob. publikacja nr 4).

Podsumowując badania opisane w publikacji nr 2, najważniejsze wnioski i wyniki mające największy wpływ na moje przyszłe badania były następujące:

1. **Domena N-końcowa nie jest jednorodna, jeśli rozważamy jej rolę w wewnątrzjądrowej dystrybucji top I. Jej różne rejony mogą oddziaływać z różnymi białkami, a w konsekwencji interakcje zachodzące za pośrednictwem tych rejonów mogą wpływać w zróżnicowany sposób na lokalizację top I.**
2. **Za wiązanie domeny N-końcowej w jąderku odpowiada głównie rejon obejmujący reszty aminokwasowe [1-67].**
3. **Rekombinowany polipeptyd top[1-67] tworzy swoiste kompleksy z białkami będącymi substratami aktywności kinazowej top I, tj. SRSF1 i innymi białkami SR.**

Pierwsze dwa wnioski stały się punktem wyjścia do dalszych badań, których wyniki przedstawiono w publikacji nr 4. Identyfikacja SRSF1 i innych białek SR jako specyficznie oddziałujących z top[1-67] doprowadziła do postawienia pytania, czy białka te mogą wpływać na zależną od domeny N-końcowej dystrybucję top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę, co byłoby zgodne ze sformułowaną wyżej hipotezą nr 2. Wyniki badań mających na celu weryfikację tej hipotezy przedstawiono w publikacjach nr 3 i 5.

Publikacja 4. Girstun A[✉], Ishikawa T, Kowalska-Loth B, Czuby A, Staroń K. 2017. **Subnuclear localization of human topoisomerase I.** J Cell Biochem; 118:407-419.

Badania opisane w publikacji nr 2 koncentrowały się na izolowanej domenie N-końcowej, natomiast nie weryfikowały wpływu zidentyfikowanych obszarów białka na lokalizację pełnej długości top I. Stąd kolejna praca została poświęcona głównie odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób różne rejony domeny N-końcowej oraz pozostałe domeny top I uczestniczą w kierowaniu całego białka do różnych przedziałów wewnątrzjądrowych. W badaniach wykorzystano podejście podobne do poprzednio stosowanego i oparte na analizie lokalizacji fragmentów enzymu i jego wariantów z określonymi substytucjami punktowymi i delecjami. Wykorzystanie fragmentów enzymu pozwoliło zbadać potencjał pozostałych domen do wiązania w określonych przedziałach wewnątrzjądrowych, a wariantów z substytucjami punktowymi i delecjami – rolę wytypowanych rejonów w dystrybucji wewnątrzjądrowej całej top I.

Wykazałam, że **izolowane domeny enzymu mają różne powinowactwo do przedziałów wewnątrzjądrowych i wzajemnie wpływają na swoją lokalizację.** Oprócz dystalnego fragmentu domeny N-końcowej ([1-67]), w jąderku preferencyjnie lokalizuje się również domena łącznikowa, a domena C-końcowa jest wykluczana z jąderka i zatrzymuje się wyłącznie w nukleoplazmie. Jednak interakcje, w których pośredniczą domeny N-końcowa i łącznikowa, dominują, ponieważ te dwa rejony są zdolne do przyciągania do jąderka także sąsiednich domen, rdzeniowej w pierwszym przypadku i C-końcowej w drugim. Z drugiej strony, wzór lokalizacji domeny N-końcowej nie zmienia się po dołączeniu do niej domeny rdzeniowej, jak również rozmieszczenie domeny łącznikowej nie zmienia się po przyłączeniu domeny C-końcowej. Efekty lokalizacyjne domeny N-końcowej

i łącznikowej sumują się i obecność obu tych domen skutkuje niemal całkowitą koncentracją powstałego polipeptydu w jąderku. Dopiero przyłączenie domeny C-końcowej umożliwia częściowe przemieszczenie enzymu do nukleoplazmy. Innymi słowy, domena C-końcowa jest niezbędna do skierowania części puli top I do nukleoplazmy, gdy w cząsteczce obecne są oba rejony wiążące się w jąderkach, czyli także w przypadku pełnej długości top I.

Domena N-końcowa wykazuje jeszcze jedną dodatkową cechę. Ulega częściowemu zagęszczeniu w ziarnistościach interchromatynowych (ang. *speckles*), w których gromadzone są m. in. czynniki splicingowe, w tym SRSF1 i inne białka SR. Dzięki możliwości wykorzystania bardziej zaawansowanego mikroskopu niż podczas przygotowywania publikacji nr 2, zaobserwowałam, że koncentracja w ziarnistościach jest również charakterystyczna dla wcześniej analizowanego fragmentu top[1-67], ale nie dla pozostałej części domeny N-końcowej (wyniki niepublikowane). Za wiązanie w ziarnistościach może odpowiadać swoiste oddziaływanie top[1-67] z białkami SR zidentyfikowane w badaniach opisanych w publikacji nr 2. Przyłączenie domeny rdzeniowej nie zmienia zdolności domeny N-końcowej do zagęszczania się w ziarnistościach, ale wydłużenie takiego polipeptydu dodatkowo o domenę łącznikową, prowadzi do jego wycofania z ziarnistości. Podczas gdy dodanie domeny C-końcowej osłabia koncentrację jąderkową (zob. wyżej), to jednak nie przywraca zdolności do wiązania w ziarnistościach i w przypadku pełnej długości top I nie obserwuje się zagęszczania enzymu na ich terenie.

Ponieważ większość dotychczasowych analiz wykonałam jedynie przy wykorzystaniu fragmentów top I, postawiłam sobie za cel zweryfikowanie znaczenia zidentyfikowanych rejonów dla rozmieszczenia całego enzymu. Udowodniłam, że **rejon obejmujący pierwsze 67 reszt aminokwasowych ([1-67]) jest absolutnie niezbędny dla lokalizacji jąderkowej top I**, ponieważ wariant delecyjny pozbawiony tej sekwencji (top [68-765]) lokalizuje się wyłącznie na terenie nukleoplazmy, niezależnie od tego, czy pozostaje aktywny relaksacyjnie czy nie. Z drugiej strony, wykazałam, że **pozostała część domeny N-końcowej ([68-214]) jest odpowiedzialna za zatrzymywanie top I w nukleoplazmie**, ponieważ całkowite usunięcie domeny N-końcowej powoduje, że powstały polipeptyd koncentruje się w jąderkach, nawet gdy aktywność relaksacyjna zostaje wyłączona przez wprowadzenie mutacji Y723F. Nie zaobserwowałam wcześniej tendencji do wykluczania z jąderek żadnego polipeptydu odpowiadającego izolowanemu fragmentowi domeny N-końcowej (wyniki przedstawione w publikacji nr 2), więc z dużym prawdopodobieństwem akumulacja nukleoplazmatyczna top[68-765] jest skutkiem oddziaływań, w których pośredniczy większy fragment białka, obejmujący przynajmniej fragment innej domeny, a nie tylko sam rejon [68-214].

Aby dokładniej zbadać rolę domeny łącznikowej w dystrybucji wewnątrzjądrowej top I, przygotowałam kolekcję mutantów punktowych. Wszystkie wprowadzane przeze mnie mutacje zostały wcześniej opisane w literaturze jako modyfikujące właściwości fizyczne domeny łącznikowej bez zmiany jej ogólnej struktury. Zidentyfikowałam dwa typy mutacji, jeden wzmacniający koncentrację jąderkową top I i drugi, promujący jej lokalizację nukleoplazmatyczną. Wykorzystanie tych mutantów pozwoliło mi udowodnić, że **domena łącznikowa odgrywa rolę w kierowaniu pełnej długości top I do jąderek**. Wprowadzenie niektórych z tych mutacji skutkuje podobnym efektem jak skrócenie domeny N-końcowej, a mianowicie sprawia, że lokalizacja top I staje się niezależna od jej aktywności relaksacyjnej. Należy podkreślić, że aktywność relaksacyjna była wcześniej uważana za dominującą i absolutnie wymagany czynnik koncentrujący top I w jąderkach. Dodatkowo **wszystkie**

badane mutacje silnie koncentrujące top I w jąderku powodowały, że lokalizacja enzymu była niewrażliwa na traktowanie komórek CPT.

Wprowadzenie jednocześnie dwóch mutacji przeciwstawnie wpływających na rozmieszczenie top I, tj. skrócenie domeny N-końcowej promujące lokalizację nukleoplazmatyczną i wprowadzenie substytucji punktowej A653P w domenie łącznikowej silnie zagęszczające top I w jąderku, przywraca fenotyp lokalizacyjny charakterystyczny dla dzikiej top I. Oznacza to, że **mutacje „lokalizacyjne” wzajemnie anulują swoje efekty, co sugeruje, że oddziaływania warunkowane przez oba rejony kierujące do jąderka w jakiś sposób się uzupełniają i oba rejony muszą pozostać nienaruszone lub oba muszą zostać zmodyfikowane, aby prawidłowo współpracowały zapewniając właściwe rozmieszczenie wewnątrzjądrowe.** Wniosek ten jest szczególnie interesujący w połączeniu z pracą opublikowaną przez inną grupę badawczą, wykazującą, że brak komplementacji między domenami N-końcową i łącznikową jest letalny dla komórek drożdży, a szkodliwy wpływ spowodowany zmianą jednej z tych domen jest neutralizowany przez modyfikację drugiej (Wright i in., 2015)

Wyniki zaprezentowane w omawianej pracy sugerują dwustopniowy model regulacji dystrybucji top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę. Podstawą jest sieć oddziaływań warunkowanych głównie przez domeny N-końcową i łącznikową. Drugi poziom, dostępny tylko wtedy, gdy te oddziaływania są zrównoważone, zależy od aktywności relaksacyjnej top I. Brak równowagi w sieci interakcji prowadzi nie tylko do uniezależnienia dystrybucji top I od jej aktywności relaksacyjnej, ale także do zahamowania delokalizacji top I z jąderka w odpowiedzi na czynniki takie jak CPT.

Podsumowując badania opisane w pracy nr 4, najważniejsze wnioski były następujące:

- 1. Oddziaływania nieenzymatyczne są krytyczne dla wewnątrzjądrowego rozmieszczenia także pełnej długości top I, a nie tylko jej krótkich fragmentów.**
- 2. Domena N-końcowa i łącznikowa odgrywają dominującą rolę w sieci oddziaływań, które określają lokalizację top I wewnątrz jądra.**
- 3. Różne rejony domeny N-końcowej odgrywają przeciwstawne role w kierowaniu top I do przedziałów wewnątrzjądrowych, fragment [1-67] wiąże enzym w jąderkach, a reszta domeny [68-214] promuje lokalizację nukleoplazmatyczną.**
- 4. Aktywność relaksacyjna może wpływać na lokalizację top I tylko wtedy, gdy zachowane są oddziaływania nieenzymatyczne, w których pośredniczą domeny N-końcowa i łącznikowa.**

Wniosek nr 3 sugeruje, że należy szukać czynników zewnętrznych regulujących rozmieszczenie top I wśród białek wiązanych specyficznie przez jedną część domeny N-końcowej, ale nie przez drugą. Badania opisane w pracy nr 2 ujawniły, że białka SR, w tym SRSF1, znajdują się wśród białek wychwytywanych swoiście z ekstraktu jądrowego przez fragment odpowiedzialny za kierowanie domeny N-końcowej do jąderka (top[1-67]), ale nie przez resztę domeny (top[68-214]). Ta sama część białka ma potencjał wiązania do ziarnistości interchromatynowych, a wykryte oddziaływania z białkami SR odpowiadają zapewne za lokalizację w tych obszarach. Jednak w pełnej długości białku potencjał ten jest prawdopodobnie maskowany przez oddziaływania, w których pośredniczą inne domeny, chociaż top I nie traci zdolności do wydajnego wiązania z SRSF1. Wynika to m. in. z wcześniejszych moich badań, nie ujętych w osiągnięciu habilitacyjnym (Czubaty i in., 2005), dzięki którym wykazałam, że SRSF1 jest jednym z dominujących składników kompleksów tworzonych przez endogenną top I w komórkach HeLa. Z drugiej strony, nasza grupa wcześniej zidentyfikowała dodatkowe miejsce dla wiązania SRSF1 w obrębie pierwszych dwóch subdomen domeny rdzeniowej

obejmujących reszty aminokwasowe [215-433] (tzw. „czapeczka”, ang.: *cap*, w strukturze przestrzennej top I; Kowalska-Loth i in., 2005). W prezentowanych tutaj badaniach lokalizacyjnych ta część cząsteczki nie wykazywała preferencji dla żadnego przedziału wewnątrzjądrowego. W związku z powyższym, białko SRSF1 wydawało się być potencjalnym kandydatem na czynnik regulujący rozmieszczenie top I, chociaż na tym etapie badań nie miałam jeszcze pewności, czy odgrywa rolę w dystrybucji pełnej długości enzymu. Dwie kolejne prace zostały poświęcone dokładniejszej analizie sposobu wiązania SRSF1 z top I (publikacja nr 3) oraz weryfikacji wpływu SRSF1 na lokalizację top I (publikacja nr 5).

Publikacja 3. Ishikawa T, Krzyśko KA, Kowalska-Loth B, Skrajna AM, Czuby A, Girstun A, Cieplak MK, Lesyng B, Staroń K[✉]. 2012. **Activities of topoisomerase I in its complex with SRSF1.** *Biochemistry*; 51:1803-1816.

Publikacja nr 3 prezentuje wyniki szerszego projektu, którego celem było poznanie sposobu działania top I w kompleksie z SRSF1. Do mojego osiągnięcia habilitacyjnego zaliczam tylko niewielką część opisanych w niej badań, dotyczącą analizy rejonów top I odpowiedzialnych za bezpośrednie wiązanie SRSF1. W tym przypadku przebadłam oddziaływania oczyszczonych białek rekombinowanych, wykorzystując dwa testy *in vitro*, test aktywności kinazowej top I oraz technikę *pull-down*.

Domena N-końcowa i rejon „czapeczki” ([215-433]) zostały wcześniej zidentyfikowane jako miejsca interakcji top I z SRSF1. W omawianej pracy wykazałam, że **tylko kombinacja obu miejsc zapewnia efektywne bezpośrednie oddziaływanie SRSF1 z top I w obecności innych białek konkurujących o wiązanie**. Zostało to wykazane w teście kompetycji opartym na analizie aktywności kinazowej top I. W teście tym badałam zdolność fragmentów top I do konkurowania z białkiem pełnej długości o wiązanie SRSF1. Ani sama domena N-końcowa, ani top[215-433] nie wiązały się z SRSF1 na tyle wydajnie, aby konkurować z całą top I i nie wpływały przez to na wydajność fosforylacji, podczas gdy reakcję całkowicie hamował polipeptyd zbudowany z obu miejsc oddziaływania (top[1-433]). Świadczy to o tym, że skutecznie współzawodniczył z top I, wydajnie wiążąc się z SRSF1.

W celu zbadania zdolności różnych rejonów domeny N-końcowej do bezpośredniego wiązania SRSF1, zastosowałam metodę *pull-down*. W przeciwieństwie do oddziaływań ujawnionych wcześniej przy użyciu ekstraktu zawierającego szeroki repertuar białek jądrowych (publikacja nr 2), gdy analizowałam oczyszczone białka, SRSF1 nie wykazywało zdolności do wiązania z top[1-67]. Wiazało się natomiast z inną częścią domeny N-końcowej obejmującą reszty aminokwasowe [171-214], mimo że wcześniej nie zostało wykryte wśród białek wychwytywanych z ekstraktu jądrowego przez dłuższy fragment top[68-214] (publikacja nr 2). Jednakże, jak wykazano w teście kompetycji, siła wiązania izolowanych fragmentów top I jest wystarczająca do skutecznego oddziaływania z SRSF1 tylko wtedy, gdy nie konkurują z innymi oddziałującymi białkami. **Wiązanie SRSF1 do wyizolowanego fragmentu top[1-67] obserwowałam tylko analizując ekstrakt jądrowy, co sugeruje, że ta interakcja nie jest bezpośrednia i zachodzi za pośrednictwem innych partnerów białkowych, podczas gdy w bezpośrednie wydajne wiązanie top I i SRSF1 musi być zaangażowana zarówno domena N-końcowa, jak i część domeny rdzeniowej.** W związku z tym interakcje zależne od fragmentu [1-67] można przeoczyć w testach analizujących oczyszczone białka, ale nadal mogą być one ważne dla funkcjonowania obu białek w ich naturalnym środowisku komórkowym.

Białko SRSF1 jest zbudowane z dwóch domen wiążących RNA (RRM) i domeny bogatej w argininę i serynę (RS). W naszej poprzedniej pracy zidentyfikowaliśmy domeny RRM jako miejsce wiązania do rejonu „czapeczki” top I (Kowalska-Loth i in., 2005). W prezentowanej pracy **zidentyfikowałam domenę RS jako drugie miejsce oddziaływania SRSF1 z top I, wiążące zarówno domenę N-końcową, jak i rejon "czapeczki"**. Interakcja między oboma białkami była dalej analizowana przez badania opisane w prezentowanym artykule, ale ich wyniki nie wchodzą w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego.

Uzyskane wyniki w połączeniu z wynikami opublikowanymi w pracy nr 4 silnie umacniają hipotezę, że SRSF1 może wpływać na podział puli top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę:

- 1. Forma top I zawierająca oba miejsca oddziaływania, a zatem zdolna do skutecznego wiązania SRSF1, jest zatrzymywana wybiórczo w nukleoplazmie, gdy zostanie pozbawiona sekwencji [1-67] wiążącej ją w jąderkach (top[68-765]).**
- 2. Gdy jedno z miejsc oddziaływania zostaje usunięte, jednocześnie zanika zdolność do całkowitej akumulacji nukleoplazmatycznej, jak w przypadku top[215-765] lub izolowanych fragmentów domeny N-końcowej (top[134-214] i top[171-214] opisane w pracy nr 2).**

Publikacja 5. [Girstun A](#)[✉], Ishikawa T, Staroń K. 2019. **Effects of SRSF1 on subnuclear localization of topoisomerase I.** J Cell Biochem; DOI: 10.1002/jcb.28459 (opublikowana wersja elektroniczna, oczekuje na włączenie do odpowiedniego tomu pisma).

Publikacja nr 5 przedstawia badania mające na celu bezpośrednią weryfikację hipotezy, że SRSF1 wpływa na wewnątrzjądrowe rozmieszczenie top I.

Udowodniłam, że podział puli top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę ściśle zależy od ilości SRSF1 w komórce. Obniżenie poziomu białka SRSF1 przez wyciszenie jego genu przy wykorzystaniu specyficznego siRNA sprzyja jąderkowemu zagęszczeniu top I, a nadekspresja SRSF1 sprzyja jej zatrzymywaniu w nukleoplazmie. Innymi słowy, **im mniej SRSF1 znajduje się w komórce, tym więcej top I znajduje się w jąderkach, co sugeruje, że SRSF1 jest odpowiedzialne za rekrutację top I do nukleoplazmy.** W szczególności, SRSF1 jest odpowiedzialne za całkowitą akumulację w nukleoplazmie wariantu top I z delecją głównej sekwencji wiążącej w jąderkach, ponieważ obniżenie poziomu białka SRSF1 przywraca jąderkową lokalizację top[68-765]. Analogiczną zależność obserwowałam w przypadku top I pozbawionej aktywności relaksacyjnej (top I [Y723F]), która po wyciszeniu SRSF1 koncentrowała się w jąderkach a w komórkach o podwyższonym poziomie SRSF1 opuszczała jąderka, pozostając wyłącznie w nukleoplazmie. Ponadto udowodniłam, że **SRSF1 jest niezbędne do przemieszczania top I indukowanego przez CPT**, ponieważ w komórkach o obniżonym poziomie SRSF1 top I pozostaje skoncentrowana w jąderku w odpowiedzi na traktowanie CPT.

SRSF1 należy do rodziny białek SR. Wszystkie białka SR mają podobny wzór strukturalny, a w ich cząsteczkach można wyróżnić jedną lub dwie domeny RRM oraz C-końcową domenę RS. Chociaż białka SR są ze sobą blisko spokrewnione, nie wpływają na lokalizację top I według jednego schematu. **Obserwowany efekt wywoływany przez SRSF1 jest unikalny tylko dla tego białka.** Żaden

z pozostałych siedmiu głównych przedstawicieli rodziny SR badanych w omawianej pracy (SRSF2–7 i SRSF9) nie wpływał analogicznie jak SRSF1 na dystrybucję top I między jąderko a nukleoplazmę. Większość z nich w ogóle nie modyfikowała rozmieszczenia top I, ale niektóre (SRSF3, SRSF6, w mniejszym stopniu SRSF4) wywoływały odwrotny efekt niż SRSF1, a mianowicie, ich nadekspresja promowała koncentrację jąderkową top I. W tym przypadku obserwowany efekt nie mógł wynikać z bezpośredniego wiązania top I przez białka SR, ponieważ te ostatnie lokalizują się w nukleoplazmie a nie w jąderku. Z drugiej strony białka SR wiążą się ze sobą nawzajem, zwłaszcza kiedy są zlokalizowane w ziarnistościach interchromatynowych. Ponadto, co również pokazałam w omawianej pracy, mogą one wpływać wzajemnie na swoją lokalizację wewnątrzjądrową. To oznacza, że obserwowany efekt nadekspresji SRSF3 i SRSF6 może być konsekwencją zmniejszenia dostępności SRSF1 dla top I w wyniku wiązania go przez występujące w nadmiarze białka SR.

Zróznicowany efekt wywoływany z jednej strony przez SRSF1, a z drugiej przez SRSF3 i SRSF6 wynika ze swoistych właściwości ich domen RS. **SRSF1 wpływa w opisany sposób na rozmieszczenie top I tylko wtedy, gdy jego domena RS jest zachowana w niezmiennym stanie.**

Podsumowując badania opisane w publikacji nr 5, najważniejsze wnioski były następujące:

- 1. SRSF1 promuje przemieszczanie top I z jąderka do nukleoplazmy.**
- 2. Efekt wywoływany przez SRSF1 jest niezależny od aktywności relaksacyjnej top I.**
- 3. SRSF1 jest niezbędny do delokalizacji top I z jąderek indukowanej CPT.**

Powstaje pytanie, czy efekt wywoływany przez SRSF1 wynika z bezpośredniego oddziaływania z top I. Moje poprzednie badania wykazały, że domena RS SRSF1 wiąże się z domeną N-końcową oraz rejonem "czapeczki" top I (publikacja nr 3) i tylko polipeptyd top I zawierający oba miejsca oddziaływania z SRSF1 jest skutecznie zatrzymywany w nukleoplazmie, gdy główna sekwencja wiązania do jąderek zostaje usunięta (top[68-765], publikacja nr 4). To przemawiałoby za tym, że u podstaw obserwowanego efektu leży bezpośrednio oddziaływanie między SRSF1 i top I. Z drugiej strony, efekty wyciszenia ekspresji SRSF1 bardzo przypominają konsekwencje substytucji w domenie łącznikowej silnie koncentrujących top I w jąderku (np. A653P, praca nr 4). To podobieństwo sugerowałoby, że domena łącznikowa może być istotna dla interakcji top I z SRSF1, a wprowadzenie substytucji zaburza tę zależność, powodując efekt analogiczny do braku SRSF1. Jednak takie wiązanie nie zostało ujawnione w analizach *in vitro* (praca nr 4 i wcześniejsze prace naszego zespołu, Czubyta i in., 2005, Kowalska-Loth i in., 2005). Ponadto nie zaobserwowałam wyraźnej kolokalizacji top I i SRSF1. SRSF1 koncentruje się w ziarnistościach interchromatynowych, chociaż występuje także w innych obszarach nukleoplazmy. Przeciwnie, pełnej długości top I lokalizuje się całkowicie poza ziarnistościami, co wykazano w prezentowanych badaniach, a ponadto nigdy nie została wykryta w proteomie ziarnistości (Galganski i in., 2017). Dlatego nie można wykluczyć, że za wpływ SRSF1 na lokalizację top I jest odpowiedzialny jednak jakiś mechanizm pośredni lub SRSF1 jest dostępny dla wiązania z top I tylko po wcześniejszym uwolnieniu z ziarnistości interchromatynowych.

Uzyskane wyniki prowadzą też do postawienia pytania o fizjologiczne znaczenie wpływu SRSF1 na lokalizację top I. W normalnie funkcjonującej komórce nie należy raczej oczekiwać nagłych zmian w całkowitym poziomie SRSF1, które mogłyby istotnie zmodyfikować rozmieszczenie top I (Su i in., 2010). Jednak nie tylko sam poziom SRSF1 jest ważny dla dystrybucji top I, ale także stosunki ilości różnych białek SR. Te proporcje różnią się w różnych tkankach, jak również w różnych nowotworach (np. Hanamura i in., 1998, Park i in., 2016). Zatem rozmieszczenie wewnątrzjądrowe top I i szybkość

przemieszczania indukowanego CPT mogą być różne w różnych komórkach w zależności od proporcji białek SR.

Inną intrygującą możliwością jest to, że regulacyjny wpływ SRSF1 na wewnątrzjądrową lokalizację top I nie zależy od zmian bezwzględnej ilości SRSF1, ale od zmian jego rozmieszczenia w jądrze. Jak wspomniano wyżej, SRSF1 jest składowany w ziarnistościach jądrowych, gdzie pozostaje prawdopodobnie niedostępny dla top I, ale przemieszcza się do innych obszarów nukleoplazmy, w tym do miejsc, gdzie zachodzi splicingu lub transkrypcja DNA. Uwalnianie SRSF1 z ziarnistości sprawia, że staje się on dostępny dla top I i może przyciągać enzym do nukleoplazmy, szczególnie do miejsc intensywnej transkrypcji. Ta hipoteza jest zgodna z wiedzą o współdziałaniu SRSF1 i top I w ochronie genomu przed zagrożeniami wywoływanymi przez powstające podczas transkrypcji pętle R.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć.

- 1. Udowodniłam, że rozmieszczenie top I jest regulowane przez sieć oddziaływań, które wzajemnie się równoważą.**
- 2. Przeanalizowałam systematycznie cząsteczkę białka top I i zidentyfikowałam rejony odpowiedzialne za jej wiązanie w jąderku lub nukleoplazmie oraz przemieszczanie indukowane przez CPT. W szczególności, po raz pierwszy wykazałam, że domena łącznikowa jest krytyczna dla dystrybucji top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i stresowych, a fragment obejmujący pierwsze 67 reszt aminokwasowych top I jest główną sekwencją wiążącą top I w jąderku.**
- 3. Zidentyfikowałam SRSF1 jako nowy element sieci interakcji i pierwszy znany czynnik białkowy wpływający na podział puli top I pomiędzy jąderko a nukleoplazmę w komórkach ludzkich i faworyzujący jej lokalizację nukleoplazmatyczną.**
- 4. Udowodniłam, że SRSF1 jest niezbędny dla przemieszczania top I z jąderka do nukleoplazmy w odpowiedzi na CPT.**
- 5. Wykazałam po raz pierwszy, że aktywność relaksacyjna nie jest dominującym czynnikiem determinującym zagęszczenie jąderkowe top I, ale wpływa na jej rozmieszczenie tylko wtedy, gdy jest zrównoważona sieć oddziaływań nieenzymatycznych.**

Podsumowując, aktualny stan wiedzy dotyczący rozmieszczenia wewnątrzjądrowego top I, uzupełniony moimi badaniami, przedstawia się następująco. Top I będąc w ciągłym ruchu na terenie jądra komórkowego, jest spowalniana w różnych jego obszarach dzięki wiązaniu do składników jąderkowych lub nukleoplazmatycznych. Głównie dwie domeny top I są odpowiedzialne za utrzymanie sieci oddziaływań: domena N-końcowa i łącznikowa. W zatrzymywaniu na terenie nukleoplazmy przynajmniej częściowo pośredniczy SRSF1. Gdy oddziaływania jąderkowe i nukleoplazmatyczne są zrównoważone i niezakłócone, aktywność relaksacyjna zapewnia precyzyjne dopasowanie lokalizacji top I zależnie od zapotrzebowania na jej działanie w różnych obszarach jądra. Jednakże, w warunkach silnie faworyzujących jeden rodzaj oddziaływań i zaburzających równowagę w sieci, aktywność relaksacyjna przestaje wpływać na rozmieszczenie top I.

Ogólne znaczenie badań, perspektywy i plany na przyszłość.

Jak już wspomniano wcześniej, fascynującą cechą jąderka jest to, że jego strukturę ustalają proste fizyczne zasady samoorganizacji, chociaż kontrolują ją bardziej złożone reakcje biochemiczne zachodzące zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz jąderka. W związku z powyższym, dopiero ukierunkowane badania reguł wiązania i przemieszczania poszczególnych białek jąderkowych umożliwią zbudowanie pełnego obrazu jąderka i jego kooperacji z nukleoplazmą. Prezentowane tu badania dystrybucji top I między różnymi przedziałami jądroowymi przyczyniają się do poszerzenia wiedzy niezbędnej do zbudowania takiego obrazu.

Jednak nie na wszystkie pytania dotyczące rozmieszczenia top I znamy już odpowiedzi. Nadal niejasny pozostaje mechanizm prowadzący do zagęszczenia top I w jąderku. W opisywanych badaniach wykazałam, że dominującą rolę odgrywa krótki fragment domeny N-końcowej. Wiadomo o nim, że nie jest wymagany do wydajnego wiązania enzymu z DNA, co sugeruje, że o kotwiczeniu top I decydują prawdopodobnie oddziaływania z innym(i) białkiem(ami) jąderkowym(i). Wiele przemawia za tym, że wiązanie top I odbywa się za pośrednictwem albo samej polimerazy I RNA, albo kompleksujących z nią białek (Christensen i in., 2002a), ale dotychczas nie udało się zidentyfikować białek bezpośrednio odpowiedzialnych za zatrzymywanie top I w jąderku. Ponadto nie wiadomo, czy na lokalizację top I wpływa również jej aktywność kinazowa, podobnie jak to ma miejsce w przypadku aktywności relaksacyjnej. Weryfikacja tej kwestii jest mocno utrudniona, ponieważ nie została poznana struktura miejsca aktywnego top I/kinazy, co praktycznie uniemożliwia zaprojektowanie punktowego mutantu nieaktywnego w reakcji fosforylacji, którego należałoby wykorzystać w takich badaniach.

Opisane badania pokazały również, że dostępność białka SRSF1 jest niezbędna dla delokalizacji jąderkowej top I indukowanej CPT. Pochodne CPT są stosowane jako leki przeciwnowotworowe, a różne typy nowotworów różnią się między sobą poziomem SRSF1, szczególnie w wielu obserwuje się podwyższenie ekspresji tego białka (np.: Ghigna i in., 1998, Gout i in., 2012). To rodzi pytanie, czy różne typy nowotworów, o których wiadomo, że znacząco różnią się ekspresją SRSF1, różnią się również lokalizacyjną odpowiedzią top I na leki z grupy CPT i czy przekłada się to na wrażliwość komórek na te związki.

Rozważając wpływ SRSF1 na lokalizację top I warto mieć w pamięci, że oba białka ściśle współdziałają przy zabezpieczaniu genomu przed uszkodzeniami związanymi z powstawaniem pętli R. Trzeci białkowy element tego systemu, RNaza H1, nie kieruje bezpośrednio top I do określonego przedziału ani jądrowego, ani nie jest przez nią kierowany, ale występowanie obu enzymów jest negatywnie skorelowane (Shen i in. 2017). Na przykładzie top I widać zatem, jak różnego typu współzależności decydują o ostatecznej lokalizacji białka w strukturach jądrowych. Usunięcie lub inna modyfikacja jednego elementu sieci oddziaływań może działać jak kamyk wywołujący lawinę zmian. Te współzależności wydają się szczególnie istotne dla przebiegu tzw. stresu jąderkowego. Terminem stres jąderkowy obecnie określa się zaburzenia morfologii i funkcji jąderek indukowane zróżnicowanymi czynnikami stresowymi, które wpływają negatywnie na biogenezę rybosomów (transkrypcję rDNA lub dalsze procesowanie rybosomów) a ostatecznie prowadzą do zaburzenia homeostazy całej komórki (James i in., 2014). Temu procesowi towarzyszy znaczące przebudowanie struktur jąderkowych lub nawet ich dezintegracja. O ile w optymalnych warunkach fizjologicznych zachodzi ciągła wymiana białek między jąderkiem a nukleoplazmą na pewnym podstawowym poziomie, to w warunkach stresowych przemieszczanie znacząco się intensyfikuje, a białka

delokalizują się do nukleoplazmy lub grupują w postaci nowych struktur na obrzeżach jąder. Mimo że przemieszczanie się niektórych białek, takich jak nukleofosmina (inaczej B23), z jąder do nukleoplazmy jest uznawane za uniwersalny znak rozpoznawczy przebiegającego stresu jąderkowego, to jednak kolejność odpowiedzi poszczególnych białek zależy od rodzaju czynnika stresowego (James i in., 2014).

Coraz więcej przemawia za tym, że w odpowiedzi jąder na czynniki stresowe istotne miejsce zajmuje top I. Uderzające jest, że koncentracja jąderkowa top I jest bardzo niestabilna i nie tylko traktowanie CPT, ale suboptymalne warunki wzrostu skutkują jej przemieszczeniem do nukleoplazmy nawet w sytuacji, gdy nie obserwuje się jeszcze innych zaburzeń struktury jąder ani ogólnego funkcjonowania komórek (niepublikowane obserwacje własne). Aktywność top I jest niezbędna do transkrypcji rDNA i tym samym dla zachowania struktury jąder, a jej niedobór w jąderkach hamuje transkrypcję, co rozpoczyna proces ich reorganizacji (El Hage i in., 2010). Mechanizm odpowiedzi top I na zróżnicowane czynniki stresowe pozostaje nieznan.

Rola top I w odpowiedzi na czynniki stresowe oraz szerzej, zagadnienia związane ze współzależnością zmian rozmieszczenia białek w przebiegu stresu jąderkowego są tematem, który obecnie interesuje mnie najbardziej i któremu chcę poświęcić swoje przyszłe badania.

Bibliografia.

Alsner J, Svejstrup JQ, Kjeldsen E, Sørensen BS, Westergaard O. 1992. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem* 267:12408-12411.

Capranico G, Marinello J, Chillemi G. 2017. Type I DNA topoisomerases. *J Med Chem* 60:2169-2192.

Christensen MO, Barthelmes HU, Boege F, Mielke C. 2002a. The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes. *J Biol Chem* 277:35932-35938.

Christensen MO, Barthelmes HU, Feineis S, Knudsen BR, Andersen AH, Boege F, Mielke C. 2002b. Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerase I. *J Biol Chem* 277:15661-15665.

Christensen MO, Krokowski RM, Barthelmes HU, Hock R, Boege F, Mielke C. 2004. Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem* 279:21873-21882.

Czubaty A, Girstun A, Kowalska-Loth B, Trzcińska AM, Purta E, Winczura A, Grajkowski W, Staroń K. 2005. Proteomic analysis of complexes formed by human topoisomerase I. *Biochim Biophys Acta* 1749:133-141.

El Hage A, French SL, Beyer AL, Tollervey D. (2010) Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev* 24:1546-1558.

Gałganski L, Urbanek MO, Krzyżosiak WJ. 2017. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res* 45:10350-10368.

Ghigna C, Moroni M, Porta C, Riva S, Biamonti G. 1998. Altered expression of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and SR factors in human colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 58:5818-5824.

- Gout S, Brambilla E, Boudria A, Drissi R, Lantuejoul S, Gazzeri S, Eymen B. 2012. Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS ONE* 7:e46539.
- Hanamura A, Cáceres JF, Mayeda A, Franza BR Jr, Krainer AR. 1998. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* 4:430-444.
- James A, Wang Y, Raje H, Rosby R, DiMario P. 2014. Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus* 5:402-426.
- Juge F, Fernando C, Fic W, Tazi J. 2010. The SR protein B52/SRp55 is required for DNA topoisomerase I recruitment to chromatin, mRNA release and transcription shutdown. *PLoS Genet* 6:e1001124.
- Keshwani MM, Aubol BE, Fattet L, Ma CT, Qiu J, Jennings PA, Fu XD, Adams JA. 2015. Conserved proline-directed phosphorylation regulates SR protein conformation and splicing function. *Biochem J* 466:311-322.
- Kowalska-Loth B, Girstun A, Trzcińska-Daneluti AM, Piekielko-Witkowska A, Staroń K. 2005. SF2/ASF protein binds to the cap region of human topoisomerase I through two RRM domains. *Biochem Biophys Res Commun* 331:398-403.
- Labourier E, Rossi F, Gallouzi IE, Allemand E, Divita G, Tazi J. 1998. Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res* 26:2955-2962.
- Li M, Pokharel S, Wang JT, Xu X, Liu Y. 2015. RECQ5-dependent SUMOylation of DNA topoisomerase I prevents transcription-associated genome instability. *Nat Commun* 6:6720.
- Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, Sala A, Collina S. 2017. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorg Med Chem Lett* 27:701-707.
- Németh A, Grummt I. 2018. Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Curr Opin Cell Biol* 52:105-111.
- Park WC, Kim HR, Kang DB, Ryu JS, Choi KH, Lee GO, Yun KJ, Kim KY, Park R, Yoon KH, Cho JH, Lee YJ, Chae SC, Park MC, Park DS. 2016. Comparative expression patterns and diagnostic efficacies of SR splicing factors and HNRNPA1 in gastric and colorectal cancer. *BMC Cancer* 16:358.
- Rallabhandi P, Hashimoto K, Mo YY, Beck WT, Moitra PK, D'Arpa P. 2002. Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J Biol Chem* 277:40020-40026.
- Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WGJ. 1998. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science* 279:1504-1513.
- Rossi F, Labourier E, Forne T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J. 1996. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* 381:80-82.
- Shen W, Sun H, De Hoyos CL, Bailey JK, Liang XH, Crooke ST. 2017. Dynamic nucleoplasmic and nucleolar localization of mammalian RNase H1 in response to RNAP I transcriptional R-loops. *Nucleic Acids Res* 45:10672-10692.
- Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ. 2014. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev* 28:1384-96.

Staněk D, Fox AH. 2017. Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 46:94-101.

Sun S, Zhang Z, Sinha R, Karni R, Krainer AR. 2010. SF2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nat Struct Mol Biol* 17:306-312.

Thielmann HW, Popanda O, Staab HJ. 1999. Subnuclear distribution of DNA topoisomerase I and Bax protein in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts after irradiation with UV light and gamma rays or treatment with topotecan. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:193-208.

Wright CM, van der Merwe M, DeBrot AH, Bjornsti MA. 2015. DNA topoisomerase I domain interactions impact enzyme activity and sensitivity to camptothecin. *J Biol Chem* 290:12068-12078.

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze.

Moje główne zainteresowania badawcze od początku skupiają się wokół funkcjonowania ludzkiej top I. Swoją pracę naukową rozpoczynałam w zespole kierowanym przez prof. dr. hab. Krzysztofa Staronia, przygotowując pracę doktorską poświęconą analizie wpływu białek wiążących się do top I, SRSF1 i kinazy białkowej CK2, na jej aktywność relaksacyjną i powiązaną z nią wrażliwość na CPT. Udowodniłam w niej, że SRSF1, substrat aktywności kinazowej top I, wpływa bezpośrednio na aktywność relaksacyjną, hamując wytwarzanie kompleksu kowalencyjnego enzym-DNA, który to efekt dodatkowo przekłada się na obniżenie indukowanej przez CPT fragmentacji DNA. Ponadto wykazałam, że kinaza CK2 stymuluje aktywność relaksacyjną top I, niezależnie od jej fosforylacji, wyłącznie na drodze oddziaływań typu białko-białko. Wyniki te weszły w skład dwóch artykułów naukowych. Oprócz badań wykonywanych w ramach projektu doktoranckiego, byłam również zaangażowana w inne prace zespołu, głównie poświęcone oddziaływaniom top I z innymi białkami jądrowymi oraz jej funkcjonowaniu jako kinaza białek SR. Badania te kontynuowałam również po zakończeniu studiów doktoranckich, a w efekcie prac naszego zespołu nad tą tematyką powstały cztery publikacje, których byłam współautorką. Za główne swoje osiągnięcie z tego okresu uważam zidentyfikowanie dzięki analizie proteomicznej białek tworzących kompleksy z top I w jądrach komórek HeLa. Inne badania, w których brałam udział, doprowadziły do zidentyfikowania rejonów top I, do których wiążą się kompleksujące z nią białka, a przede wszystkim do szczegółowego opisu wiązania SRSF1 i top I. Zapoczątkowałam również współpracę naukową naszego zespołu z dr Marią Malangą z Uniwersytetu Neapolitańskiego, którą następnie kontynuowała głównie dr Alicja Czuby. Współpraca ta dotyczyła opisanie roli poli(ADP-rybozy) w regulacji fosforylacji SRSF1 przez top I. Prace poświęcone top I, w których brałam udział, zostały trzykrotnie wyróżnione zespołową Nagrodą Rektora Uniwersytetu Warszawskiego, a ja przez rok otrzymywałam dodatkowo stypendium naukowe Rektora UW.

Ponadto byłam także zaangażowana w projekty naukowe prowadzone przez inne zespoły badawcze, zarówno z macierzystego Instytutu Biochemii UW, jak i innych jednostek naukowych. Każdy z nich zakończył się opublikowaniem przynajmniej jednej pracy eksperymentalnej, w której byłam współautorką. Projekty, w jakich brałam udział, były następujące:

- Projekt dr Joanny Trzcńskiej-Danielewicz, z Zakładu Biologii Molekularnej, Instytutu Biochemii, Wydziału Biologii, UW, poświęcony współdziałaniu podawanego egzogennie białka BID z doksorubicyną w uśmiercaniu komórek nowotworowych. Współpraca zaowocowała opublikowaniem jednej oryginalnej pracy eksperymentalnej.

- Projekt prof. dr hab. Jadwigi Bryły z Zakładu Regulacji Metabolizmu, Instytutu Biochemii, Wydziału Biologii, UW, poświęcony badaniom metabolicznym wpływu peptydu C proinsuliny na syntezę glukozy. Współpraca zaowocowała opublikowaniem jednej oryginalnej pracy eksperymentalnej.
- Projekt prof. dr hab. Agnieszki Bzowskiej z Zakładu Biofizyki, Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydziału Fizyki, UW poświęcony badaniom struktury i molekularnego mechanizmu działania fosforylasy nukleozydów purynowych. Współpraca zaowocowała opublikowaniem czterech oryginalnych prac eksperymentalnych oraz dodatkowo dwóch artykułów pokonferencyjnych.
- Projekt prof. dr hab. Magdaleny Maj-Żurawskiej i dr Hanny Elżanowskiej z Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Chemii, UW, poświęcony elektrochemicznej analizie oddziaływania różnych form topologicznych DNA z interkalującymi lekami przeciwnowotworowymi. Współpraca zaowocowała opublikowaniem jednej oryginalnej pracy eksperymentalnej oraz rozdziału w monografii naukowej.
- Projekt dr hab. Agnieszki Michoty-Kamińskiej z Instytutu Chemii Fizycznej, PAN, poświęcony wykrywaniu i identyfikacji komórek nowotworowych przy zastosowaniu spektroskopii Ramana. Współpraca ta, mimo że rozpoczęta niespełna rok temu, zaowocowała już opublikowaniem dwóch artykułów eksperymentalnych i jednym zgłoszeniem patentowym.

Podsumowując, moja dodatkowa aktywność naukowo-badawcza zaowocowała do tej pory 16 publikacjami eksperymentalnymi (nie licząc prac przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne), z których trzy ukazały się przed uzyskaniem stopnia doktora. Wszystkie artykuły były recenzowane i zostały opublikowane w anglojęzycznych czasopiśmie indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*. Ponadto jestem współautorką rozdziału w polskojęzycznej monografii i polskojęzycznej pracy przeglądowej. Wykaz wszystkich prac wraz z dokładnym opisem mojego wkładu w ich powstanie można znaleźć w załączniku nr 5.

Agnieszka Girstun