



Warszawa dn.12.07.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Jagiełło-Flasińskiej
„Wpływ sumoilacji na reakcje kontrolowane przez fototropiny”

Rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Jagiełło-Flasińskiej została zrealizowana w laboratorium kierowanym przez Prof. Halinę Gabryś, eksperta w tematyce percepcji światła przez rośliny i odpowiedzi roślin na zmiany warunków świetlnych.

Głównym celem badań prowadzonych przez Panią mgr Dominikę Jagiełło-Flasińską było poznanie mechanizmów regulacji fototropin i procesów przez nie kontrolowanych. W swych badaniach Doktorantka skupiła się na sumoilacji fototropin - wykazaniu, że fototropina1 może być sumoilowana oraz zbadaniu wpływu sumoilacji na działanie fototropin. Badania sumoilacji fototropin były zainicjowane kilka lat temu przez byłą doktorantkę Prof. Haliny Gabryś - dr Olgę Sztatelman. Wyniki Pani dr Olgi Sztatelman były na tyle obiecujące, że oczywistym była kontynuacja tych badań.

Badania regulacji percepcji światła i konsekwencji tej regulacji, w których uczestniczyła Pani mgr Dominika Jagiełło-Flasińska są niezwykle ważne, gdyż światło jest nieodzowne do życia roślin, a mechanizmy regulacji odpowiedzi roślin na światło są ciągle tylko w niewielkim stopniu poznane. Receptorami światła niebieskiego oraz UV-A są kryptochromy, rodzina białek Zeitlupe oraz fototropiny, którym została poświęcona niniejsza rozprawa. Fototropiny to kinazy białkowe regulujące fototropizm, ruchy liści, chloroplastów i jąder komórkowych, otwieranie aparatów szparkowych, jak również poziom wapnia w cytoplazmie w odpowiedzi roślin na zmienne warunki oświetlenia. Tym samym pełnią kluczową rolę w regulacji wydajności fotosyntezy, rozwoju i wzroście roślin. U *Arabidopsis thaliana* są dwie fototropiny, phot1 i phot2, funkcjonujące w różnych zakresach natężenia światła, phot1 - niższych, a phot2 -

wyższych, co przypuszczalnie przyczynia się do pewnych różnic ich roli w odpowiedzi rośliny na światło, np. tylko phot2 jest zaangażowana w reakcję ucieczki chloroplastów i jąder komórkowych w odpowiedzi na wysokie natężenie światła.

Rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Jagiełło-Flasińskiej napisana została w formie monografii, podzielonej tradycyjnie na Wstęp, Cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie wyników i Spis literatury. Ponadto, Doktoranka załączyła streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, spis stosowanych skrótów oraz Dodatek, w którym zamieściła wykaz starterów, plazmidów stosowanych w systemie rekonstrukcji sumoilacji w bakteriach, spis rutynowo używanych odczynników oraz opis niektórych z podstawowych metod, które wykorzystywała w pracy.

Wstęp (23 strony) stanowi wprowadzenie do świata fotoreceptorów roślinnych oraz sumoilacji białek. W pierwszej części dotyczącej fotoreceptorów Doktorantka najwięcej uwagi poświęciła fototropinom, co jest w pełni zrozumiałe. Opisała budowę oraz dotychczas poznane mechanizmy regulujące aktywność fototropin i zmiany ich lokalizacji pod wpływem światła. Następnie opisała zwięźle rolę fototropin skupiając się na głównych zjawiskach, w których fototropiny pełnią kluczową rolę tzn. otwieraniu aparatów szparkowych, ruchach chloroplastów i fototropizmie.

Druga część wstępu poświęcona została sumoilacji. Doktorantka opisała poszczególne etapy procesu sumoilacji, enzymy biorące w nim udział w komórkach roślinnych oraz przedstawiła zwięźle informacje na temat roli sumoilacji w rozwoju i wzroście roślin oraz w odpowiedzi roślin na stres. Następnie opisała motywy w białkach, w obrębie których występować może sumoilacja oraz te, poprzez które białka SUMO oddziałują z białkami docelowymi, ulegającymi sumoilacji.

Cele pracy zostały jasno określone.

Rozdziały Materiały i Metody (13 stron) i Dodatek (7 stron) zostały opracowane bardzo starannie.

Wyniki stanowią najobszerniejszą (31 stron) część rozprawy.

Wstępne wyniki sumoilacji fototropiny² były wcześniej opisane w rozprawie doktorskiej dr Olgi Sztatelnam dlatego też w swojej pracy Pani mgr Dominika Jagiełło-Flasińska skupiła się przede wszystkim na analizie fototropiny¹, jako celu sumoilacji.

Doktorantka wykorzystując dostępne narzędzia bioinformatyczne zidentyfikowała potencjalne miejsca sumiolacji w fototropinie¹ oraz miejsca interakcji z SUMO. Przewidywane miejsca sumoilacji znajdowały się w N-końcowej części fototropiny, natomiast miejsca interakcji z SUMO w C-końcowej.

W tym miejscu nasunęło mi się pytanie. Czy należy rozumieć, że miejsca interakcji przewidziane były nieprawidłowo, czy są trudne do przewidzenia za pomocą dostępnych programów lub takich miejsc nie ma w fototropinie¹?

Następnie Pani Dominka Jagiełło-Flasińska podjęła próbę rekonstrukcji w układzie bakteryjnym procesu sumoilacji N-końcowego fragmentu phot1, w którym przewidywane były miejsca sumoilacji. Do sumoilacji wykorzystywano białka SUMO z dwiema glicynami na C-końcu, które są miejscem przyłączenia substratu, lub jako kontrolę negatywną białka SUMO z dwiema alaninami na C-końcu. Doktorantka wykazała, że phot1 jest sumoilowana w układzie bakteryjnym. Uzyskane wyniki wskazują ponadto na różnice w sumoilacji przy udziale ligaz MMS21 i SIZ1. Opis wyników wskazuje, że ligaza MMS21 przyłącza do phot1 białka SUMO2, SUMO3 i SUMO5, natomiast ligaza SIZ1 - SUMO1, SUMO2 i SUMO5.

Podsumowując - wyniki sumoilacji w układzie bakteryjnym wskazują, że faktycznie fotropina¹ może być modyfikowana przez sumoilację oraz sugerują różnice w specyficzności działania MMS21 i SIZ1.

Jednakże, patrząc na wyniki sumoilacji w układzie bakteryjnym mam pewne wątpliwości, czy nie zaistniała tu jakaś pomyłka. Zadziwia bowiem fakt, że w przypadku użycia ligazy MMS21 nie obserwowano sumoilacji phot1 (N-końcowego fragmentu) przez białko SUMO1GG, natomiast wydajnie przyłączało się białko SUMO1AA. Nawet biorąc pod uwagę fakt, że w tym układzie może przyłączać się SUMO1AA, to trudno wytłumaczyć dlaczego nie przyłączyła się prawidłowa wersja białka - SUMO1GG. Wynik ten nie jest zgodny w innymi wynikami opisanymi przez Doktorantkę w dalszych częściach rozprawy. Dyskusja tego wyniku w Dyskusji rozprawy nie jest przekonująca.

Następnie Doktorantka zbadała oddziaływanie pomiędzy phot1 i białkami SUMO *in planta*, wykorzystując metodę bimolekularnej komplementacji fluorescencji (BiFC). Wykazała oddziaływanie SUMO1, SUMO2 i SUMO3 z fototropiną1, jak również fototropiny1 z ligazami MMS21 i SIZ1. Nie obserwowano natomiast oddziaływania phot1 z SUMO5. Ten ostatni wynik ten można jednocześnie uznać za kontrolę negatywną metody. Czytając tę część pracy byłam zdziwiona widząc, oddziaływanie phot1 z ligazami SUMO w jądrze. Wynik ten został bardzo dobrze przedyskutowany w Dyskusji.

Przedstawione wyniki nie wzbudzają wątpliwości, że w roślinie fototropina1 może być sumoilowana.

Ważnym etapem badań było sprawdzenie wpływu zaburzeń procesu sumoilacji w roślinie na poziom fototropiny1 i fototropiny2 (w ciemności i na świetle) oraz na procesy przez nie regulowane. W roślinach *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego oraz mutantach: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3* i *Atsum5*, (mutacje w genach kodujących białka SUMO) jak również *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpia1* i *Atpia2* (mutacje w genach kodujących ligazy SUMO) Doktorantka przeanalizowała poziom białek PHOT1 i PHOT2 oraz ekspresję kodujących je genów. Następnie analizowała ruchy chloroplastów pod wpływem zmian oświetlenia (zarówno światła ciągłego o stopniowo wzrastającym natężeniu, jak i krótkich impulsów światła niebieskiego). Badane były zmiany w roślinach typu dzikiego, mutantach *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpial1* i *Atpial2* (mutacje w genach kodujących ligazy SUMO) oraz w mutantach podwójnych mutacje w genach fototropin oraz ligaz SUMO *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1*.

Ostatnim zadaniem badawczym była analiza fototropizmu w mutantach o zaburzonej sumoilacji. Fototropizm badano w roślinach typu dzikiego i w mutantach: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*, *Atmms21*, *Atsiz1*, *Atpial1*, *Atpial2* oraz w mutantach podwójnych: *Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1*.

Wyniki tych badań wykazały, że sumoilacja bezpośrednio lub pośrednio może regulować poziom fototropin, jak również reakcje rośliny na światło zależne od fototropin.

W tym miejscu chciałam podkreślić ogrom pracy wykonanej przez Doktorantkę w trakcie realizacji opisanych badań oraz różnorodność zastosowanych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej oraz fizjologii roślin.

W Dyskusji (13 stron) doktorantka przedyskutowała uzyskane wyniki na tle danych literaturowych. Dyskusja świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury przez Panią mgr Dominikę Jagiełło-Flasińską .

Drobne uwagi dotyczące rozprawy przedstawiłam w osobnym dokumencie.

Podsumowując, stwierdzam, że wyniki przedstawione w pracy stanowią znaczący wkład w poznanie mechanizmów regulacji odpowiedzi rośliny na światło i procesu sumoilacji w komórkach roślinnych. Omawiana praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Dominiki Jagiełło-Flasińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Grażyna Dobrowolska

Uwagi/ pytania dotyczące Rozprawy

Uwagi do Wstępu:

1. Na stronie 16 napisano „Z kolei w warunkach silnego światła, reakcje sterowane przez phot2 pozwalają ochronić aparat fotosyntetyczny (Park et al., 1996; Kasahara et al., 2002; Sztatelman et al., 2010) i DNA jądrowe przed uszkodzeniami (Iwabuchi et al., 2007).” Szkoda, że nie zaznaczono, że phot2 nie tylko pozycjonuje chloroplasty, ale również i jądra, ponadto może być to efekt niezależny od chloroplastów. Bez tej informacji wydaje się dziwne dlaczego phot2 ochrania specyficznie DNA jądrowe a nie wszystkie rodzaje DNA, także chloroplastowe i mitochondrialne.

2. Zabrakło mi omówienia we wstępie niektórych świetnych prac z ostatnich lat dotyczących fototropin np. prac z laboratorium prof. Shimazaki, w których dużo uwagi poświęcono omówieniu mechanizmu otwierania aparatów szparkowych, w którym uczestniczą fototropiny. W rozprawie jest to mały rozdział, w którym cytowane są tylko dość stare prace, z roku 2001. Zabrakło mi najnowszych informacji m.in. na temat niektórych substratów fototropin np. kinazy BLUS1, Takemiya et al., 2013, Nature Communications; oraz informacji na temat aktywacji phot1 w mikrodomenach bogatych w sterole (Xue et al., 2018, Molecular Plant).

Str. 28 „Zmniejszenie wrażliwości fototropicznej na lateralne naświetlanie światłem niebieskim oraz zmniejszenie kątów wygięcia fototropicznego po traktowaniu światłem czerwonym, po raz pierwszy opisał u owsa Curry.”- brak cytowania do tej pracy.

Uwagi/Pytania dotyczące Wyników

1. W tekście znajduje się zdanie: „Badano zatem modyfikację N-końcowego fragmentu fototropiny1 (1-662 aa), który został wybrany według pracy Aihara et al., 2008.” Na czym polegał ten wybór?

W Dyskusji znalazło się zdanie „Biorąc pod uwagę silny fenotyp mutantu Atsiz1 oraz udział ligazy SIZ1 w modyfikacji fototropiny1 przez SUMO1 i SUMO2 można spekulować,

że ligaza ta bierze udział w ścieżce przekazu sygnału świetlnego u roślin.” Jak wygląda fenotyp *Atsiz1*?