



Poznań, 20 czerwca 2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Dominiki Jagiełło-Flasińskiej
pt. „Wpływ sumoilacji na reakcje kontrolowane przez fototropiny”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Haliny Gabryś**

Rośliny rozwinęły wiele odpowiedzi, które pozwalają im adaptować się do zmiennych warunków środowiska. Jedną z nich jest fototropizm, który umożliwia dostosowanie wzrostu i rozwoju roślin do zmian natężenia światła, jego jakości i kierunku. Percepcja światła ma miejsce z udziałem wyspecjalizowanych fotoreceptorów. Takich jak fototropiny, kinazy białkowe o niebagatelnej funkcji dla pozycjonowania liści, otwierania aparatów szparkowych oraz przemieszczania się chloroplastów. Jak wszystkie dotychczas poznane kinazy białkowe również fototropiny podlegają regulacji przez modyfikacje potranslacyjne. Szczególnie ciekawym kierunkiem tych badań jest analiza sumoilacji w kontekście funkcjonowania fototropin. Przez sumoilację należy rozumieć kowalencyjne przyłączenie białka SUMO do innego białka. Podobnie jak ubikwitynacja, sumoilacja zachodzi również dzięki dedykowanemu zestawowi enzymów: E1, E2 i E3. Zazwyczaj substraty białkowe zawierają pojedyncze ugrupowanie SUMO, ale zidentyfikowano również łańcuchy SUMO. Obecnie nie jest jasne, jak bardzo rozpowszechnione są łańcuchy SUMO i jak regulowane jest ich powstawanie. Regułą jest z kolei to, że zarówno mono- jak i polisumoilacja istotnie wpływają na funkcjonowanie modyfikowanego białka w komórce. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Dominiki Jagiełło-Flasińskiej wpisuje się w nurt tych niezwykle interesujących i ważnych badań. W swojej pracy Autorka analizowała czy sumoilacja istotnie reguluje funkcjonowanie fototropiny-1 (PHOT1).

Ocena formalna

Rozprawa doktorska Pani Dominiki Jagiełło-Flasińskiej ma klasyczny układ. Praca liczy 123 strony, jest napisana w języku polskim, zawiera 35 rysunków i 10 tabel. Rozprawa zawiera dwa wymagane prawem streszczenia (w j. polskim i j. angielskim), 15 stronicowy wstęp, dokładnie zarysowany cel pracy, opis metod, spis materiałów, uzyskane wyniki i zwięzłą dyskusję. W



rozprawie zawarto także krótkie podsumowanie, dodatek, spis literatury oraz szczegółowy wykaz skrótów.

Cel rozprawy i najważniejsze wyniki

Celem badań Doktorantki była analiza sumoilacji fototropiny-1 oraz zbadanie wpływu tej modyfikacji potranslacyjnej na wybrane reakcje fizjologiczne kontrolowane przez fototropiny 1 i 2. Opis celu poprzedza „wstęp”, w którym Autorka przedstawia podstawowe informacje o fotoreceptorach, a także o budowie, lokalizacji i mechanizmie akumulacji białek fototropin. W tym rozdziale znajdujemy wnikliwy przekaz dotyczący wybranych odpowiedzi fototropinowych, w tym szczególnie interesujący opis mechanizmów przemieszczania się chloroplastów. Ta część rozprawy zawiera istotne informacje w powiązaniu z tematem pracy, świadcząc o usystematyzowanej wiedzy Autorki w tym zakresie. W dalszej części tego rozdziału natrafiamy na szeroki opis mechanizmu sumoilacji oraz odniesienie do regulacji ścieżki sygnału świetlnego u roślin wyższych przez modyfikację białkiem SUMO. Ten fragment pracy pomimo, że został przedstawiony w encyklopedycznym ujęciu, uzasadnia wybór linii genetycznych do badań prowadzonych przez Doktorantkę.

Do realizacji celu rozprawy Doktorantka wykorzystwała szeroki wachlarz metod: bioinformatycznych, molekularnych proteomicznych, mikroskopowych, biochemicznych i genetycznych. Zastosowanie wyżej wymienionych metod było w pełni uzasadnione. Rozdział zawiera opis materiału badawczego, wyżej wymienionych technik, składy odczynników i zestawienia konstruktów wektorowych. Opisy metod są typowe dla tego rodzaju prac. Na uznanie zasługuje liczba metod badawczych, które zostały przyswojone przez Doktorantkę podczas realizacji tej pracy.

Rozdział wyniki zawiera kilkanaście starannie zaplanowanych doświadczeń, w których Autorka analizowała: 1) miejsca sumoilacji fototropiny-1 metodą bioinformatyczną oraz z wykorzystaniem systemu sumoilacji *in vivo* w bakteriach; 2) oddziaływania pomiędzy fototropiną-1 a białkami SUMO, ligazami E3 SUMO: SIZ1 i HPY2, oraz ligazami E4: PIAL1 i PIAL2; 3) badała ekspresję genów i poziom białka badanych fototropin w mutantach szlaku

sumoilacji; oraz 4) ruchy chloroplastów i fototropizm w mutantach szlaku sumoilacji oraz w mutantach podwójnych - fototropinowych i ligaz SUMO.

Do najważniejszych wyników rozprawy zaliczam:

- niezwykle interesującą obserwację, że PHOT1 niekowalencyjnie oddziałuje z białkami SUMO1-3 co wskazuje albo na zdolność fototropin do oddziaływania z łańcuchami SUMO (także mieszanymi) albo na inną niekanoniczną funkcję SUMO, przypuszczalnie sygnałową, w regulacji funkcjonowania PHOT1; oraz
- obserwację, że sumoilacja reguluje odpowiedź fototropiczną u *Arabidopsis*, która wydaje się być zależna głównie od PHOT1. Ta część pracy otwiera nową ścieżkę w badaniach nad funkcjonowaniem fototropin u roślin, a w szczególności ich regulacji przez enzymy E2 oraz ligazy SUMO.

W rozdziale dyskusja Doktorantka omawia uzyskane wyniki w odniesieniu do założonych celów i komentuje je w relacji do opublikowanych już obserwacji innych naukowców. W mojej opinii ten rozdział świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Uwagi krytyczne:

1) Pomimo, że Doktorantka w rozprawie zawarła pokaźny spis publikacji, zarówno we „wstępie” jak i „dyskusji” zabrakło odniesienia do najnowszej literatury przedmiotu. Większość cytowanych publikacji to prace starsze niż 5 lat od momentu opublikowania. Brakuje chociażby dwóch istotnych z mojego punktu widzenia prac: Petersen i in., (2017) *J. Biol. Chem.* 292: 13843–13852 oraz Nukarinen i in., (2017) *Plant Journal* 91: 505–517. Uwzględnienie zarówno wskazanych jak i innych artykułów opublikowanych w 3 ostatnich latach (w rozprawie zacytowano zaledwie 6 takich prac) z pewnością wzbogaciłyby wnioskowanie i usystematyzowały wiedzę Doktorantki.

2) Bezsprzecznie na pochwałę zasługuje liczba metod badawczych wykorzystywanych przez Doktorantkę w rozprawie. Dla równowagi dodam, że w opisach rysunków zabrakło precyzyjnego opisu sposobu ich stosowania. Jako pierwszy przykład podam, że odniesieniu do metod statystycznych Doktorantka nie wskazuje dokładnie, którego testu statystycznego ANOVA używa do analizy danych (1 czy 2-kierunkowego). Podobnie w przypadku analiz dotyczących

poziomu/akumulacji białka na osi podano opis „względny poziom białka”, nie precyzując co to właściwie oznacza – normalizację względem aktywności? A może średni znormalizowany poziom białka? Analogiczna sytuacja dotyczy rysunku 17 i terminu „względny poziom mRNA”. W odniesieniu do opisu metody, gdzie wskazano trzy geny referencyjne użyte do obliczeń, niejasne jest czy do prezentacji tego wyniku zastosowano wszystkie czy jedynie wybrany w nich.

3) W treści rozdziału „wyniki” można dopatrzeć się pewnych innych nieścisłości lub niestaranności, które utrudniają interpretację wyników. Jak w przypadku analiz poziomu białka na rys. 14- 16, gdzie brakuje prezentacji graficznej wyników uzyskanych metodą western blot. W mojej opinii, są one kluczowe dla oceny istotności prezentowanych wyników. Miałabym także uwagę do zastosowanej analizy statystycznej w tym przypadku. Czy Autorka sprawdziła rozkład danych? Czy ilość powtórzeń eksperymentu - „przynajmniej pięć”- uzasadnia użycie testów parametrycznych? Którego testu AVOVA użyto w tych analizach?

4) Dyskusja wyników przeprowadzona przez Doktorantkę świadczy o jej wiedzy oraz o umiejętności dostrzegania pewnych zależności. W niektórych fragmentach tego rozdziału zabrakło precyzyjnego formułowania spostrzeżeń i wniosków. Największe zastrzeżenia mam do rozdziału 5.3 dyskusji, w którym Doktorantka odnosi się do nieistotnych statystycznie zmian poziomu białek fototropin w mutantach szlaku sumoilacji, a także do stabilności białek fototropin, której w zasadzie nie analizowała w swojej pracy (analizowała jedynie poziom białka). Ponadto, w tej części pracy zabrakło schematu podsumowującego wpływ modyfikacji potranslacyjnych (zarówno ubikwitynacji jak i analizowanej w niniejszej rozprawie sumoilacji) na funkcjonowanie fototropin.

5) Z obowiązku recenzenta dodam, że w pracy zauważyłam nieliczne błędy edytorskie i inne usterki językowe, w tym żargon. Pominę przykłady licząc, że podczas przygotowywania publikacji Doktorantka wykaże się stosowną stylistyką.

Pozostałe pytania i uwagi

- 1) W pracy badano niekwalencyjne oddziaływania pomiędzy PHOT1 oraz SUMO1-3 i 5 ale w dyskusji Doktorantka nie podejmuje tego wątku. W związku z tym podczas obrony proszę Doktorantkę o komentarz odnośnie potencjalnego znaczenia tych wyników.
- 2) Na rys. 7 str. 55 przedstawiono wyniki *in vivo* sumoilacji N-końcowego fragmentu fototropiny-1 w obecności ligazy HPY2. Zgodnie z danymi literaturowymi białko SUMO3,

w przeciwieństwie do SUMO1 i 2, prawdopodobnie nie tworzy polimerów. Jak zatem można wytłumaczyć wynik eksperymentu w ścieżce zawierającej SUMO3GG?

- 3) Na rys. 8 str. 55 przedstawiono wyniki *in vivo* sumoilacji N-końcowego fragmentu PHOT1 w obecności ligazy SIZ1. Jak wiadomo tempo z jakim poszczególne białka SUMO są przyłączane lub odłączane od białka docelowego jest różna. Wiadomo też, że najwolniej jest koniugowane i desumoilowane białko SUMO5. W tym kontekście jak Doktorantka interpretuje przyłączenie, jakże rzadkiej izoformy SUMO - SUMO5 do PHOT1?
- 4) Na rys. 21 przedstawiono odpowiedź chloroplastów na światło ciągłe u roślin typu dzikiego i u mutantów *Atmms21* i *Atsiz1* wskazując na brak istotności statystycznej uzyskanych wyników. W mojej ocenie przedstawione dane mogą wskazywać na osłabienie reakcji na światło u mutantu *Atsiz1* w porównaniu do WT Col-0. W pracy nie zawarto danych liczbowych i istotnych szczegółów analizy statystycznej, dlatego mam wątpliwości co do zasadności wniosku Doktorantki. Proszę o komentarz w tej sprawie.

Podsumowanie

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Dominiki Jagiełło-Fłasińskiej spełnia warunki zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późn. zm.), a zgłoszone powyżej uwagi nie umniejszają wartości poznawczej badań i stanowią wstęp do dalszej dyskusji. Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

