

Mgr Dominika Jagiełło-Flasińska
Streszczenie rozprawy doktorskiej
„Wpływ sumoilacji na reakcje kontrolowane
przez fototropiny”

Światło jest kluczowym czynnikiem dla wzrostu i rozwoju roślin. Rośliny mają zdolność do reagowania na światło dzięki wyspecjalizowanym fotoreceptorom. Fototropiny są receptorami zaangażowanymi w odpowiedzi roślin na światło niebieskie i UVA. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano 2 geny kodujące fototropiny - *PHOT1* i *PHOT2*. Fototropiny zaangażowane są w regulację fototropizmu, ruchów chloroplastów, otwierania aparatów szparkowych i pozycjonowania liści. W słabym świetle, w wyniku reakcji akumulacji, chloroplasty przemieszczają się pod ściany komórkowe prostopadłe do kierunku padania światła przyjmując tzw. położenie płaskie umożliwiające optymalizację absorpcji dostępnego światła. Reakcja ucieczki skutkuje położeniem profilowym chloroplastów pod ścianami równoległymi do kierunku padania światła. W tym położeniu chloroplasty unikają ekspozycji na silne światło zmniejszając jednocześnie prawdopodobieństwo uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego. Obie fototropiny wspólnie kontrolują reakcję akumulacji chloroplastów pod wpływem światła o słabym natężeniu, ale tylko *phot2* bierze udział w reakcji ucieczki chloroplastów wywołanej silnym światłem.

Sumoilacja jest modyfikacją potranslacyjną polegającą na odwracalnym przyłączeniu do modyfikowanego białka małego białka SUMO (SMALL UBIQUITIN RELATED PROTEIN). Modyfikacja ta może blokować lub aktywować białka, zmieniać ich lokalizację i wpływać na interakcje. Sumoilacja może też ochraniać białka przed skierowaniem ich do degradacji. Warunki stresowe skutkują tworzeniem koniugatów z białkiem SUMO. Znaczenie tej modyfikacji pozostaje jedynie częściowo wyjaśnione. W roślinach sumoilacja pośrednio wpływa na rozwój, kwitnienie oraz strukturę korzeni. Genom *Arabidopsis* koduje 8 izoform SUMO, jednak większość prowadzonych badań dotyczy SUMO1, SUMO2, SUMO3 i SUMO5, ponieważ dla tych form znaleziono EST (*Expressed Sequence Tags*). Najważniejsze fizjologicznie są izoformy SUMO1 i SUMO2, gdyż podwójny mutant *Atsum1sum2* jest letalny. Obie izoformy SUMO odpowiadają za reakcję na stres cieplny i solny u roślin. W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano cztery ligazy SUMO biorące udział w procesie sumoilacji: SIZ1 (SAP AND MIZ1), MMS21 (METHYL METHANE SULFONATE SENSITIVITY 21), PIAL1 i PIAL2 (PROTEIN INHIBITOR OF

ACTIVATED STAT LIKE1 I 2). Ostatnio wykazano, że receptor światła czerwonego – fitochrom B jest sumoilowany poprzez przyłączenie SUMO1. W naszym laboratorium wykazano natomiast sumoilację Nkońcowej części fototropiny2.

Głównym celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie czy fototropina1 oddziałuje z białkami z rodziny SUMO oraz z ligazami uczestniczącymi w procesie sumoilacji. Druga część pracy dotyczyła wpływu sumoilacji na reakcje fizjologiczne kontrolowane przez fototropiny. Przeprowadzono analizy bioinformatyczne potwierdzające występowanie sekwencji aminokwasów o wysokim prawdopodobieństwie sumoilacji w obrębie PHOT1. Scharakteryzowano oddziaływanie fototropiny1 z elementami szlaku sumoilacji metodą komplementacji fluorescencji (BiFC) in planta. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano jądrową lokalizację fototropiny1 w oddziaływaniu z ligazą SIZ1. Dowiedziono, że po rekonstrukcji systemu sumoilacji w *E. coli*, N-końcowy fragment fototropiny1 ulega modyfikacji przez białka SUMO. Sprawdzono również poziom ekspresji białek fototropin w liściach mutantów pozbawionych poszczególnych elementów szlaku sumoilacji: *Atsum1*, *Atsum2*, *Atsum3*, *Atsum5*, *Atsiz1*, *Atmms21*, *Atpial1* i *Atpial2*. We wszystkich badanych mutantach ligaz z wyjątkiem *Atpial2* zaobserwowano obniżoną ilość białka PHOT1 w porównaniu do *Arabidopsis* dzikiego typu zarówno w ciemności jak i na świetle. Mutant *Atmms21* charakteryzuje się podwyższoną ilością PHOT2, natomiast mutant *Atsiz1* wykazuje obniżony poziom tego białka w porównaniu do *Arabidopsis* dzikiego typu. Wyższy poziom białek - fototropiny1 i fototropiny2 - zaobserwowano również w mutancie *Atsum5*. Celem określenia fizjologicznej roli sumoilacji fototropin zbadano reakcje fizjologiczne kontrolowane przez fototropiny: indukowany światłem niebieskim ruch chloroplastów i fototropizm. Badania zostały przeprowadzone z użyciem mutantów szlaku sumoilacji oraz mutantów podwójnych, fototropinowych i ligazowych (*Atphot1mms21*, *Atphot1siz1*, *Atphot2mms21*, *Atphot2siz1*). W przypadku ruchów chloroplastów wykazano słabszą odpowiedź mutantu *Atphot1mms21* na krótkie impulsy światła w porównaniu do *Atphot1* oraz silniejszą odpowiedź na krótkie impulsy w *Atphot1siz1*. Zatem ligazy te wpływają na reakcje kontrolowane przez fototropinę2. Mutanty *Atphot2mms21* i *Atphot2siz1* wykazały słabszą niż *Atphot2* akumulację w odpowiedzi na światło ciągłe, co sugeruje, że ligazy wpływają także na odpowiedzi zależne od phot1. Analizując kąt wygięcia fototropicznego siewek wykazano słabszy fototropizm w mutantach *Atmms21*, *Atsiz1* i *Atpial1* przy niskim natężeniu światła (0,01 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) w porównaniu do *Arabidopsis*

dzikiego typu, co może być związane z niższym poziomem PHOT1 w tych mutantach. Mutant *Atpial2* wykazuje silniejszy fototropizm w stosunku do *Arabidopsis* dzikiego typu przy niskim natężeniu światła, może być to związane z wyższym poziomem PHOT1 w tym mutancie na świetle. Mutanty *Atphot1mms21* i *Atphot1siz1* wykazują słabszy fototropizm przy wyższym natężeniu światła ($5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) niż rośliny dzikiego typu i mutanty pojedynczych genów ligaz, co świadczy o tym, że reakcja kontrolowana przez phot2 jest słabsza przy braku ligaz MMS21 lub SIZ1.

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej pozwalają na stwierdzenie, że phot1 jest substratem do modyfikacji przez białka SUMO. PHOT1 w oddziaływaniu z ligazą SIZ1 przyjmuje lokalizację jądrową. Elementy szlaku sumoilacji wpływają na poziom ekspresji białek fototropin zarówno w ciemności, jak i na świetle. Białka SUMO i ligazy sumoilacji regulują (bezpośrednio lub pośrednio) odpowiedzi fizjologiczne kontrolowane przez fototropiny, w szczególności fototropizm.