



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Olgi Sztatelman  
„Fototropina2-regulacja i funkcja”**

Badania opisane przez mgr Olę Sztatelman w jej rozprawie doktorskiej dotyczą wybranych mechanizmów odpowiedzi rośliny na światło. Praca stanowi kontynuację wcześniejszych badań prowadzonych w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Halinę Gabryś, eksperta w temacie percepcji światła przez rośliny i wpływu światła na ruchy chloroplastów. Światło jest niezbędnym czynnikiem do życia każdej rośliny. Odpowiedź na światło warunkuje wzrost i rozwój rośliny i oczywiście wysokość plonów w przypadku roślin uprawnych. Dlatego badania dotyczące receptorów światła oraz szlaków sygnałowych przez nie uaktywnianych były, są i będą w centrum uwagi naukowców zajmujących różnymi aspektami biologii roślin: fizjologią, biologią molekularną, genetyką, biochemią i biofizyką.

Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Olgi Sztatelman miały na celu poznanie regulacji na poziomie RNA oraz białka (modyfikacji potranslacyjnych), jak również funkcji jednej z rodzin fotoreceptorów - fototropin, przede wszystkim fototropiny2.

Praca napisana jest w języku polskim, podzielona jest tradycyjnie na następujące rozdziały Streszczenie, Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję uzyskanych wyników. Pracę zamyka bogata Bibliografia. Na końcu pracy znajduje się Dodatek, w którym zamieszczono wykaz i opis wykorzystanych linii *Arabidopsis thaliana*, szczepów bakteryjnych, starterów i plazmidów oraz podstawowych metod stosowanych w badaniach.

**Wstęp** pracy (21 stron) dobrze wprowadza w tematykę badań prezentowanych w rozprawie. Zawarto w nim najważniejsze informacje dotyczące fotoreceptorów, ze szczególnym uwzględnieniem fototropin, co jest w pełni uzasadnione.

**Cele pracy** zostały jasno określone. Rozdziały **Materiały i Metody** (15 stron) i **Dodatek** (9 stron) zostały opracowane bardzo starannie. Szczegółowy opis metod pozwala na powtórzenie poszczególnych eksperymentów przez czytającego rozprawę (o ile posiada odpowiednią aparaturę badawczą).

**Wyniki** stanowią najobszerniejszą (31 stron) i najważniejszą część rozprawy. Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną uzyskanych wyników. Stanowią one znaczący wkład do poznania mechanizmów regulujących odpowiedź rośliny na światło poprzez szlaki sygnałowe fototropin. Chciałabym podkreślić różnorodność badanych przez Doktorantkę mechanizmów potencjalnie wpływających na funkcjonowanie badanych fotoreceptorów. Wymagało to olbrzymiego nakładu pracy; świadczyć o tym może m.in. wykorzystanie w badaniach ponad 20 linii rzodkiewnika.

Pierwszym zadaniem badawczym opisanym w rozprawie było określenie udziału różnych fotoreceptorów w regulacji ekspresji genów kodujących fototropiny PHOT1 i PHOT2 wykorzystując w tym celu mutanty *cry1*, *cry2*, *cry1cry2*, *phyA*, *phyB*, *phyAphyB* oraz *phot1*, *phot2*. Wyniki tych badań wskazują na wpływ zarówno kryptochromów jak i fitochromów na poziom mRNA *PHO1* w odpowiedzi rośliny na światło. Wykazano, że w przypadku światła niebieskiego regulacja ekspresji/stabilności mRNA *PHOT1* zależy w dużym stopniu od obecności funkcjonalnego kryptochromu 1 oraz fitochromu B, natomiast w odpowiedzi na światło czerwone przede wszystkim fitochromów. Aż tak wyraźnych zależności nie obserwowano w poziomie ekspresji *PHOT2* w mutantach badanych fotoreceptorów. We wszystkich badanych liniach roślinnych, zarówno mutantach jak i roślinie typu dzikiego poziom ekspresji *PHOT2* wzrastał pod wpływem światła niebieskiego i czerwonego. Obserwowano jedynie ilościowe różnice: np. dla mutantu *phyA* pod wpływem światła czerwonego poziom transkryptu *PHOT2* był niższy niż w linii typu dzikiego, natomiast dla mutantu *phyB*, pod wpływem światła niebieskiego poziom transkryptu *PHOT2* był zdecydowanie wyższy niż w roślinie niezmutowanej.

Powyższe wyniki nasunęły mi pytania.

Biorąc pod uwagę, że ekspresja genów *PHOT1* i w mniejszym stopniu *PHOT2* jest regulowana przez różne roślinne receptory światła, to czy w badanych mutantach lub mutantach, w których upośledzona jest ekspresja fitochromów lub kryptochromów obserwowano zaburzenia ruchów chloroplastów, fototropizmu lub otwierania aparatów szparkowych? Jeżeli takie różnice obserwowano, to co jest bardziej prawdopodobne: czy jest to efekt wynikający z różnicy w poziomie fototropin (jeżeli różnice w poziomie mRNA implikują różnice w poziomie białka), czy raczej jest to efekt wynikający z różnicy w percepcji światła przez roślinę?

Następnie Mgr Olga Sztatelman podjęła próbę zbadania zależności akumulacji transkryptu *PHOT2* od fotosyntezy, wykorzystując w tym celu inhibitor fotosyntezy DCMU. Zaobserwowano

regulację ekspresji PHOT2 przez inhibitor, lecz biorąc pod uwagę, że silniejszy efekt tego związku obserwowano, gdy badane rośliny znajdowały się w ciemności niż na świetle, wynik ten raczej nie sugeruje wpływu fotosyntezy na ekspresję/akumulację mRNA *PHOT2*.

Zasadniczą częścią pracy było poznanie mechanizmów regulujących ruch chloroplastów pod wpływem światła, w procesie w którym kluczowymi elementami są fototropiny. Biorąc pod uwagę fakt, że fototropiny są kinazami białkowymi oraz, że jednym z najważniejszych mechanizmów przewodzenia różnych sygnałów w komórkach eukariotycznych, w tym sygnału świetlnego u roślin, jest odwracalna fosforylacja, naturalnym było sprawdzenie wpływu inhibitorów fosfataz białkowych na ruch chloroplastów. Dodatkowo, wcześniejsze prace wskazywały na udział fosfataz w regulacji fototropizmu oraz otwierania aparatów szparkowych pod wpływem światła, procesów kontrolowanych przez fototropiny. Przy użyciu inhibitorów fosfataz (endotalu i kantarydiny) Doktorantka wykazała, że fosforylacja reguluje ruchy chloroplastów, zarówno reakcję akumulacji jak i ucieczki. Aby sprawdzić, czy fosfatazą biorącą udział w regulacji ruchów chloroplastów jest jak przypuszczano PP2A analizowano ruchy chloroplastów w kilku niezależnych mutantach rzodkiewnika, pozbawionych funkcjonalnych podjednostek PP2A. Badania na mutantach nie potwierdziły założenia, że PP2A kontroluje ruchy chloroplastów; jest to raczej inna fosfataza, lub udział fosforylacji jest dla ruchów chloroplastów konieczny ale nie wystarczający. Pomimo, że nie udało się zidentyfikować fosfatazy kluczowej dla badanego procesu, uważam uzyskane wyniki za bardzo ważne - wskazują one na znaczącą rolę defosforylacji w regulacji ruchów chloroplastów pod wpływem światła.

Moje pytanie dotyczące powyższych badań:

Jak Doktorantka może sobie wyobrazić zaangażowanie fosfatazy białkowej w regulację ruchu chloroplastów? Czy regulacja poprzez odwracalną fosforylację może mieć miejsce w błonie, cytoplazmie czy też jądrze komórkowym (np. poprzez regulację ekspresji fototropin)? Aktywność jakich białek mogłaby być przypuszczalnie regulowana przez fosforylację? Dlaczego Autorka rozważa białka z rodziny NRL jako potencjalne substraty fosfatazy w regulacji ruchów chloroplastów? Oczywiście zdaję sobie sprawę, że na ten temat nie ma jeszcze danych eksperymentalnych.

Następnie mgr Olga Sztatelman zbadała możliwość modyfikacji i ewentualnej regulacji funkcji (ruchów chloroplastów) PHOT2 przez sumoilację. Wykazała, że białko PHOT2 jest sumoilowane *in vitro* przez niektóre izoformy SUMO oraz, że PHOT2 oddziałuje z SUM1 i z SUM3 oraz z ligazą SUMO MMS21 *in planta*. Natomiast nie obserwowano oddziaływania PHOT2 z ligazą SIZ1, gdyż oba białka występują w innych przedziałach komórkowych. Dlatego też zaskakujący był wynik wskazujący, że

mutanty *siz1* wykazują większą amplitudę ruchu chloroplastów w reakcji na światło, szczególnie na krótkotrwałe impulsy, niż rzodkiewnik typu dzikiego. Przepuszczalne wytłumaczenie tego faktu przedstawiła doktorantka w Dyskusji wyników. Szkoda, że ograniczony czas nie pozwolił na uzyskanie i zbadanie mutanta ligazy *mms21*, ligazy, która oddziaływała z PHOT2 *in planta*.

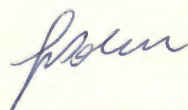
Ostatni rozdział wyników poświęcony był wykazaniu ochronnej roli ucieczki chloroplastów indukowanej przez światło niebieskie. Używając odpowiednich mutantów pokazano, że ani fosforylacja białek LHCI, ani akumulacja zeaksantyny nie wpływają na ruchy chloroplastów. Wykazano wpływ przemieszczeń chloroplastów na jasną fazę fotosyntezy. Wykazano rolę fotoprotekcyjną reakcji ucieczki oraz większą fotoinhibicję wywołaną przez światło niebieskie niż czerwone. Wyniki tej części pracy zostały opublikowane w *Journal of Plant Physiology* w 2010; mgr Olga Sztatelman jest pierwszym autorem tej pracy.

W **Dyskusji** (18 stron) wyników w oparciu o dane literaturowe autorka rozprawy komentuje wyniki, Dyskusja świadczy to o bardzo dobrej znajomości literatury oraz o dojrzałości naukowej mgr Olgi Sztatelman. Szkoda, że doktorantka nie wykazała troszkę większej odwagi w formułowaniu hipotez wynikających z uzyskanych wyników, stąd moje pytania zadane na poprzednich stronach recenzji.

Drobne uwagi dotyczące rozprawy przedstawiłam w osobnym dokumencie.

Moje uwagi wynikają z obowiązku recenzenta, w niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy.

Podsumowując, stwierdzam, że wyniki przedstawione w pracy stanowią znaczący wkład w poznanie mechanizmów odpowiedzi rośliny na światło. 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 Olgi Sztatelman do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na nowatorstwo i wartość prezentowanych wyników wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.



Dr hab. Grażyna Dobrowolska

### Drobne uwagi dotyczące pracy:

1. Niejasne jest dla mnie stosowanie małych i dużych liter pisanych czcionką pochyloną (*italic*) lub też czcionką niepochyloną. Wydaje się, że stosowane są one wymiennie, co utrudnia czytanie tekstu. Zauważyłam, że rozprawa Olgi Sztatelman nie jest wyjątkiem; wydaje się, że jest to prawidłowość stosowana przy opisywaniu szlaków sygnałowych odpowiedzi rośliny na światło. Czy jest w tym jakiś klucz? Zwyczajowo jest przyjęte, że nazwę (skrót nazwy) genu pisze się z dużej litery czcionką pochyloną, białka z dużej litery czcionką niepochyloną, a nazwę mutantu czcionką pochyloną małymi literami.
2. Wydaje mi się, że w pracy pisanej po polsku należy pisać, albo *Arabidopsis thaliana*, *A. thaliana* albo rzodkiewnik, a nie Arabidopsis, bo to jest po prostu rzodkiewnik po angielsku.
3. Str 15 dół i str 16. Co to znaczy „Sama domena kinazowa fototropiny2 poddana ekspresji w Arabidopsis wywołuje konstytutywne odpowiedzi fototropinowe, włączając w to ustawienie chloroplastów w pozycji profilowej w ciemności.” Czy znaczy to, że aktywna fototropina2 powoduje ucieczkę chloroplastów, a nieaktywna akumulację?
4. Str. 16 rozdział 1.2.5. Napisany jest niejasno. Czy S849 i S851 znajdują się w pętli aktywacyjnej kinazy? Powinno to być zaznaczone biorąc pod uwagę, że fototropina1 jest autofosforylowana w kilku różnych miejscach (domenach białka). Ponadto autorka pisze, że „Mutanty te wymagają światła do aktywności (Inoue et al., 2008b), co przemawia przeciwko kluczowej roli internalizacji fotoreceptora w przekazie sygnału”. Wcześniej nie było żadnej informacji dotyczącej roli internalizacji fotoreceptora w przekazie sygnału. Jaki jest związek internalizacji fotoreceptora z jego autofosforylacją? Ponadto niezrozumiałe jest również następne zdanie „Domena kinazowa fototropiny2 odpowiada za jej lokalizację podbłonową”. Czy to znaczy, że jeżeli tej domeny jest brak, to nie ma lokalizacji przy błonie, czy zmianę lokalizacji fototropiny obserwowano w przypadku zmutowanej formy białka?
5. W rozdziale 1.2.6. – użyto określenia „białka konstytutywnie aktywnych form fototropiny1”. Czy Autorka miała na myśli samą domenę kinazową, czy inną zmutowaną formę białka?
6. Str. 19, co to jest „wyższy poziom stacjonarny ufosforylowanej (aktywnej) formy fototropiny 2”
7. Chyba bardziej naturalne byłoby opisanie fosforylacji fototropin w rozdziale „Modyfikacje potranslacyjne w przekazie sygnału od fototropiny2”, z tym, że wg mnie należałoby rozszerzyć

tytuł tego rozdziału, zmienić na Modyfikacje potranslacyjne w przekazie sygnału przez fotropiny”, ponieważ w rozdziale tym opisywane są modyfikacje obu fototropin.

8. Dyskusja na str 79, wiersz 19 od dołu zamiast *PHOT1* napisano *PHOT2*.
9. Str 83- zamiast kwas fosfatylowy, napisałabym kwas fosfatydowy.