



Recenzja rozprawy doktorskiej Chhavi Aggarwal

“ Phototropin signaling in higher plants

**Crosstalk with the phosphoinositide pathway and the mechanism of phototropin2
internalization”**

Rozprawa doktorska Pani Chhavi Aggarwal miała na celu poznanie mechanizmów regulacji ruchów chloroplastów pod wpływem światła niebieskiego, zarówno mechanizmu „ucieczki” na skutek silnego natężenia światła, jak i akumulacji w przypadku światła o niskim natężeniu (światła słabego). Procesy te są kontrolowane przez fototropiny. Głównym obiektem badawczym Doktorantki była fototropina2. Pani Chhavi Aggarwal badała wybrane szlaki przewodzenia sygnałów uaktywniane przez światło niebieskie poprzez fototropinę2 oraz proces jej internalizacji. Tematyka dotycząca fototropin jest bardzo intensywnie badana w wielu laboratoriach na świecie. Fototropiny bowiem, to receptory światła niebieskiego oraz UVA pełniące kluczową rolę w fototropizmie, otwieraniu aparatów szparkowych, ruchach liści i chloroplastów pod wpływem zmiennych warunków oświetlenia. Pełnią tym samym istotną rolę w optymalizacji wydajności fotosyntezy, wzrostu i rozwoju roślin. Doświadczenia opisane w rozprawie są kontynuacją prac prowadzonych w laboratorium kierowanym przez Prof. Halinę Gabryś.

Do swoich badań jako modelową roślinę Doktorantka wybrała rzodkiewnik. Badania prowadziła na liściach rośliny typu dzikiego oraz na mutantach fototropin: *phot1*, *pho2* i mutancie podwójnym *phot1phot2*. Dodatkowo w doświadczeniach wykorzystywany był tytoń - *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana benthamiana*; ta ostatnia roślina używana była do śledzenia zmian lokalizacji oraz badania internalizacji wyrażanej przejściowo fototropiny2 w fuzji z GFP.

Pierwszym zadaniem badawczym opisanym w rozprawie, którego realizacji podjęła się Doktorantka, było zbadanie roli fosfolipidów, a w szczególności szlaków sygnałowych fosfoinozytydów w regulacji ruchów chloroplastów. Doktorantka badała wpływ szlaków fosfoinozytydów, przede wszystkim wpływ aktywności fosfolipazy C (PLC) na zmiany: (-) położenia chloroplastów, (--) poziomu jonów wapnia, (---) ułożenia włókien aktynowych, których rolę w ruchach chloroplastów sugerowano wcześniej, (----) lokalizacji fototropiny2 po naświetleniu liści roślin światłem niebieskim, silnym lub słabym. Doktorantka wykazała, że w

regulacji ruchów chloroplastów, zarówno „ucieczki” jak i akumulacji kontrolowanej przez fototropinę² uczestniczy PLC. Ponadto wykazała, że zablokowanie metabolizmu fosfoinozytoli, wpływa znacząco na lokalizację fototropiny² oraz do pewnego stopnia na sygnał wapniowy (z ang. Ca signature) indukowany światłem niebieskim, natomiast aktywność PLC nie ma wpływu na zmiany położenia włókien aktynowych (aktyny F). Badania zmian lokalizacji fototropiny wskazywały na endocytozę fototropiny²; fototropina² pod wpływem światła niebieskiego jest transportowana z błony komórkowej do aparatu Golgiego.

Drugie zadanie miało na celu zbadanie charakteru i znaczenia endocytozy fototropiny² pod wpływem światła niebieskiego. Doktorantka zbadała dokładnie mechanizm transportu fototropiny² i wykazała jednoznacznie, że w internalizacji fototropiny uczestniczy latryna. Pokazała, że proces ten jest wrażliwy na obecność BFA oraz, że celem internalizacji najprawdopodobniej jest przejściowe usunięcie receptora z błony i jego defosforylacja. Internalizacja fototropin, zarówno phot1 jak phot2 zależna od klatryny była sugerowana również przez inne laboratoria, co jest niezależnym potwierdzeniem prawidłowości założeń pracy.

Praca napisana jest w języku angielskim, podzielona jest tradycyjnie na następujące rozdziały Wstęp, Cele Pracy Wyniki, Dyskusja uzyskanych wyników oraz Materiały i Metody. Na początku rozprawy zamieszczone zostało Streszczenie oraz wyczerpująca lista używanych skrótów. Pracę zamykają Konkluzje i bogata Bibliografia. Dodatkowo do pracy załączona została płyta z krótkimi filmami obrazującymi przemieszczanie się fototropiny² w komórce roślinnej pod wpływem światła. Całość napisana jest zwięźle i jest bogato ilustrowana. Na wyróżnienie zasługuje niezwykle staranność i przejrzystość pracy. Zamieszczone zdjęcia są po prostu piękne; jestem pod ich wrażeniem.

Wstęp czytałam z dużą przyjemnością. Został napisany zwięźle, zawiera najważniejsze informacje potrzebne do śledzenia wyników opisanych w następnej części rozprawy. Doktorantka opisała (-) roślinne fotoreceptory, najszerzej opisując fototropiny będące obiektem badań, (--) dotychczas poznane białka regulujące ruchy chloroplastów pod wpływem światła, (--) szlaki sygnałowe fosfoinozytydów i ich udział w regulacji poziomu wapnia, cytoszkieletu aktynowego, endo- i egzocytozy oraz internalizacji receptorów błonowych.

Drobne uwagi dotyczące wstępu:

Niektóre sformułowania (nieliczne) są trochę niezręczne np.

Na początku rozdziału „Chloroplast movements” Doktorantka pisze “Plants are sessile organisms and the intracellular organelle positioning (distribution of organelles within the cell) allow them to overcome stress and to protect the cellular machinery.” Doktorantka pisze o ruchach różnych organelli komórkowych, nie tylko chloroplastów, w odpowiedzi rośliny na stres tak, jakby to był główny mechanizm obronny roślin, tak oczywiście nie jest. Rośliny wykształciły

olbrzymią gamę mechanizmów obronnych, a ruchy organelli są jedynie jednym z nich i to powinno być zaznaczone w tekście.

Cele pracy zostały jasno sformułowane.

Materiały i Metody stosowane w pracy zostały opisane przejrzysto i bardzo starannie. Szczegółowy opis metod pozwala na powtórzenie poszczególnych eksperymentów przez wnikliwego badacza. Na wyróżnienie zasługuje szeroki wachlarz stosowanych metod badawczych, począwszy od klonowania i mutagenezy poprzez biochemię, ekspresję przejściową w tytoniu, kończąc na wyrafinowanych metodach fotometrycznych i mikroskopii konfokalnej.

Eksperymenty opisane w rozdziale **Rezultaty** zostały bardzo logicznie zaplanowane i starannie zrealizowane. Bardzo wysoko oceniam uzyskane wyniki. Jestem pod wrażeniem jakości dokumentacji zamieszczonej w rozprawie.

Drobne uwagi i zapytania dotyczące tej części pracy to:

1. Czym może być spowodowana znacząco większa amplituda ruchu chloroplastów (akumulacji) mutantu fotropiny2 (phot2) w stosunku rośliny typu dzikiego w warunkach kontrolnych (czyli nie traktowanych inhibitorem PLC) (Fig 12)? Wyjątkowo duża różnica jest widoczna na rysunku 12c. Takie samo pytanie mam w przypadku kinetyki ruchów chloroplastów.
2. Na rysunku 11 a i b zaznaczając stężenie neomycyny napisano „WT” zamiast „0” lub „Control”, jak na rysunku 12.
3. Jak można wytłumaczyć fakt, że w liściach kontrolnych (przed iluminacją) wzrasta poziom jonów wapnia po zablokowaniu szlaku fosfolipazy C za pomocą U73122; w liściach traktowanych U73122 jest on znacząco wyższy niż w traktowanych nieaktywnym analogiem U73343?
4. Najprawdopodobniej jest prawdziwe stwierdzenie, że w ciemności fototropina2 jest defosforylowana, lecz rysunek 32 nie upoważnia do takiego wniosku, może jedynie to sugerować.

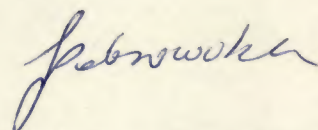
Dyskusja wyników świadczy o dojrzałości naukowej Kandydatki. Czytałam ją z dużym zainteresowaniem. Podczas jej lektury nasunęły mi się następujące pytania/uwagi.

1. Jaka modyfikacja potranslacyjna indukowana przez silne światło niebieskie, o której wspomniała Doktorantka w Dyskusji (str. 93), mogłaby stabilizować fototropinę2? Fosforylacja wydaje się być podobna w obu fototropinach, a fototropina1 jest szybko degradowana pod wpływem silnego światła niebieskiego w przeciwieństwie do fototropiny2. Czy coś wiadomo na ten temat?
2. *Atrcn1* nie koduje fosfatazy PP2A, jak to zostało napisane, lecz regulatorową podjednostkę A fosfatazy PP2A.

3. W Dyskusji zabrakło mi choćby rozważenia/przedyskutowania roli kwasu fosfatydowego (PA) w ruchach chloroplastów oraz w endocytozie fototropiny2. PA może powstawać nie tylko z fosfolipidów strukturalnych poprzez reakcję katalizowaną przez PLD, ale również z PI(4,5)P2 przy udziale PLC. Dlatego też neomycyna i U73122 blokują powstawanie PA w tym szlaku. Ponadto PA reguluje endocytozę, w której uczestniczy klatryna. U roślin ciężkie łańcuchy klatryny oraz białka potencjalnie biorące udział w endocytozie („clathrin assembly proteins”) występują w kompleksach z PA. Co więcej, w przypadku fototropiny1 wykazano, że PA jest mediatorem jej internalizacji. Zabrakło mi również zaznaczenia, że w fototropinie2 podobnie jak w fototropinie1 znajduje się potencjalny motyw wiązania z klatryną.
4. Chciałbym prosić aby w czasie publicznej obrony została omówiona rola aktyny i miozyny w ruchach chloroplastów indukowanych światłem niebieskim, gdyż ciągle jest tutaj dla mnie kilka niejasnych punktów.

Wymienione przeze mnie powyżej drobne uwagi w niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy. Wynikają z obowiązku recenzenta oraz z zainteresowania tematyką badawczą.

Podsumowując, stwierdzam, że wyniki przedstawione w rozprawie 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 Pani Chhavi Aggarwal do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na bardzo wysoki poziom i znaczenie prezentowanych wyników wnioskuję o wyróżnienie tej pracy.



Dr hab. Grażyna Dobrowolska