



Warszawa 6 sierpnia 2024

dr hab. Justyna McIntyre  
Pracownia Mutagenyzy i Tolerancji Uszkodzeń DNA,  
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk  
Tel. (22) 592-11-15  
Email: [jmcintyre@ibb.waw.pl](mailto:jmcintyre@ibb.waw.pl)

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Anety Bazant  
pt. „**Rola sumoilacji w odpowiedzi *Arabidopsis* na czynniki uszkodzające DNA**”  
przygotowanej pod opieką dra hab. Wojciecha Strzałki i dr Agnieszki Katarzyny Banaś

Przedmiotem niniejszej pracy jest scharakteryzowanie roli sumoilacji w odpowiedzi *Arabidopsis thaliana* na promieniowanie UV-B, ze szczególnym uwzględnieniem udziału tej modyfikacji w regulacji białek związanych z fotoreaktywacją.

Indukowane promieniowaniem UV uszkodzenia DNA, dimery cyklobutanowe (CPD) i fotoprodukty 6-4 pirymidyno-pirymidynowe (6-4 PP), są niezwykle szkodliwe dla komórek, gdyż mogą blokować zarówno replikację jak i transkrypcję DNA, a w konsekwencji prowadzić do śmierci komórek. Reperacja tych uszkodzeń stanowi zatem istotną kwestię, zwłaszcza u roślin, których istnienie nieodzownie związane jest ze światłem słonecznym, którego składnikiem wszak jest promieniowanie UV. Wagę problemu podkreśla fakt, że w komórkach roślinnych występuje dodatkowy, zależny od światła i przeznaczony wyłącznie do reperacji uszkodzeń indukowanych promieniowaniem UV, system naprawy na drodze fotoreaktywacji, niespotykany u wszystkich organizmów. Kluczowymi elementami mechanizmu fotoreaktywacji są fotoliazazy, które rozpoznają, a następnie rozszczepiają dimery pirymidynowe. W komórkach *Arabidopsis thaliana* funkcjonują dwie główne fotoliazazy: PHR1 (odpowiedzialna za naprawę CPD) oraz UVR3 (związana z naprawą 6-4 PP). Podjęte przez Doktorantkę badania zmierzały do identyfikacji potencjalnej sumoilacji tych białek w reakcji na promieniowanie UV-B. Potranslacyjne modyfikacje reszt lizynowych, których przykładem jest sumoilacja, odgrywają istotną rolę w regulacji szeregu białek związanych z odpowiedzią komórki na uszkodzenia DNA. W związku z tym realizacja przedstawionego projektu była jak najbardziej uzasadniona, zwłaszcza w laboratorium prof. Wojciecha Strzałki, który od lat zajmuje się szeroko rozumianą tematyką odpowiedzi roślin na uszkodzenia DNA, także w kontekście potranslacyjnych modyfikacji białek reperacyjnych.

Uważam, że przedmiot przedstawionej do recenzji pracy jest oryginalny, gdyż dotychczas nie wykazano udziału sumoilacji w reperacji DNA na drodze fotoreaktywacji, a uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze w kwestii roli jaką pełni sumoilacja w odpowiedzi roślin na uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem UV.

Sądzę jednak, że **tytuł** pracy „Rola sumoilacji w odpowiedzi *Arabidopsis* na czynniki uszkodzające DNA” jest zbyt obszerny i należałoby go zawęzić do uszkodzeń indukowanych promieniowaniem UV, a nie szeroko rozumianych czynników uszkodzających DNA. Taki właśnie, ograniczony do zagadnień związanych z odpowiedzią na promieniowanie UV, cel pracy prezentuje również w swojej rozprawie Doktorantka.

Oceniana rozprawa doktorska mgr Anety Bażant ma typowy układ i składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, opisu celu pracy, materiałów, metod, wyników, dyskusji, podsumowania oraz spisu literatury. Ponadto na końcu umieszczono rozdział „Dodatki” zawierający pomocnicze informacje dotyczące stosowanych odczynników i materiałów oraz używanego w trakcie badań sprzętu.

**Streszczenia** w języku polskim i angielskim są tożsame i dość obszerne. Dokładnie opisują zakres wykonanych badań i otrzymanych wyników.

We **Wstępie** Doktorantka charakteryzuje promieniowanie UV i jego wpływ na rośliny, w tym na składniki budulcowe komórki oraz procesy zachodzące w komórkach roślinnych. Omówione są także rodzaje uszkodzeń indukowanych przez promieniowanie UV, jak również zależne i niezależne od światła mechanizmy reperacji tych uszkodzeń. W opisie poszczególnych mechanizmów zawarto informację, które z białek reperacyjnych zidentyfikowano w *A. thaliana*. Kolejno, Doktorantka przedstawia mechanizm sumoilacji u roślin oraz rolę, jaką ta modyfikacja pełni w regulacji mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Wstęp stanowi dobre wprowadzenie to przedstawionych dalej wyników, a schematy towarzyszące omówieniu poszczególnych ścieżek reperacji uszkodzeń DNA, czy sumoilacji ułatwiają odbiór prezentowanych informacji. Bardzo pomocne są również tabelaryczne zestawienia białek *A. thaliana* biorących udział w sumoilacji oraz zidentyfikowanych dotychczas sumoilowanych białek *Arabidopsis* związanych z naprawą uszkodzeń DNA wraz z odniesieniem do ich homologów w innych organizmach.

We wstępie Doktorantka prezentuje różne drogi reperacji uszkodzeń indukowanych promieniowaniem UV, a nie tylko mechanizm fotoreaktywacji. W związku z tak szeroko przedstawionym kontekstem odpowiedzi na uszkodzenia indukowane promieniowaniem UV, według mnie, we wstępie zabrakło opisu mechanizmów tolerancji uszkodzeń DNA. Procesy te, mimo iż nie prowadzą do naprawy, to odgrywają istotną rolę w odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem UV.

**Cel pracy** jest precyzyjnie określony. Dodatkowo opisano także konkretne podejścia, które podjęto by zrealizować przedstawione trzy hipotezy badawcze.

**Materiały** i **Metody** używane w pracy są bardzo wyczerpująco opisane. Liczne, tabelaryczne zestawienia wykorzystywanych konstruktów, warunków reakcji, przeciwciał, starterów, odczynników i aparatury ułatwiają porównania oraz sprawne wyszukanie informacji.

W rozdziale **Wyniki** przedstawiono szereg niezależnych podejść *in vivo*, *in vitro* oraz *in silico* wskazujących, że sumoilacja bierze udział w odpowiedzi *Arabidopsis* na promieniowanie UV-B. Doktorantka pokazała, że w ekstraktach białkowych roślin eksponowanych na promieniowanie UV-B zwiększa się poziom sumoilacji całkowitej puli białek, a zwłaszcza koniugatów SUMO1 i SUMO2. Wydaje się, że za ten efekt w dużej mierze odpowiada ligaza SIZ1, a w nieco mniejszym MMS21. Znaczna część wyników dotyczy weryfikacji hipotezy, że fotolizy *Arabidopsis* uczestniczące w fotoreaktywacji są sumoilowane. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń *in vitro* jak i *in vivo* wskazują, że to fotolizaza UVR3, a nie PHR1, może być kowalencyjnie sumoilowana, a także oddziaływać z białkiem SUMO, mimo, iż potencjalne miejsca sumoilacji zidentyfikowano w obu

analizowanych fotoliazach. Z kolei analizując poziom uszkodzeń CPD i 6-4 PP w naświetlanych promieniowaniem UV-B roślinach niosących mutacje w genach kodujących poszczególne białka ze szlaku sumoilacji wykazano brak znaczących różnic w poziomie reperacji tych uszkodzeń zarówno w ciemności jak i w świetle. Podobnie, analiza wpływu promieniowania UV-B na przyrost korzeni w tych roślinach nie wskazała na zahamowanie wzrostu w roślinach niosących mutacje w genach kodujących SUMO, czy kodujących analizowane ligazy ubikwitynowe. Doktorantka wykazała również, że inne czynniki mutagenne nie wpływają znacząco na poziom ekspresji genów kodujących poszczególne białka ze szlaku sumoilacji.

**W Dyskusji** Doktorantka w obszerny, wnikliwy i krytyczny sposób omawia otrzymane wyniki odnosząc się do dostępnych danych literaturowych. Jest to o tyle istotne, że większość uzyskanych wyników wskazuje na brak znaczących różnic pomiędzy roślinami typu dzikiego a niosącymi mutacje w genach kodujących białka ze szlaku sumoilacji. Rozdział ten został podzielony na podrozdziały, w których osobno zostały omówione w sposób krytyczny najważniejsze wyniki uzyskane w czasie doktoratu. Taka organizacja rozdziału „Dyskusja” ułatwia jego czytanie i analizę konkretnych podejść, które podjęto w trakcie realizacji doktoratu. Doceniam przeprowadzoną w podrozdziale „Rola fizjologiczna sumoilacji UVR3” analizę wpływu sumoilacji potencjalnych miejsc zidentyfikowanych przez programy bioinformatyczne, a także zarysowanie w podrozdziale „Perspektywy dalszych badań” konkretnych rozwiązań i kierunków w których należałoby prowadzić dalsze badania. W tym ostatnim podrozdziale Doktorantka wskazuje, że projekt jest kontynuowany, przedstawia problemy na jakie natrafiono i wskazuje sposoby ich rozwiązania. Zgadzam się, że kluczową sprawą jest identyfikacja lizyn w białku UVR3, które ulegają sumoilacji. Przy problemach związanych z identyfikacją miejsc sumoilacji za pomocą spektrometrii mas można byłoby sprawdzić, czy mutacje lizyn do arginin w potencjalnych miejscach sumoilacji wpływają na poziom sumoilacji białka UVR3. Uważam też, że warto byłoby kontynuować badania mające na celu identyfikację domeny SIM oraz sumoilowanych białek, które przez tą domenę oddziałują z UVR3.

**W Podsumowaniu** Doktorantka rekapitułuje przedstawione w pracy wyniki i wskazuje, że „uzyskane wyniki stanowią ciekawy początek do dalszych badań nad rolą sumoilacji w odpowiedzi roślin na UV-B”, z którym to stwierdzeniem całkowicie się zgadzam.

Należy podkreślić że praca przygotowana jest starannie i napisana poprawną polszczyzną, bez stosowania anglicyzmów, tak często spotykanych w pracach badawczych pisanych w języku polskim. Błędy edytorskie są nieliczne i nie wpływają na całkowity odbiór pracy.

Wyniki badań przedstawione w rozprawie nie zostały jeszcze opublikowane, choć Doktorantka jest współautorką szeregu artykułów naukowych zarówno tych badawczych jak i przeglądowych dotyczących odpowiedzi roślin na promieniowanie UV oraz roli sumoilacji. Wskazuje to, że Pani Aneta Bazant w trakcie studiów doktoranckich brała udział także w innych projektach.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi kilka wątpliwości/pytań, o ustosunkowanie się do których proszę Doktorantkę:

- Wyniki przedstawione na rys. 14 wskazują na dość znaczący spadek ekspresji genów PIAL1 i PIAL2 kodujących enzymy E4 w odpowiedzi na promieniowanie UV. Z kolei w analizie globalnej sumoilacji białek w odpowiedzi na promieniowanie UV-B, w mutantach pial1 i pial2 nie zaobserwowano

znaczących różnic w stosunku do szczepu typu dzikiego. Proszę o interpretację. Czy znane są substraty tych ligaz E4?

- W pracy Wang i wsp. opublikowanej w Applied and Environmental Microbiology w 2020 r. (doi/10.1128/AEM.00287-20) autorzy pokazali, że u patogennego grzyba *Beauveria bassiana* fotoliza PHR2 odpowiedzialna za naprawę 6-4 fotoproduktów oddziałuje z białkiem RAD23. W jaki sposób sumoilacja fotoliaz mogłaby wpływać na regulację odpowiedzi na uszkodzenia indukowane UV? Czy możliwy jest wpływ na koordynację procesów?

- Doktorantka tłumaczy, że jednym z powodów obniżonej sumoilacji białka UVR3 w badaniach *in bacteria* w układzie z E1+E2+E3/E4 w stosunku do układu E1+E2 jest to, że enzymy E3 mogą same ulegać sumoilacji. Czy wiadomo, czy ligazy SIZ1, MMS21, PIAL1 lub PIAL2 są sumoilowane i jaki jest wpływ takiej modyfikacji na ich aktywność enzymatyczną?

- Jaka jest funkcja ssaczych homologów fotoliaz i czy są sumoilowane lub modyfikowane potranslacyjnie przez ubikwitynację lub inne ubikwityno-podobne białka?

Spostrzeżenia i uwagi dotyczące rozprawy:

- Podpis osi y na Rys. 36 jest niejasny, gdyż nie wiadomo co tak naprawdę mierzono.

- W rozdziale 6.3.3., w którym opisano analizę wpływu czynników mutagennych na poziom mRNA genów kodujących poszczególne białka ze szlaku sumoilacji nie opisano jakiego rodzaju uszkodzenia indukują poszczególne czynniki.

- Czy pierwszy prążek powyżej prążka UVR3 na Rys. 15 i 16 jest potencjalnym produktem mono-sumoilacji?

- W doświadczeniach BiFC i Y2H nie badano oddziaływań z PIAL1 i PIAL2. Dlaczego?

Drobne błędy edytorskie:

- W podpisie pod Rys. 12 błędnie opisano mutanty. Zamiast pial1 oraz pial2 jest siz1-3 i mms21.

- W podpisie tabel 17, 20 powinno chyba być „potencjalne motywy SIM...”, a nie „potencjalne motywy sumoilacji SIM” tudzież „interakcji SIM”.

- Na Rys.17. brak części dolnego panelu, która powinna zawierać prążki PHR. Być może wynika to z problemu w druku mojej kopii rozprawy.

- Na str. 88- konstrukt PCNA to chyba PCNA-cGFP.

- W podpisie pod Rys. 45 i Rys.46 ujęto również ciprofloksacynę oraz parakwat, których na wykresie nie ma.

- Określenie „tworzenie oddziaływań” (str. 127) jest dość niefortunne.

**W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anety Bażant spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Anety Bażant do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**



Signed by /  
Podpisano przez:

Justyna McIntyre  
Instytut Biochemii  
i Biofizyki PAN

Date / Data:  
2024-08-06 12:23